

Dissertação de Mestrado

**REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA NO DIAGNÓSTICO E
CONTROLE DO ENVENENAMENTO PELA PICADA DE
SERPENTES PEÇONHENTAS BRASILEIRAS**

CLÁUDIA LOPES PENAFORTE

**Belo Horizonte
1995**

CLÁUDIA LOPES PENAFORTE

**REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA NO DIAGNÓSTICO E
CONTROLE DO ENVENENAMENTO PELA PICADA DE
SERPENTES PEÇONHENTAS BRASILEIRAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadores: Carlos Ribeiro Diniz
Carlos Chavez-Olórtegui

Belo Horizonte
Fundação Ezequiel Dias
Universidade Federal de Minas Gerais
Outubro - 1995

Este trabalho foi realizado no laboratório de Pesquisa e Serpentário da Fundação Ezequiel Dias sob orientação do Dr. Carlos Ribeiro Diniz e Carlos Chavez Olortegui, com o suporte financeiro das seguintes instituições:

- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior
- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
- FUNED - Fundação Ezequiel Dias.

Este trabalho foi apresentado, parcialmente, nas seguintes reuniões científicas:

- XVIII Congresso Brasileiro de Imunologia
Sociedade Brasileira de Imunologia
Águas de Lindóia - São Paulo
19 a 22 de setembro de 1993.

- 1 st International Congress on Envenomations and their Treatments
Institut Pasteur
Paris - França
7 a 9 de junho de 1995.

- XX Congresso Brasileiro de Imunologia
Sociedade Brasileira de Imunologia
Angra dos Reis - Rio de Janeiro
10 a 13 de setembro de 1995.

AGRADECIMENTOS

- Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, pelos ensinamentos, convivência e incentivo.
- Ao Carlos Chavez Olórtégui pelo grande incentivo, dedicação e orientação objetiva durante a realização deste trabalho.
- Ao Professor Carlos Ribeiro Diniz, pela oportunidade oferecida e pelos ensinamentos durante os anos de convivência.
- Ao Professor Arinos Magalhães pela compreensão, disponibilidade e orientação precisa e principalmente pelo seu exemplo de conduta científica.
- Aos meus pais, pelo incentivo, compreensão, apoio estando presentes em todos os momentos de minha vida.
- Ao Arnaldo, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo a mim dedicados.
- Ao Dário José de Souza, pelo apoio técnico e amizade.
- À Alice pela disponibilidade e sorriso sempre amigo.
- À Sandra Mara dos Santos, pelo apoio técnico e companheirismo nas horas mais alegres e mais dolorosas.
- Ao Evanguedes Kalapothakis, pela revisão do manuscrito e sugestões.

- As estudantes de mestrado Maria Inácia, Sílvia e estudante de iniciação científica Ana Paula, pela amizade, incentivo, disponibilidade e apoio durante a realização deste trabalho.
- A estudante de doutorado Mônica Patrícia, pela disponibilidade, apoio, orientação e fornecimento de programas estatísticos utilizados neste trabalho.
- Ao Emerson e Luís Guilherme Heneine pela valiosa orientação no manuseio dos programas de computador utilizados no trabalho.
- À Giselle - chefe do Serpentário da Fundação Ezequiel Dias, pelo incentivo, apoio e amizade.
- À Divisão de Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias, pelo fornecimento dos venenos e antivenenos.
- Aos amigos do Serpentário e Divisão de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias, pela amizade, colaboração e carinho.
- À Celise, por sua eficiência, disponibilidade e dedicação à pós-graduação.
- À Valéria e Dona Clara, secretárias da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias, pela eficiência, disponibilidade, dedicação e carinho.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

- Aos Drs. Délio Campolina, Mariana Borges Dias, Carlos Amaral e Nilton Rezende do Centro de toxicologia do “Hospital João XXIII” e “Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG”- BH, MG pelos estudos e acompanhamento clínico dos acidentados e pela coleta das amostras utilizadas no presente trabalho

- Em especial aos Professores Pedro Pardal e Paulo Bornheim das equipes do “Hospital Universitário João de Barros Barreto” - Belém, Pará; e “Hospital de Medicina Tropical de Manaus” - Manaus, AM, respectivamente, pela autorização de apresentação nesta tese de resultados de trabalho de pesquisa não publicados.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se torna uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida”.

Albert Einstein.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	XI
Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XIV
Resumo.....	XV
1. Introdução	2
1. 1. Natureza química dos componentes do veneno de serpentes dos gêneros <i>Bothrops, Crotalus e Lachesis</i>	5
1. 1. 1. Componentes com atividade procoagulante.....	6
1. 1. 2. Componentes com atividade hemorrágica.....	8
1. 1. 3. Toxinas que agem sobre plaquetas.....	9
1. 1. 4. Ação proteolítica.....	9
1. 1. 5. Neurotoxinas.....	9
1. 1. 6. Miotoxinas.....	10
1. 1. 7. Peptídeos potenciadores de bradicinina.....	11
1. 2. Envenenamento.....	12
1. 3. Soroterapia.....	13
1. 4. imunodiagnósticos dos acidentes ofídicos.....	15
1. 4. 1. Testes de precipitação e imunodifusão.....	16
1. 4. 2. Imunofluorescência e imunohistoquímica.....	17
1. 4. 3. Hemaglutinação.....	18
1. 4. 4. Imunoeletroforese.....	18
1. 4. 5. Radioimunoensaio.....	19
1. 4. 6. Teste imunoenzimático (ELISA).....	20
2. Objetivos Gerais.....	24
2. 1. Objetivos Específicos.....	25

3. Metodologia.....	27
3. 1. Animais.....	27
3. 2. Venenos.....	27
3. 2. 1. Purificação da Crotamina e Crotoxina do veneno total de Crotalus durissus terrificus	28
3. 3. Antivenenos.....	29
3. 3. 1. Antiveneno botrópico, crotálico, laquétrico e B. atrox	29
3. 3. 1. 1. Purificação de imunoglobulinas sem reatividade cruzada entre os venenos de B atrox e L. muta muta	29
3. 3. 1. 2. Purificação de imunoglobulinas sem reatividade cruzada entre os venenos de Bothrops spp e Crotalus	32
3. 3. 2. Obtenção de anticorpos anti-crotamina.....	32
3. 3. 2. 1. Purificação de imunoglobulinas do isotipo IgG anti-crotamina	33
3. 3. 3. Obtenção de IgG F(ab') ₂ anti-crotoxina.....	33
3. 3. 3. 1. Purificação de IgG F(ab') ₂ anti-Crotoxina.....	34
3. 4. ELISA para determinar anticorpos antivenenos.....	35
3. 5. ELISA para determinar anticorpos antivenenos e soros de pacientes acidentados por serpentes.....	36
3. 6. Preparação e titulação dos conjugados.....	37
3. 6. 1. Preparação dos conjugados.....	37
3. 6. 2. Titulação dos conjugados.....	37
3. 7. ELISA Sanduíche para determinar e diferenciar antígenos circulantes dos venenos das serpentes B. atrox e L. muta muta , em soros de pacientes acidentados.....	38
3. 8. ELISA Sanduíche para determinar e diferenciar antígenos circulantes dos venenos das serpentes Bothrops spp , Crotalus , crotamina e crotoxina,	

em soros de pacientes acidentados.....	39
3. 9. Avaliação da especificidade do teste de ELISA.....	40
3. 10. Determinação do “cut-off” dos testes de ELISA - para dosagens de antígenos circulantes.....	41
3. 11. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo, prevalência do teste de ELISA - Sanduíche para dosagens de antígenos circulantes do veneno e crotoxina de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	41
3. 12. ELISA Sanduíche para detectar Crotamina em veneno da serpente <i>Crotalus durissus</i>	42
3. 12. 1. Análises estatísticas.....	43
4. Resultados.....	46
5. Discussão.....	82
6. Conclusões.....	94
7. Referências Bibliográficas.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

BA	- <i>Bothrops atrox</i>
CE	- Componentes específicos
CD	- <i>Crotalus durissus</i>
CNBr-4B	- Sepharose ativada com brometo de cianogênio-4B
HCl	- Ácido clorídrico
IgG	- Imunoglobulinas G
LMM	- <i>Lachesis muta muta</i>
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
OPD	- Ortofenileno diamiano
SB	- Solução de bloqueio
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SL	- Solução de lavagem
TEMED	- N', N', N', N' - Tetrametil etilenodiamino
TI	- Tampão de incubação
TRIS	- Hidroximetil amino metano

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 1 - Reação cruzada de anticorpos contra veneno de <i>B. atrox</i> e <i>L. muta muta</i> , antes da imunopurificação.....	47
FIGURA 2 - Reação cruzada de anticorpos contra veneno de <i>Bothrops spp</i> e <i>Crotalus durissus</i> antes da imunopurificação.....	48
FIGURA 3 - ELISA direta para determinar anticorpos não relacionados entre veneno de <i>B. atrox</i> e <i>L. muta muta</i> , após imunopurificação.....	49
FIGURA 4 - ELISA direta para determinar anticorpos não relacionados entre veneno de <i>Bothrops spp</i> e <i>Crotalus durissus</i> , após imunopurificação	50
FIGURA 5 - ELISA Sanduíche para titulação do veneno de <i>B. atrox</i> e <i>L. muta muta</i>	53
FIGURA 6 - ELISA Sanduíche para titulação do veneno de <i>Bothrops spp</i> e <i>Crotalus durissus</i>	54
FIGURA 7 - ELISA Sanduíche para titulação da crotamina e crotoxina do veneno de <i>Crotalus durissus</i>	56
FIGURA 8 - Cinética em camundongos inoculados com doses não letais do veneno de <i>B. atrox</i> e <i>L. muta muta</i>	57
FIGURA 9 - Cinética em camundongos inoculados com doses não letais do veneno de <i>Crotalus durissus</i> , <i>Bothrops spp</i> , crotoxina e crotamina.....	58
FIGURA 10 - ELISA Sanduíche para detectar especificamente veneno de <i>B. atrox</i> e <i>L. muta muta</i> em soro de camundongos.....	60
FIGURA 11 - ELISA Sanduíche para detectar especificamente veneno de <i>Crotalus durissus</i> e <i>Bothrops spp</i>	61
FIGURA 12 - Concentração plasmática de antígenos tóxicos do veneno e	

antiveneno em soro de paciente acidentado por <i>L. muta muta</i> , antes e após soroterapia.....	64
FIGURA 13 - Relação entre níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA e estado clínico de pacientes acidentados por <i>B. atrox</i> atendidos no “HUJBB”- Belém, Pará, 1993.....	67
FIGURA 14 - Níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA, tempo entre picada e atendimento médico e estado clínico de pacientes picados por <i>B. atrox</i> , atendidos no “HUJBB”, Belém, Pará, 1993.....	68
FIGURA 15 - Concentração plasmática de antígenos tóxicos do veneno e antiveneno em soro de paciente acidentado por <i>C. durissus</i> , antes e após soroterapia.....	73
FIGURA 16 - Níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA Sanduíche em diferentes tempos de incubação, em pacientes acidentados por <i>C. durissus</i> atendidos no “Hospital João XXIII”	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Acidentes ofídicos atendidos no “Hospital de Medicina Tropical de Manaus” no período de Janeiro/86 a Outubro/94.....	65
TABELA 2 - Níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA em pacientes acidentados por <i>Bothrops spp</i> ou <i>Crotalus durissus</i> , atendidos no “Hospital João XXIII”, BH, MG, 1994.....	70
TABELA 3 - Dados clínicos, doses de SAC e níveis circulantes no soro, medidos por ELISA, de: veneno total, crotamina e crotoxina em pacientes acidentados por <i>C. durissus</i> , atendidos no “Hospital João XXIII”.....	71
TABELA 4 - ELISA Sanduíche e teste <i>in vivo</i> para classificar o veneno de <i>C. durissus</i> crotamino positivo e crotamino negativo.....	74
TABELA 5 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de <i>C. durissus</i> em soro de pacientes picados.....	78
TABELA 6 - Relação dos resultados do ELISA para determinação da crotoxina em soro de pacientes picados por <i>C. durissus</i>	79
TABELA 7 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de <i>Bothrops spp</i> em soro de pacientes picados.....	79
TABELA 8 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de <i>L. muta muta</i> em soro de pacientes picados.....	79
TABELA 9 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de <i>B. atrox</i> em soro de pacientes picados.....	80

RESUMO

Desenvolveu-se neste trabalho, um ensaio imunoenzimático (ELISA) que permite detectar, diferenciar e quantificar antígenos presentes na peçonha de serpentes da família Crotalidae mais frequentes no território brasileiro, em soro de humanos acidentados por estas serpentes.

O ensaio tornou-se realizável utilizando um processo desenvolvido em nosso laboratório onde imunoglobulinas G dos soros de cavalos ou coelhos hiperimunizados com os diferentes venenos: *Bothrops spp*, *Crotalus durissus*, *Bothrops atrox*, *Lachesis muta muta* e toxinas do veneno crotálico: crotamina e crotoxina, que reconhecem componentes imunologicamente comuns presentes nos venenos de serpentes de diferentes gêneros ou espécie, foram separadas por técnicas de imunoafinidade. Foram obtidas imunoglobulinas G que reconhecem especificamente apenas o veneno de um gênero ou espécie. Estas imunoglobulinas foram utilizadas no método de ELISA -Sanduíche para sensibilização de placas e produção de conjugados.

Observou-se ser possível diferenciar (através do ensaio de ELISA) antígenos próprios das serpentes *L. muta muta* ou *B. atrox* (região Amazônia), no sangue de pacientes

picados por de cada um destas espécies e assim identificar a serpente responsável pelo acidente.

Procedimento idêntico permitiu identificar antígenos das serpentes do gênero ***Bothrops*** utilizados para produção do soro antiofídico (especificamente ***B. jararaca***), e diferenciar acidentes provocados por estas serpentes daqueles provocados pelo gênero ***Crotalus***. Além disso, permite diferenciar toxinas específicas do veneno crotálico (crotoxina e crotamina).

Pelo processo que desenvolvemos, foi possível acompanhar a cinética de neutralização do veneno dos Crotalideos mencionados e estabelecer correlação entre a concentração de antígenos tóxicos presentes no sangue de pacientes e a gravidade do acidente avaliada clinicamente pelos sinais e sintomas observados.

Conclui-se que esse método pode ser útil a médicos e epidemiologistas no diagnóstico e tratamento dos acidentes ofídicos e no estudo dos mecanismos de ação dos venenos em animais inoculados experimentalmente.

1 . INTRODUÇÃO

1 . INTRODUÇÃO

Em diversas partes do mundo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais de países da África, da América do Sul e do sudeste da Ásia, acidentes por picadas de serpentes peçonhentas constituem problemas médicos graves e frequentes para as populações rurais que habitam estas regiões (RUSSELL, e cols., 1975; PUGH e cols., 1980; THEAKSTON, 1983; ALFARO e BOZA, 1983; RUSSELL e DART, 1991).

As variedades de serpentes peçonhentas, aquelas que possuem aparelho inoculador de veneno ou peçonha, existentes no mundo pertencem a cinco famílias. Duas famílias são encontradas no Novo Mundo: a família das **Crotalidae**, representadas no Brasil pelos gêneros **Bothrops** (jararacas), **Crotalus** (cascavéis), **Lachesis** (surucucus) **Porthidium** e **Bothriopsis** e a família das **Elapidae**, onde apenas um gênero, **Micrurus** (corais) são encontradas no Brasil. Serpentes das famílias **Colubridae**, **Hydrophiidae** (serpentes marinhas) e **Viperidae** (víboras verdadeiras) não existem no continente americano, mas junto com as serpentes da família **Elapidae** próprias do Velho Mundo (najas, mambas e outras) formam população densa e numerosa de serpentes extremamente venenosas em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Europa e Oceania.

No mundo ocorrem 40-50.000 mortes por acidentes ofídicos, e no Brasil 20 a 30.000 acidentes são notificados anualmente (Ministério da Saúde, 1993) com uma taxa de mortalidade de cerca de 1,8% a 2%, cabendo as serpentes dos gêneros ***Bothrops*** e ***Crotalus*** a responsabilidade por cerca de 90% dos acidentes (ROSENFELD,1971). A incidência de envenenamento pelas espécies ***Bothrops atrox*** e ***Lachesis muta muta***, predomina nas florestas tropicais da América do Sul (LARRICK e cols., 1978; THEAKSTON e cols., 1981a; CHIPPAUX e THEAKSTON,1987).

As serpentes da família ***Crotalidae*** são identificadas pela presença de pequena depressão entre os olhos e as narinas, denominada pelos herpetologistas de fosseta loreal. São serpentes agressivas, de presas longas, flexíveis e erectas quando abrem a boca. Estas presas dobram-se para trás quando a boca se fecha e infligem na vítima uma picada deixando marcas características como se fossem picadas de agulha. No contato, o veneno é espremido por contração do músculo da glândula venenífera.

O gênero ***Bothrops***, compreende aproximadamente 31 espécies (CAMPBELL e LAMAR, 1989), distribuídas por todo território brasileiro. Habitam preferencialmente locais úmidos, como matas e áreas cultivadas, possuem hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas.

As serpentes do gênero ***Crotalus***, as cascavéis, são encontradas geralmente em campos abertos, secos e arenosos, distribuindo-se ao longo do território brasileiro inclusive na mata Atlântica e região Amazônica, onde aparecem em pequenas

manchas de cerrado isoladas na floresta. Não têm por hábito atacar e, quando ameaçadas, denunciam sua presença com o ruído do chocalho. As serpentes desse gênero, encontradas no Brasil, pertencem a uma única espécie, ***Crotalus durissus***, com seis subespécies (CAMPBELL e LAMAR, 1989).

O gênero ***Lachesis*** é formado por uma única espécie, ***Lachesis muta***, e cinco subespécies. São encontradas na América do Sul, na floresta amazônica e na mata atlântica até o paralelo que passa acima da foz do Rio Paraíba, e do nordeste até o Rio de Janeiro; na América Central até o norte da Costa Rica. Habitam áreas de floresta primária, de solo úmido, várzeas e proximidades de igarapés, possuindo atividade noturna. É considerada a maior serpente peçonhenta brasileira, chegando a ultrapassar três metros de comprimento (CAMPBELL e LAMAR, 1989). As subespécies brasileiras são a ***L. muta muta*** da Amazônia e ***L. muta rhombeata***.

Das serpentes da família ***Elapidae***, somente as do gênero ***Micrurus*** são encontradas nas Américas. Possuem presas curtas e erectas; mascam quando mordem (não picam) e dessa forma introduzem o veneno na vítima.

O gênero ***Micrurus***, possui 53 espécies (CAMPBELL e LAMAR, 1989), distribuídas no Sul dos Estados Unidos, México, América Central e a grande maioria na América do Sul. As corais ocorrem numa grande variedade de habitats. Em nosso meio, o acidente elapídico é raro, havendo poucos relatos clínicos na literatura (Ministério da Saúde, 1991).

1. 1 . NATUREZA QUÍMICA DE COMPONENTES DO VENENO DE SERPENTES DOS GÊNEROS *BOTHROPS*, *CROTALUS* E *LACHESIS*

Os venenos das serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos naturais, contendo diversos componentes. Mais de 90% de seus pesos secos são proteínas com diversificadas ações farmacológicas, toxinológicas e bioquímicas. Essas proteínas compreendem grande variedade de enzimas tóxicas e proteínas não tóxicas. As frações não protéicas são formadas por carboidratos, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos, metais e outros (BIEBER,1979). O papel específico e a participação de cada um dos componentes no envenenamento humano ainda não estão totalmente esclarecidos.

As atividades gerais dos venenos Crotalidae são caracterizadas por efeitos proteolíticos (coagulante, hemorrágico, necrosante, liberador de cininas, indutor de edemas) e neurotóxico (BRAZIL e VELLARD, 1928; VELLARD, 1948; DEUTSCH e DINIZ, 1955; DA SILVA e cols. 1989; DINIZ e OLIVEIRA, 1992).

Até o início do século, o interesse nos estudos de venenos de serpentes era motivado para o tratamento dos acidentes, centrados na observação de sinais e sintomas clínicos que permitiam diagnósticos não muito precisos e avaliação apenas aproximada da gravidade do acidente.

O interesse pelo estudo científico dos venenos foi despertado depois que SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT cristalizaram em 1938, no Instituto Butantan, em São Paulo, uma proteína tóxica do veneno de cascavel, a qual deu o nome de crotoxina; EAGLE, no Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, caracterizou componentes do veneno de serpentes responsáveis pela coagulação sangüínea de mamíferos (1937); MOURA GONÇALVES e LAURA VIEIRA (1950) isolaram, por eletroforese, uma segunda proteína tóxica do veneno de cascavel denominada crotamina; ROCHA e SILVA, ROSENFELD e BERALDO (1949) caracterizaram uma substância hipotensora de atividade sobre o músculo liso, liberado por proteases do veneno de *B. jararaca*, a qual deram o nome de bradiginina.

1 . 1 . 1. COMPONENTES COM ATIVIDADE PROCOAGULANTE

Como uma das ações dos venenos de serpentes é imobilizar rapidamente sua presa, a principal atividade dos venenos está relacionada com esta propriedade. Uma dessas atividades é a ação procoagulante que age diretamente sobre fatores da cascata de coagulação, onde os alvos principais são: fibrinogênio, protrombina e fator X.

A enzima que tem atividade coagulante direta sobre o fibrinogênio é conhecida como “thrombin-like” por possuir ação semelhante à trombina. Esta foi demonstrada pela primeira vez, no veneno de *Bothrops atrox*, *B. jararaca* e *B. numifer*, por EAGLE

(1937). Diferente da trombina que hidrolisa as cadeias α e β do fibrinogênio, a fração “thrombin-like” (semelhante a trombina) de grande parte dos venenos de serpentes encontradas no Brasil, libera apenas o fibrinopeptídeo A da cadeia α . Nestas condições, não ocorre a formação de dímeros de fibrina, etapa inicial da produção de fibrina fisiológica.

O primeiro componente purificado do veneno de ***B. atrox*** foi denominado batroxobina com nome registrado comercialmente de Defibrase ou Reptilase (STOCKER e BARLOW, 1975; HOLLEMAN e WEISS, 1976; STOCKER e cols., 1982).

O veneno de ***Lachesis*** também possui atividade “thrombin-like” (DEUTSH e DINIZ, 1955). MAGALHÃES e cols. (1981) e SILVEIRA e cols. (1989) purificaram e caracterizaram parcialmente uma enzima “thrombin-like” dos venenos de ***Lachesis muta noctivaga*** do veneno de ***Lachesis muta muta*** respectivamente.

NAHAS e cols. em 1964 relataram que o veneno de serpentes do gênero ***Crotalus***, possui um componente “thrombin-like”. RAW e cols. em 1986 isolaram do veneno de ***Crotalus durissus terrificus*** esse componente. Essa fração possui propriedades similares a outras enzimas “thrombin-like”.

Alguns venenos podem converter a protrombina em trombina diretamente ou na presença do fator V da cascata de coagulação. A ativação da protrombina pelo veneno de ***Bothrops*** foi investigada por NAHAS e cols. (1979), que demonstraram que a atividade desses venenos não é dependente do fator V.

HOFMAN e cols. (1987 b) purificaram e caracterizaram um ativador de protrombina do veneno de *Bothrops atrox*. Trata-se de uma metaloenzima de cadeia polipeptídica única com peso molecular de aproximadamente 70 KDa.

Um ativador de fator X foi isolado do veneno de *B. jararaca* por DENSON e cols. (1970) e purificado por FURUKAWA e cols. (1977). Duas isoformas de ativadores de fator X foram separados do veneno de *B. atrox* por HOFMAN e BON (1987 a). Estes ativadores são encontrados na maioria dos venenos botrópicos e ativam o fator X na presença de fosfolípido e cálcio (ROSING e TANS, 1992).

1 . 1 . 2. COMPONENTES COM ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Os componentes de veneno envolvidos na indução de hemorragia têm recebido diferentes nomes pelos pesquisadores que os purificam, tais como, toxinas hemorrágicas, hemorraginas, princípios hemorrágicos, fatores hemorrágicos, proteases hemorrágicas ou simplesmente proteases. São metaloproteinases e representam cerca de 1% do veneno total. Agem sobre os capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente, sua ruptura.

1 . 1 . 3. TOXINAS QUE AGEM SOBRE PLAQUETAS

O veneno das serpentes contém um grande número de proteínas capazes de induzir agregação plaquetária. DAVEY e LUSCHER (1967) sugeriram que esta atividade pode resultar da ativação do fator X ou ativação da protrombina na superfície de plaquetas.

1 . 1 . 4. AÇÃO PROTEOLÍTICA

A ação proteolítica se refere a um conjunto de frações do veneno, com especificidades diversas, e que geralmente são responsáveis pelos fenômenos locais. A atuação de enzimas proteolíticas do veneno sobre substratos diversos pode causar lesão tecidual (ação direta) e provocar a liberação de substâncias dos tecidos lesados (ação indireta).

TENG e WANG, (1988), demonstraram que na patogênese do edema causado por veneno de serpente com atividade proteolítica, há participação de mastócitos e neutrófilos que liberam cininas plasmáticas, fator ativador de plaquetas (PAF) e metabólitos do ácido araquidônico que desencadeiam reações inflamatórias no local da picada.

1 . 1 . 5. NEUROTOXINAS

SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT (1938) isolaram uma toxina do veneno da cascavel sul Americana *Crotalus durissus terrificus*, denominada Crotoxina. Essa toxina

corresponde aproximadamente a 50% do peso seco do veneno e apresenta atividade neurotóxica (BRAZIL,1966), miotóxica (AZEVEDO-MARQUES,1985; CUPO,1988) e hemolítica (ROSENFELD,1971).

RUBSAMEN e cols. (1971) desdobraram a Crotoxina, através de cromatografia em Carboximetil-celulose em meio ácido, em duas frações: uma básica, de baixa toxicidade e com atividade enzimática que foi identificada como fosfolipase A₂ (enzima que catalisa a lise da ligação do ácido graxo na posição 2 nos fosfolípidos); outra ácida, sem toxicidade, sem atividade enzimática que foi denominada Crotapotina. A Crotapotina potencia a toxicidade da Fosfolipase A₂, protegendo-a da interação com sítios de baixa afinidade (JENG e cols., 1978; HENDON e TU, 1979).

BARRIO (1961) e SEKI e BARRIO (1980) isolaram, do veneno de *C. durissus*, uma glicoproteína com atividade esterásica e enzimática semelhante a trombina denominada Giroxina.

1 . 1 . 6. MIOTOXINAS

São caracterizadas por pequenos polipeptídeos básicos com nenhuma atividade enzimática ou como grandes proteínas básicas possuindo atividade fosfolipásica A₂, presentes em venenos de serpentes que induzem contratura no músculo esquelético ou produzem mionecrose ou mioglobínúria (STOCKER, 1990a).

A ação em células musculares pode ser direta, pela ação de miotoxinas afetando a integridade das membranas do músculo esquelético (QUEIROZ e cols., 1984) ou indireta através de ação isquêmica (QUEIROZ e cols., 1984).

GONÇALVES e VIEIRA em 1950, isolaram do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, uma proteína básica de peso molecular de aproximadamente 4,8 KDa, denominada Crotamina. Constituída de 42 resíduos de aminoácidos ligados por pontes dissulfeto (LAURE, 1975), é encontrada principalmente nos venenos das serpentes *Crotalus durissus* coletadas em certas regiões do Brasil, Argentina e Bolívia, com porcentagem no veneno variando muito. Essa toxina, com atividade miotóxica (CAMERON e TU, 1978) atua em fibras musculares alterando sua permeabilidade aos íons sódio, potássio e cálcio (CHEYMOL e cols., 1971), produzindo espasmos musculares em alguns animais. Em camundongos, produz paralisia das extremidades posteriores, lacrimejamento, dificuldade respiratória, convulsões e morte (LAURE, 1975).

1 . 1 . 7. PEPTÍDEOS POTENCIADORES DE BRADICININA

São peptídeos de baixo peso molecular, ricos em prolina e compostos de 5 a 12 aminoácidos, os quais potenciam a atividade da bradicinina. Esse efeito é mediado pela inibição de cininases que agem sobre a bradicinina e também pela inibição da carboxipeptidase que converte angiotensina I em angiotensina II.

FERREIRA (1965) mostrou pela primeira vez a presença de um peptídeo que potencia a ação da bradicinina em veneno de *B. jararaca*, conhecido com BPP9a. É um potente inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e produz abaixamento da pressão arterial em animais de experimentação por impedir a conversão da angiotensina I em angiotensina II.

1 . 2 . ENVENENAMENTO

A gravidade dos acidentes ofídicos depende de uma série de fatores, não se podendo concluir, a priori, suas conseqüências. Estas vão depender de elementos casuais, sobressaindo os seguintes: idade, peso e saúde geral da vítima, sítio da picada, quantidade de veneno inoculada, espécie envolvida, sensibilidade da vítima ao veneno e ao tratamento.

Devido a complexidade dos venenos, vários efeitos biológicos podem ser observados (CHIPPAUX e cols., 1991). Os venenos possuem fatores tóxicos que isolados e agindo individualmente produzem um efeito biológico particular mas quando associados podem agir sinergisticamente. Geralmente, os sinais e sintomas relatados são: edema, hemólise, choque, sangramento, insuficiência renal, mionecrose e neurotoxicidade (NELSON, 1989).

O diagnóstico dos acidentes por serpentes peçonhentas deveria ser feito, sem erro, através da identificação do animal envolvido. Como raramente se captura a serpente que causa o acidente, a identificação faz-se mediante a observação dos sintomas e sinais clínicos, mais ou menos característicos, induzidos pela inoculação de venenos dos diferentes gêneros.

No Brasil, picadas por serpentes dos gêneros **Bothrops** e **Lachesis** produzem manifestações locais como dor, inchaço, equimose e necrose (KAMIGUTI e cols., 1991) e manifestações sistêmicas como hipotensão arterial e choque. Já serpentes do gênero **Crotalus**, produzem manifestação local mínima ou nenhuma, e manifestações sistêmicas como: urina marrom, ptose palpebral, sonolência, mialgia, as quais resultam de ações neurotóxicas e miotóxicas do veneno (AZEVEDO-MARQUES e cols., 1985).

As complicações devidas às picadas por serpentes da subfamília Crotalinae, são associadas à perda de tecido local devida a necrose e insuficiência renal aguda (AMARAL e cols., 1985, 1986).

1 . 3 . SOROTERAPIA

As bases do tratamento específico dos acidentes humanos ocasionados por animais peçonhentos surgiram a partir dos trabalhos de SEWALL (1887) nos Estados Unidos ,

seguidos, logo após, pelos trabalhos de PHISALIX e BERTRAND (1894) no Museu de História Natural de Paris e de CALMETTE (1894) no Instituto Pasteur. Estes investigadores mostraram que era possível obter anticorpos contra o veneno de animais peçonhentos, assim como havia sido possível obtê-los contra as toxinas bacterianas.

Segundo revisão publicada em 1992 por HAWGOOD, VITAL BRAZIL em 1898 verificou experimentalmente que o soro antiofídico de CALMETTE não era eficaz contra as ações do veneno de algumas espécies de serpentes brasileiras. As observações de VITAL BRAZIL levaram à descoberta da especificidade da soroterapia anti-peçonhenta. Em 1898, trabalhando no Instituto Bacteriológico de São Paulo, preparou os primeiros soros de eficácia comprovada contra o veneno das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

O soro antiofídico, em largo uso hoje, é composto de anticorpos obtidos do sangue de cavalos imunizados com veneno bruto de uma ou mais espécies de serpentes. A obtenção e preparo do soro antiofídico em sua formulação final, constitui um processo elaborado que requer manipulação e processamento industrial adequado como o que vem sendo feito hoje no Brasil por três instituições oficiais: Instituto Butantan (São Paulo), Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais) e Instituto Vital Brasil (Rio de Janeiro). A disponibilidade imediata do soro antiofídico, uma situação dificultada em diversas regiões do país, principalmente na zona rural e norte do país, é fator essencial de

sucesso no tratamento do acidentado e a eficácia deste tratamento está relacionada com a escolha correta do antiveneno específico a ser empregado. A escolha deste antiveneno específico se faz possível quando a serpente envolvida no acidente é corretamente identificada. O diagnóstico do acidente, na maioria das vezes, é feito mediante a observação do quadro clínico apresentado pelo doente, porém em muitos casos esses sintomas não são claros, são duvidosos ou demorados. Como exemplo, na região Amazônica, onde serpentes dos gêneros *Lachesis* e *Bothrops* coexistem, ambos os venenos induzem os mesmos sintomas de envenenamento impossibilitando assim o diagnóstico clínico.

1 . 4 . IMUNODIAGNÓSTICO DOS ACIDENTES OFÍDICOS

O diagnóstico no envenenamento ofídico é baseado nas alterações clínico-laboratoriais apresentadas pelos pacientes e no reconhecimento do animal envolvido no acidente. Recentemente, métodos de imunodiagnósticos vêm sendo desenvolvidos apresentando-se como mais uma alternativa no diagnóstico do ofidismo, principalmente em casos onde os sintomas clínicos característicos, induzidos pelos venenos das diferentes espécies são insuficientes ou duvidosos.

A dosagem de venenos e antivenenos em líquidos orgânicos e tecidos de pacientes vítimas de acidentes por animais peçonhentos foram tentadas no início deste século

(LAMB, 1902). Estas dosagens, além de fornecerem subsídios para o esclarecimento de aspectos relacionados com os mecanismos fisiopatológicos dos envenenamentos, poderiam servir para estudar a cinética de neutralização de venenos por antivenenos específicos na corrente sangüínea. Por sua vez, os estudos da cinética de neutralização de venenos possibilitariam avaliar a eficácia da soroterapia e permitiriam verificar, de forma quantitativa, as doses de antivenenos efetivamente necessárias para o tratamento destes pacientes (GREENWOOD e WHITTLE, 1974; THEAKSTON e cols., 1977; THEAKSTON e REID, 1979; THEAKSTON, 1983; HO e cols., 1986a, MINTON, 1987).

Uma técnica ideal para dosagens de venenos e antivenenos deve ter alta sensibilidade e boa especificidade, certa rapidez, baixo custo, reprodutibilidade e utilizar equipamentos simples de modo que possa ser realizada em pequenos hospitais (THEAKSTON, 1983; HO e cols., 1986a). Entre as diversas técnicas desenvolvidas para estas dosagens destacam-se os métodos de precipitação e imunodifusão, imunofluorescência e imunohistoquímica, hemaglutinação, imunoeletroforese, radioimunoensaio e testes imunoenzimáticos (ELISA).

1 . 4 . 1 . Testes de precipitação e imunodifusão:

A precipitação desencadeada pela mistura do veneno de serpentes com antiveneno específico foi a primeira técnica utilizada na identificação de venenos. LAMB,1902,

mostrou que o antiveneno de cobra formava um precipitado na presença do veneno de cobra, mas não do veneno de *Echis carinatus* (Viper), *Hoplacephalus curtus* e *Bungarus fasciatus* (Colubrinae). Esta técnica foi empregada para detectar veneno nos tecidos de uma paciente que faleceu após acidente pela serpente *Ophiophagus hannah* (MUELING e cols., 1957). Os testes de precipitação, embora simples e baratos, são de baixa sensibilidade e pouca especificidade.

1 . 4 . 2 . Imunofluorescência e imunohistoquímica:

TIRU-CHELVAM (1972) utilizou a imunofluorescência para detectar a deposição do veneno de *B. atrox* e *C. adamanteus* nos tecidos de ratos após inoculação intraperitoneal destas peçonhas.

A técnica se mostrou sensível e específica para estudo em tecidos e o autor recomendou sua adaptação para detectar veneno no plasma e outros fluidos corporais.

SAKURAI e cols.(1986) empregaram técnicas de imunohistoquímica (peroxidase) e imunofluorescência para identificação do veneno no parênquima renal de camundongos inoculados com veneno da serpente *Agkistrodon aculatus*.

Estas técnicas, entretanto não tiveram muita aplicação clínica por serem demoradas, relativamente complexas e de custo elevado.

1 . 4 . 3 . Hemaglutinação:

A técnica de hemaglutinação passiva usando hemácias de carneiro sensibilizadas com veneno de *Crotalus viridis helleri* foi utilizada para detectar experimentalmente a presença de veneno e de antiveneno (STAVITSKY e ARQUILA, 1955; BOCHE e RUSSELL, 1968). A detecção do antiveneno foi feita diretamente pela aglutinação das hemácias de carneiro sensibilizadas. A concentração do veneno pode ser estimada indiretamente pela sua capacidade em reduzir ou impedir a aglutinação das hemácias sensibilizadas quando misturados com o antiveneno.

Esta técnica foi também capaz de detectar a presença de antiveneno no plasma de pacientes tratados com soro antiofídico.

Entretanto, apesar de ser um teste sensível e de baixo custo, a instabilidade dos conjugados limita sua utilização clínica e experimental.

1 . 4 . 4 . Imunoelektroforese:

TU e SALAFRANCA (1974) e GAWADE e GAITONDE (1980), utilizaram técnicas imunoelektroforéticas para o imunodiagnóstico e ensaios biológicos de eficácia de antivenenos. Testaram a capacidade do antiveneno monoespecífico contra *Enhydrina*

schistosa, de fabricação australiana (CSL) e indiana (HAFFKINE), em neutralizar venenos de outras espécies de serpentes marinhas.

A técnica mostrou-se pouco específica, mas pode ser utilizado em testes de eficácia de antivenenos “in vitro”, evitando-se o uso excessivo de animais para este fim (THEAKSTON, 1983).

1 . 4 . 5 . Radioimunoensaio:

A técnica de radioimunoensaio foi aplicada pela primeira vez em ofidismo por COULTER e cols. (1974), objetivando a quantificação do veneno no soro de pacientes. Este método foi originalmente utilizado em pacientes picados por serpentes australianas ***Notechis scutatus*** e ***Demansia textilis***. A sensibilidade nestes estudos foi da ordem de 15 ng/ml e as dosagens foram altamente reprodutíveis, possibilitando a sua aplicação clínica com sucesso.

A técnica também se mostrou útil na detecção de veneno no sangue, urina e tecido de pacientes picados por serpentes (SUTHERLAND e cols., 1975; SUTHERLAND e COULTER, 1977).

Embora seja a técnica mais sensível para detecção de venenos e antivenenos nos fluidos corporais e tecidos, ela requer equipamentos de alto custo, pessoal qualificado na manipulação de radioisótopos e leva em média 24 horas para ser executada. Estes

fatores, associados à curta meia vida do ^{125}I tornaram inviável a utilização da técnica em estudos clínicos e epidemiológicos.

1 . 4 . 6 . Teste imunoenzimático (ELISA):

A técnica de ELISA tem sido amplamente utilizada, desde sua introdução por ENGVALL (1971), por se tratar de um método simples, econômico e sensível para determinar macromoléculas qualitativa e quantitativamente.

THEAKSTON e cols. (1977) foram os primeiros a aplicar a técnica de ELISA para detecção de antígenos e anticorpos contra veneno de serpentes. Utilizaram o método “duplo sanduíche” para detecção de antígenos do veneno e o método indireto para detecção de anticorpos específicos contra o veneno (VOLLER e cols., 1979).

Esta técnica foi primeiramente utilizada em pacientes nigerianos picados por ***Echis carinatus***. Dessa forma, foi possível a quantificação de veneno em amostras de sangue, soro aspirado no local da picada e urina; ainda sendo possível o acompanhamento desses níveis durante a evolução do paciente e o efeito da soroterapia nesses níveis.

A redução do tempo de execução da técnica de ELISA pode ser conseguida através da otimização dos reagentes sem que isto prejudique a sensibilidade do teste. THEAKSTON e cols. (1983) reduziram o tempo do teste para 3 horas. DHALIWAL e cols. (1983) reduziu o teste para 35 a 45 minutos, detectando em soro de pacientes

15,6ng/ml e 7,8ng/ml de veneno das serpentes *Agkistrodon rhodostoma* e *Naja naja* respectivamente.

LABROUSSE e cols. (1988) descreveram um teste ELISA rápido e sensível para detecção experimental da peçonha de *Vipera ammodytes*. Os resultados podem ser obtidos em 15 minutos e pode-se detectar 5 ng de veneno por mililitro de soro. Entretanto observou-se uma reatividade cruzada, impossibilitando o uso desta técnica em países onde serpentes de diferentes gêneros coexistem na mesma área. COX e cols. (1992) descreveram um novo método de ELISA o qual identifica corretamente veneno de 5 gêneros de serpentes medicamente importantes da Austrália.

Esta técnica, pela simplicidade de execução e por apresentar boa sensibilidade e especificidade, passou a ser amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos de acidentes ofídicos e em estudos da eficácia de antivenenos em acidentes por serpentes peçonhentas (COULTER e cols., 1980; SILAMUT e cols., 1987; THAN e cols., 1987; THEAKSTON, 1989; BARRAL-NETTO e cols., 1990; CHAVEZ-OLORTEGUI e cols., 1993).

HO e cols (1986a) analisaram criticamente os trabalhos nos quais esta técnica foi utilizada para imunodiagnóstico de acidentes ofídicos, e assinalaram alguns aspectos que deveriam ser equacionados antes que a mesma fosse aplicada às investigações clínicas e epidemiológicas. Entre estes destacaram: a) as reações cruzadas e as reações não específicas como sendo capazes de produzir resultados falso positivos,

afetando desta forma a sensibilidade do método; b) embora estáveis, a qualidade dos reagentes empregados poderia afetar tanto a sensibilidade quanto a especificidade; c) a falta e determinação do “cut-off”, ou seja o limite entre o teste positivo e teste negativo utilizando número apropriado de pacientes controles “normais”; d) a sensibilidade e a especificidade do método deveriam ser previamente determinados nos estudos imunodiagnósticos, assim como os valores preditivos, nos casos de inquéritos soropidemiológicos; e) na detecção de anticorpos, a possibilidade de reação não específica e de reação cruzada é muito maior do que na determinação do antígeno (veneno).

Entretanto, a técnica de ELISA se presta ao estudo da eficácia de antivenenos nos pacientes acidentados desde que se conheçam os níveis de antivenenos antes da sua administração (zero do antiveneno), servindo o paciente como seu próprio controle.

Neste trabalho, descreveremos métodos imunodiagnósticos capazes de identificar, quantificar e diferenciar os venenos e antivenenos em soro de pacientes acidentados por serpentes das espécies ***Bothrops atrox*** e ***Lachesis muta muta*** (causam a maioria dos acidentes na região norte do País) e dos gêneros ***Bothrops*** e ***Crotalus*** (causam a maior parte dos acidentes na região sudeste do que em outras regiões do

país) além dos componentes crotamina e crotoxina presentes no veneno da espécie ***Crotalus durissus***.

2 . OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Desenvolvimento de métodos de imunodiagnóstico capazes de identificar, diferenciar e quantificar venenos e antivenenos em soros de humanos acidentados por picadas de serpentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desenvolver um método de ELISA Sanduíche capaz de identificar e diferenciar os venenos de ***Bothrops atrox*** e ***Lachesis muta muta***.
 - Desenvolver um método de ELISA Sanduíche capaz de identificar e diferenciar os venenos de ***Crotalus*** e ***Bothrops spp.***
 - Identificar componentes (Crotoxina e Crotamina) do veneno de ***Crotalus durissus terrificus*** em soro de animais de experimentação e pacientes acidentados por cascavel.
 - Desenvolver um método de ELISA direto para identificar e quantificar antivenenos em soros de pacientes submetidos a soroterapia após acidente por picada de serpentes.
 - Desenvolver um método de ELISA Sanduíche para identificar veneno de ***Crotalus durissus terrificus*** crotamino positivo e crotamino negativo.
-

3 . MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Utilizou-se camundongos fêmeas (18 - 22g) da raça CF₁ e coelhos adultos fêmeas da raça New Zealand (2.0 - 2.5 Kg), mantidos no biotério da Fundação Ezequiel Dias Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Utilizaram-se cavalos para a obtenção de plasma hiperimune produzido pela Fundação Ezequiel Dias. Esses cavalos imunizados são mantidos na Fazenda Experimental São Judas Tadeu, no município de Betim, Minas Gerais.

3.2. Venenos

Os venenos foram obtidos de serpentes adultas *Crotalus durissus*, *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, provenientes da região de Minas Gerais, Brasil e *B. atrox* e *Lachesis muta muta*, provenientes da represa de Balbina, Manaus, AM, Brasil.

As serpentes foram mantidas em caixas individuais no Serpentário da FUNED.

Para coleta do veneno, as serpentes foram anestesiadas em caixas de plástico e mantidas a 2°C em atmosfera de CO₂ produzida pela evaporação de gelo seco. O

veneno é obtido por compressão manual das glândulas: este é coletado individualmente, liofilizado e estocado a -20°C até sua utilização.

As serpentes do gênero ***Bothrops*** que formam parte da mistura de venenos, (***Bothrops alternatus*** (10%), ***B. jararaca*** (40%), ***B. jararacussu*** (13%), ***B. moojeni*** (14%), ***B. neuwiedi*** (10%) e ***B. atrox*** (13%), utilizados como imunógeno para produção do soro anti-botrópico pela FUNED, será denominado em nosso trabalho como veneno de ***Bothrops spp.***

3 . 2 . 1 . Purificação da Crotamina e Crotoxina do veneno total de ***Crotalus durissus terrificus***:

A Crotamina e Crotoxina utilizadas neste trabalho foram fracionadas por cromatografia de filtração molecular utilizando duas colunas Sephadex G-75 em série, a partir do veneno total de ***Crotalus durissus terrificus*** crotamino positivo, de acordo com procedimentos descritos por SLOTTA E FRAENKEL-CONRAT, 1938 e modificado por SEKI e cols., 1980.

O veneno total é solubilizado em tampão de equilíbrio formiato de amônio 50 mM, pH 3.5 e centrifugado à 4.000 rpm (centrífuga Beckman/ Microfuge 11) por 10 minutos para remoção de partículas insolúveis. Logo após, a concentração de proteínas do sobrenadante foi estimada pelo método de LOWRY e cols., 1951. O veneno foi aplicado às colunas sob fluxo de 15 ml/hora coletando-se amostras de 5ml/tubo e

após a estimativa da concentração de proteínas, as frações foram testadas quanto as atividades fosfolipásicas, miotóxicas e identificadas.

3 . 3 . Antivenenos

3 . 3 . 1 . Antiveneno anti-botrópico, anti-crotálico, anti-laquétrico e anti-*B.*

***atrox*:**

Plasmas hiperimunes de cavalos imunizados com os respectivos venenos, seguindo esquemas de imunização recomendados pela Comissão de Padronização de Venenos e Antivenenos das Instituições Produtoras de Antiveneno em novembro de 1992, foram obtidos da Divisão de Produção de Soros e Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias.

3 . 3 . 1 . 1 . Purificação de imunoglobulinas sem reatividade cruzada

entre os venenos de *B. atrox* e *L. muta muta*:

Como anticorpos anti-*B. atrox* e anti *L. muta muta* apresentaram reatividade cruzada com ambos venenos, a nossa próxima etapa foi fracionar essa população de anticorpos responsáveis por essa reatividade. Para essa finalidade duas colunas de afinidades, diferentes, foram preparadas por conjugação de cada veneno com Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (CNBr). As condições da ligação

covalente dos venenos à matriz de Sepharose ativada foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Pharmacia).

Assim, um grama de Sepharose ativada foi incubada durante a noite à 4°C com 10 mg de cada veneno (***B. atrox*** e ***L. muta muta***) em tampão de acoplamento, bicarbonato de sódio (100 mM, 50 mM de NaCl, pH 9.6), mantido sob agitação durante 24 horas à 4°C. O veneno não ligado foi retirado pela lavagem da resina com o tampão de acoplamento e os possíveis sítios ativos não ocupados foram bloqueados com tampão glicina (200 mM, 500 mM NaCl, pH 8.0) mantido sob agitação por 2 horas à 25°C. Cada Sepharose -veneno foi empacotada utilizando colunas de 6 ml e equilibrada com PBS (50 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4).

Para purificar anticorpos que regem especificamente com cada um dos venenos, imunoglobulinas (anti-***B. atrox*** ou anti-***L. muta muta***) obtidas em Sepharose-Proteína A (fracionamento realizado de acordo com procedimentos descritos por EY e cols., 1978) foram aplicadas à coluna de imunoafinidade. Aproximadamente 40 mg de anticorpos anti-***B. atrox*** foi primeiro aplicado à coluna Sepharose-veneno de ***L. muta muta***. As imunoglobulinas foram deixadas em contato com o gel durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio - PBS (50 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4) até que a absorbância 280 nm retorne a linha de base. A primeira fração de IgGs não retidas na coluna foram coletadas, concentradas e aplicadas agora na segunda coluna - Sepharose-Veneno ***B. atrox***. As frações de imunoglobulinas não

retidas nesta última coluna foram eluídas com tampão de equilíbrio, representando as IgGs responsáveis pela reatividade cruzada. Já a segunda fração de imunoglobulinas que se ligaram à coluna, ou seja, aquelas que reagem somente com o veneno de **B. atrox**, foram eluídas com tampão glicina-HCl (100 mM, 150 mM NaCl, pH 2.8), imediatamente neutralizadas com hidróxido de sódio 1M, dialisadas e concentradas no sistema Amicon (a GRACE company - 8400). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY e cols. (1951) utilizando soro albumina bovina como padrão. Ao final, obteve-se IgGs que reconhecem com especificidade apenas ao veneno de **B. atrox**.

As IgGs de cavalo anti-veneno de **L. muta muta** obtidas por cromatografia em Sepharose-Proteína A, foram fracionadas em colunas Sepharose-veneno de **B. atrox** e após Sepharose-veneno **L. muta muta**, utilizando o mesmo procedimento descrito acima. Ao final do processo, obteve-se IgGs que reconhecem com especificidade apenas ao veneno de **L. muta muta**.

3 . 3 . 1 . 2 . Purificação de IgGs sem reatividade cruzada entre os venenos de *Bothrops spp* e *Crotalus*:

Para purificação destas imunoglobulinas específicas para cada veneno, utilizou-se o mesmo protocolo descrito no item 3.3.2, obtendo-se ao final do processo IgGs que reconhecem somente o veneno de *Bothrops spp* ou *Crotalus*.

3 . 3 . 2 . Obtenção de anticorpos anti-crotamina:

Para obtenção de anticorpo anti-crotamina, um coelho fêmea foi imunizado com crotamina, seguindo o seguinte esquema de imunização: dose inicial foi de 50µg de crotamina dissolvida em 0,5 ml de PBS emulsificado em 1,5 ml de adjuvante completo de freund (Sigma). O material foi inoculado subcutaneamente em quatro sítios no dorso do animal. Mais quatro doses de 75, 75, 75 e 100 µg da fração crotamina em adjuvante incompleto de freund (Sigma), foram administradas num intervalo de 2, 3, 3 e 4 semanas respectivamente.

A sangria para obtenção do soro foi realizada uma semana após a quinta dose, por punção da veia lateral da orelha.

3 . 3 . 2 . 1 . Purificação de Imunoglobulinas do isotipo IgG anti-crotamina:

Coluna de afinidade contendo crotamina de *Crotalus durissus terrificus* acoplada à Sepharose-CNBR, foi preparada de acordo com instruções do fabricante.

A fração de IgG anti-crotamina foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-crotamina. Amostra de IgG de coelho anti-crotamina (50 mg) foi aplicada na coluna Sepharose-crotamina sob fluxo de 10 ml/hora. A coluna foi lavada com PBS até que absorvância a 280 nm do efluente retorne a linha de base. O primeiro pico que não se ligou à coluna foi coletado, liofilizado e estocado. O material ligado à coluna foi eluído com solução glicina-HCl 100 mM, 150 mM NaCl (pH 2.8), imediatamente neutralizado com hidróxido de sódio 1 M, dialisado em tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH 8.0) e liofilizado. Após solubilização em PBS, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY e cols., 1951.

3 . 3 . 3 . Obtenção de IgG F(ab')₂ anti- crotolina:

Plasma de cavalos anti-veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido da Divisão de Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias. Durante o processamento deste plasma para produção do soro anti-crotálico, é feito um tratamento enzimático com pepsina para obtenção de fragmentos F(ab')₂ de IgG. Porém, uma significativa porcentagem do plasma ainda mantém IgG não clivadas pela pepsina (IgG total). Para obtenção de IgG F(ab')₂ sem contaminante de IgG total, este plasma foi fracionado por cromatografia de imunoafinidade em coluna Sepharose-Proteína A seguindo a metodologia descrita por EY e cols. (1978).

3 . 3 . 3 . 1 . Purificação de IgG F(ab')₂ anti-crotoxina:

Coluna de afinidade Sepharose-crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* foi preparada de acordo com instruções do fabricante.

Uma amostra da fração IgG F(ab')₂ anti-veneno total (aproximadamente 100 mg) foi aplicada à coluna Sepharose-crotoxina, sob fluxo de 10 ml/hora. A coluna foi lavada com PBS até que absorvância a 280 nm do efluente retorne a linha de base. A primeira fração que não se ligou à coluna foi coletado, liofilizado e estocado. O material ligado à coluna contendo fração IgG F(ab')₂ anti-crotoxina, foi eluído com glicina-HCl coletando-se frações de 2 ml que foram imediatamente neutralizadas com hidróxido de sódio 1 M, dialisadas e liofilizadas para utilização nos testes de ELISA.

3 . 4 . ELISA - para detectar anticorpos antivenenos:

ELISA para detectar anticorpos foi realizada utilizando-se o procedimento descrito por ENGVALL e PERLMANN (1971).

Duas microplacas HEMOBAG, 96 cavidades (Ribeirão Preto/SP - Brasil), foram sensibilizadas com 100µl/cavidade (volume padrão) de uma solução : 20µg/ml de veneno total das serpentes em tampão carbonato de sódio (pH 9.6) por uma noite à 4°C. As placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (Tween 0.05%, 150mM de NaCl - SL), e bloqueadas com caseína 2% em PBS (Solução de bloqueio = SB) e incubadas durante 1 hora à 25°C. Após lavagem com SL, adicionou-se imunoglobulinas G não relacionadas entre veneno de *B. atrox* e *L. muta muta* ;

Crotalus e ***Bothrops spp.*** Estas IgGs foram adicionadas em diluição apropriada em tampão de incubação (caseína 0,25%, tween 0,05% em PBS - Tampão de Incubação = TI). As placas foram incubadas por 1 hora a 25°C e logo a seguir, lavadas 6 vezes com SL. Peroxidase acoplada a anti-IgG de cavalo (Sigma diluída 1:1500 em TI) foram adicionadas às placas como segundo anticorpo e incubadas por 1h a 25°C. As placas foram lavadas e a atividade enzimática foi revelada usando-se a solução substrato - ortofenilenodiamino (OPD) 0,33 mg/ml em tampão citrato pH 5.2, na presença de 0,04% de água oxigenada. Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 20µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras de absorbância foram feitas a 492 nm utilizando um leitor de ELISA (Titertek Multiskan).

3 . 5 . ELISA para determinar anticorpos antivenenos em soros de pacientes acidentados:

As placas foram sensibilizadas por uma noite à 4°C com soluções contendo os diferentes venenos de ***B. atrox***; ***L. muta muta***; ***Crotalus***; ***Bothrops spp*** (5µg/ml) em tampão carbonato(pH 9.6).

As placas foram lavadas com SL e a solução de bloqueio foi adicionada por 1 hora a 25°C e então lavadas duas vezes. Diluição apropriada de soro humano 1:200 em TI foi adicionada às placas e incubadas por 1 hora a 25°C. Após lavagem, IgG anti-IgG de

cavalo-peroxidase (Sigma, diluída 1:1000 em TI) foi adicionada por 1 hora a 25°C. As placas foram lavadas e a solução de substrato adicionada segundo procedimentos descritos anteriormente.

3 . 6 . Preparação e titulação dos conjugados:

3 . 6 . 1 . Preparação:

Imunoglobulinas antiveneno de cavalo específicas de ***B. atrox*** e ***L. muta muta***; ***Crotalus*** e ***Bothrops spp***; IgG F(ab')₂ de cavalo anti-crotoxina e IgG de coelho anti-crotamina, foram conjugadas, independentemente, à peroxidase de acordo com o método de NAKANE e KAWOI (1974).

A enzima peroxidase foi dissolvida em água destilada (5 mg em 1 ml de água). Adicionou-se 400µl da solução de periodato de sódio 100 mM. Após diálise em tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 9.5), esta solução foi incubada sob agitação com 10 mg de IgG ou IgG F(ab')₂ antiveneno específico, durante 3 horas à 25°C. Acrescentou-se, posteriormente, 200µl da solução de boridreto de sódio (4 mg/ml). Após incubação de 3 horas à 4°C, este complexo foi dialisado em tampão borato de

sódio 100 mM (pH 7,4) e adicionou-se 60% de seu volume total em glicerol. Alíquotas do conjugado foram estocadas a -20°C.

3 . 6 . 2 . Titulação dos conjugados:

Placas HEMOBAG 96 cavidades, foram sensibilizadas com 100µl/cavidade com uma solução de veneno total ou frações, numa diluição seriada (1 a 0,078µg/ml) em tampão carbonato de sódio (pH 9,6), por uma noite à 4°C. Depois de bloqueadas por 1 hora à 37°C para ***B. atrox*** e ***L. muta muta*** e 1 hora a 25°C para os demais, e lavadas, foram adicionadas às placas (100µl/cavidade) diferentes concentrações dos conjugados, em TI, por 1 hora à 37°C para HRP-IgG-anti-***B. atrox*** e HRP-IgG-anti-***L. muta muta*** e os demais conjugados por 1 hora a 25°C. As placas foram lavadas e a solução de substrato adicionada segundo procedimentos descritos anteriormente.

3 . 7 . ELISA Sanduíche para determinar e diferenciar antígenos circulantes dos venenos das serpentes *B. atrox* ou *L. muta muta*, em soros de pacientes acidentados:

Microplacas HEMOBAG foram sensibilizadas (100µl/cavidade) com uma solução de 5µg/ml de IgG de cavalo com reatividade específica contra o veneno das serpentes ***B. atrox*** ou ***L. muta muta*** em tampão carbonato (pH 9,6) por 1 hora à 37°C e logo após

mantidas à 4°C por uma noite. As placas foram lavadas e bloqueadas 1 hora 37°C (depois de bloqueadas e lavadas, as placas podem ser estocadas a -20°C contendo SL). Após serem lavadas, foram adicionadas às placas 100µl/cavidade de soro diluído 1:4 em TI, e incubadas 1 hora 37°C. Os soros utilizados neste experimento são provenientes de pacientes humanos suspeitos ou acidentados por serpentes ***B. atrox*** e ***L. muta muta***, doado pelo “Hospital Universitário João de Barros Barreto”, Belém, Pará ou “Hospital de Medicina Tropical de Manaus”, Manaus, Amazônia. As placas foram novamente lavadas com SL e incubadas 1 hora 37°C com peroxidase acoplada à IgG antiveneno específica de ***B. atrox*** ou ***L. muta muta*** (diluição apropriada em TI). As placas foram lavadas e a solução substrato adicionada segundo procedimentos descritos anteriormente.

Uma curva de referência foi obtida usando-se concentrações conhecidas (1 a 0,048µg/ml) de veneno total de ***B. atrox*** e ***L. muta muta*** em soro normal, permitindo dessa forma a conversão do resultado final de absorbância para ng/ml.

3 . 8 . ELISA Sanduíche para determinar e diferenciar antígenos circulantes dos venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops spp*, *Crotalus*; e detectar crotamina e crotoxina, em soro de pacientes acidentados:

Microplacas HEMOBAG foram sensibilizadas (100 µl/cavidade), com uma solução contendo 10 µg/ml; de IgG de cavalo com reatividade específica contra o veneno das serpentes dos gêneros ***Bothrops spp*** e ***Crotalus*** e 5 µg/ml de IgG F(ab')₂ anti-crotoxina e IgG de coelho anti-crotamiana, em tampão carbonato de sódio (pH 9,6) por uma noite à 4°C. As placas foram lavadas e bloqueadas por 1 hora à 25°C. Após serem lavadas, foram adicionados às placas 100 µl/cavidade, soro diluído 1:2 em TI e incubadas por 1 hora à 25°C. Os soros utilizados nestes experimentos são provenientes de pacientes suspeitos ou acidentados por serpentes do gênero ***Crotalus***, doado pelo “Hospital de Pronto Socorro João XXIII”, Belo Horizonte, MG. As placas foram lavadas 6 vezes com SL e incubadas por 1 hora à 25°C com peroxidase acoplada à: IgG de cavalo antiveneno específica de ***Crotalus*** (1:800); ***Bothrops spp*** (1:800); IgG F(ab')₂ anti-crotoxina (1:200) e IgG de coelho anti-crotamina (1:1000). As placas foram lavadas e a solução substrato adicionada segundo procedimentos descritos anteriormente.

Uma curva de referência foi obtida usando-se concentrações conhecidas (1 a 0,048µg/ml) de veneno total ou frações, permitindo dessa forma a conversão do resultado final de absorbância para ng/ml de soro.

3 . 9 . Avaliação da especificidade dos testes de ELISA:

Grupos de 30 camundongos receberam, aleatoriamente doses não letais da peçonha, contendo 5µg de veneno total de *B. atrox*, *L. muta muta*, *Crotalus* e *Bothrops spp* em 0,1 ml de PBS e 0,1 ml de PBS como grupo controle. Uma hora após a inoculação, os soros destes camundongos foram obtidos e submetidos ao teste de ELISA Sanduíche em duas placas correspondentes a cada possível antígeno.

A natureza do antígeno circulante foi determinada pelo teste de ELISA e comparada com o veneno inoculado no camundongo correspondente.

3 . 10 . Determinação do “cut-off” dos testes de ELISA para dosagens de antígenos circulantes:

A média mais dois desvios padrão da média da absorbância do soro de 100 pacientes controles, foi definido como limite entre o teste positivo e teste negativo (“cut-off”), de acordo com o que tem sido proposto para este tipo de ensaio (THEAKSTON e cols., 1992; HO e cols., 1986b; HO e cols., 1990).

3 . 11 . Sensibilidade, especificidade, valor preditivo e prevalência do teste ELISA para dosagens de antígenos circulantes dos venenos e Crotoxina:

A sensibilidade do teste foi definida como a porcentagem de pacientes picados pelas espécies de serpentes que tiveram o exame positivo. A especificidade como a

porcentagem de controles que tiveram o exame negativo (LILIENFELD & LILIENFELD, 1980) (Quadro 2).

Quadro 2 - Sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico:

Teste	Paciente	Controle	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
	a + c	b + d	

$$\text{Sensibilidade} = a / (a + c)$$

$$\text{Especificidade} = d / (b + d)$$

Além da determinação da especificidade e sensibilidade, outro parâmetro deve ser analisado: valor preditivo (GALEN e GIAMBINO, 1975). Valor preditivo é a função da interação entre três variáveis: Prevalência, Sensibilidade e especificidade, onde:

$$\text{Prevalência} = (a + c) / (a + b + c + d)$$

$$\text{Valor Preditivo/teste Positivo} = a / (a + b)$$

$$\text{Valor Preditivo/teste Negativo} = d / (c + d)$$

3 . 12 . ELISA -Sanduíche para detectar crotamina no veneno de *Crotalus durissus terrificus*:

Microplacas HEMOBAG foram sensibilizadas por uma noite à 4°C com 100 µl/cavidade de uma solução contendo 5 µg/ml de IgG de coelho anti-crotamina em tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 9.6). As placas foram lavadas com SL, solução de bloqueio foi adicionada por 1 hora à 25°C e então lavadas. Adicionou-se às placas veneno de diferentes serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 500 ng/cavidade, por 1 hora 25°C. As placas foram lavadas seis vezes com SL e incubadas por 1 hora à 25°C com peroxidase acoplada à IgG de coelho anti-crotamina (diluição: 1:1000 em TI - 100µl/cavidade). As placas foram lavadas e solução substrato adicionada segundo procedimentos descritos anteriormente.

3 . 12 . 1 . Análises estatísticas:

Para orientar a interpretação dos resultados descritos no item 3.12, empregou-se a estatística de “Kappa” - PC - Agree (versão 2.5) APC Program for the analysis of interobserves variation - (WALTER and COOK, 1988). Este índice permite comparar, em estudos epidemiológicos ou trabalhos de laboratório, os resultados de dois testes aplicados à um mesmo indivíduo ou os resultados obtidos por dois observadores ao

examinarem um mesmo material. O índice de “Kappa” compara a concordância observada com a concordância esperada (ao acaso). Resumindo, a concordância esperada (ao acaso) para cada tabela 2 X 2 é obtida multiplicando-se os totais marginais (linha e coluna) dos quais a célula é parte, somando-se os resultados e dividindo o resultado da soma pelo quadrado do total dos testes ou leituras realizadas. A estatística “Kappa” assume probabilidades iguais de variação aleatória em cada uma das séries de leituras sendo comparadas. A equação para cálculo de “Kappa” é:

$$\text{“Kappa”} = \frac{(\text{concordância observada}) - (\text{concordância esperada})}{1 - (\text{concordância esperada})}$$

Onde a interpretação é:

Estatística de “Kappa”	Grau de concordância
< 0.00	Deficiente
0.00 - 0.20	Fraco
0.21 - 0.40	Bom
0.41 - 0.60	Moderado
0.61 - 0.80	Substancial
0.81 - 1.00	Excelente

LANDIS, J.R. and KOCH, G. G. - 1977.

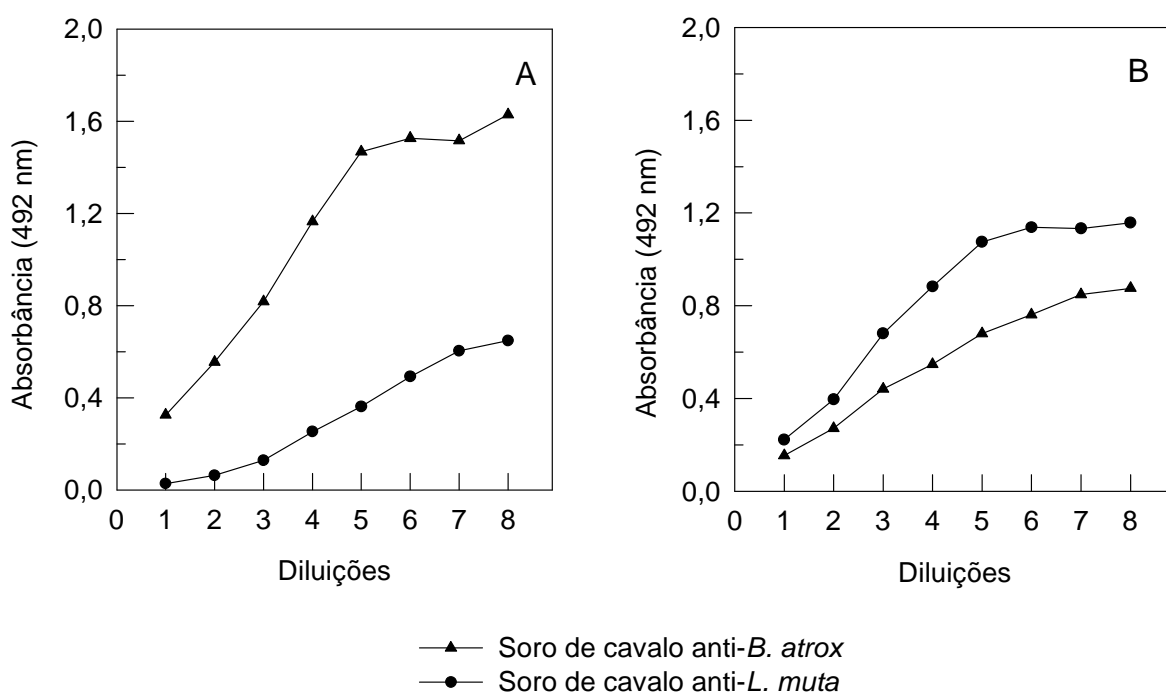
4. RESULTADOS

RESULTADOS

O veneno das serpentes brasileiras da espécie ***Bothrops atrox***, ***Lachesis muta***, ***Bothrops spp*** e ***Crotalus durissus*** apresentam antígenos comuns os quais induzem anticorpos com reação cruzada em soros de cavalos imunizados com veneno total, como mostrado por ELISA (figura 1A e 1B para ***B. atrox*** e ***L. muta***; figura 2A e 2B para ***Bothrops spp*** e ***Crotalus durissus***)

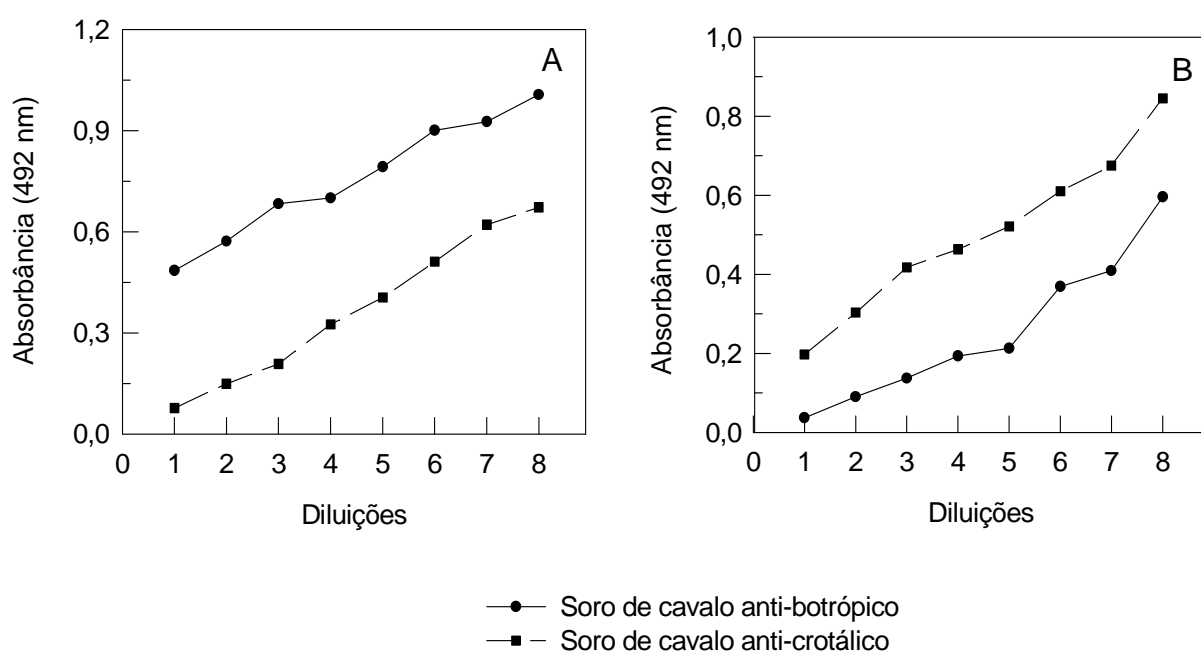
Para o desenvolvimento de um ensaio de ELISA capaz de discriminar o veneno dessas serpentes, foi necessário eliminar os anticorpos que apresentavam reatividade cruzada. Para isto, utilizou-se cromatografia de afinidade, como descrito na metodologia. Cada soro de cavalo hiperimunizado com veneno total foi aplicado a uma coluna contendo veneno imobilizado de outra serpente, removendo assim esses anticorpos de reação cruzada. Verificou-se que, depois de repetidas imunopurificações, frações de imunoglobulinas específicas para cada veneno apresentaram forte reatividade com o veneno total, mas não apresentaram reações cruzadas significativas com o outro veneno (figura 3A e 3B para ***B. atrox*** e ***L. muta***; figura 4A e 4B para ***Bothrops spp*** e ***Crotalus durissus***).

Figura 1 - Reação cruzada de anticorpos contra veneno de *B. atrox* e *L. muta muta* antes da imunopurificação:



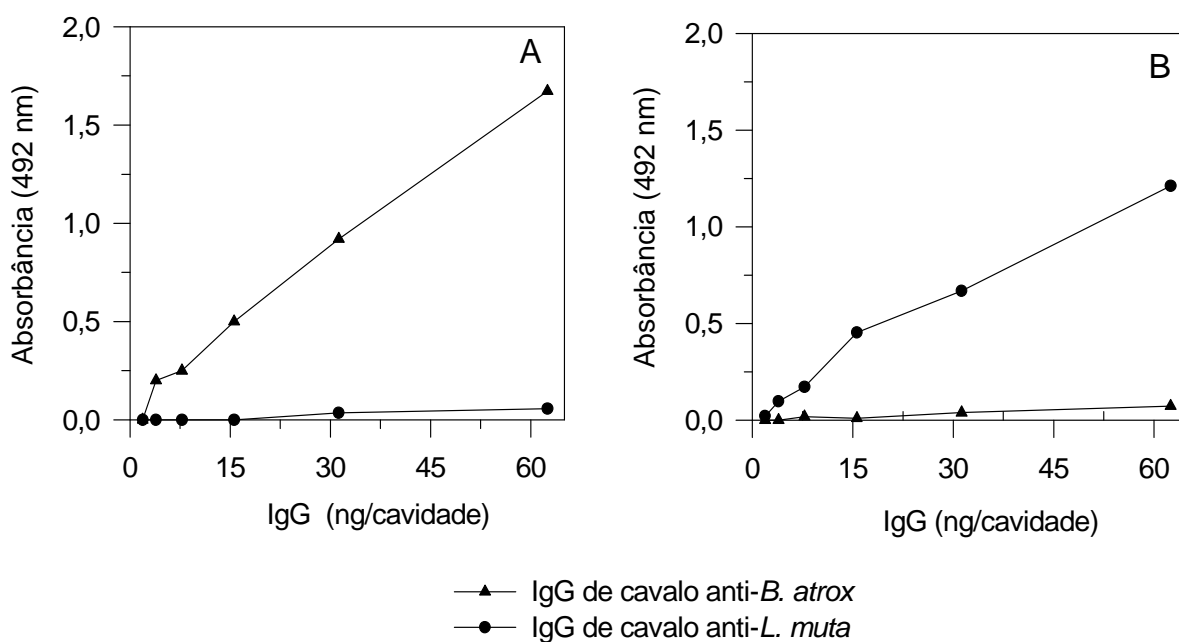
As placas foram sensibilizadas com veneno total de *B. atrox* (A) e *L. muta muta* (B). Soro de cavalo hiperimunizado foram testados nas diluições de 1:200 a 1:25.600, antes da imunopurificação por ELISA direta - condições descritas em material e métodos.

Figura 2 - Reação cruzada de anticorpos contra veneno de *Bothrops spp* e *Crotalus durissus* antes da imunopurificação:



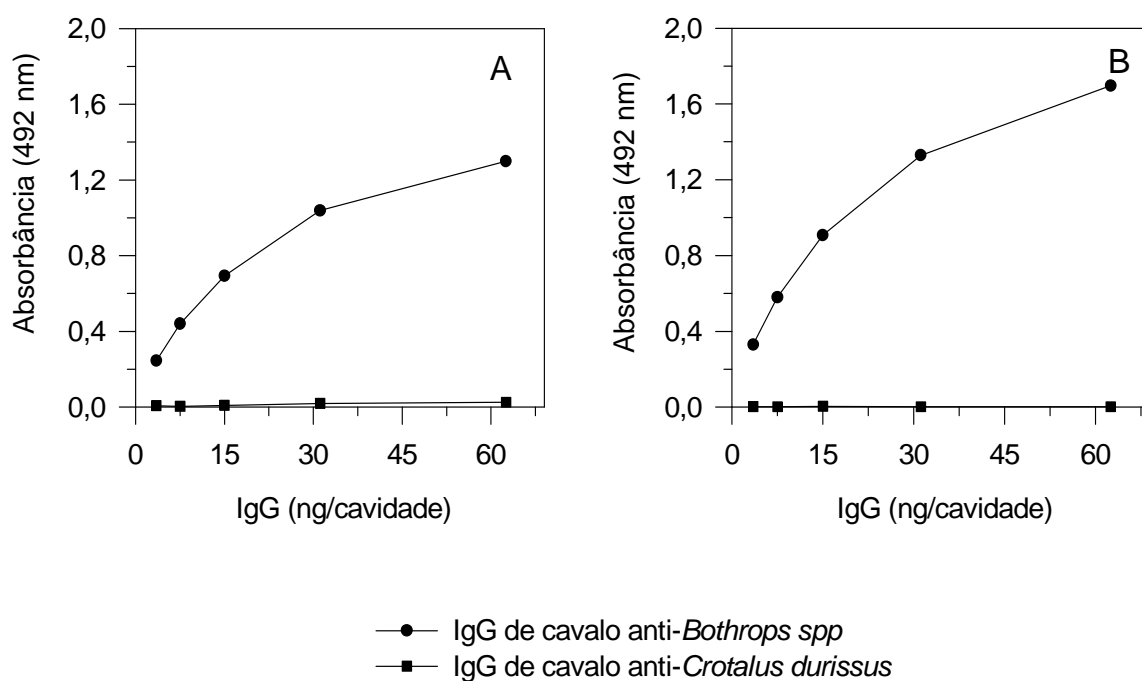
As placas foram sensibilizadas com veneno total de *Bothrops spp* (A) e *Crotalus durissus* (B). Soros de cavalos hiperimunizados foram testados nas diluições de 1:200 a 1:25.600, antes da imunopurificação por ELISA direta.

Figura 3 - Reação cruzada de anticorpos contra veneno de *B. atrox* e *L. muta muta*, após imunopurificação:



As placas foram sensibilizadas com veneno total de *B. atrox* (A) e *L. muta muta* (B). Anticorpos de cavalo hiperimunizados com veneno de *B. atrox* ou *L. muta muta*, foram adicionados após a imunopurificação - ELISA direta - condições descritas em material e métodos.

Figura 4 - Reação cruzada de anticorpos contra veneno de *Bothrops spp* e *Crotalus durissus*, após imunopurificação



As placas foram sensibilizadas com veneno total de *Bothrops spp* (A) e *Crotalus durissus* (B). Anticorpos de cavalo hiperimunizados com veneno de *Bothrops spp* ou *C. durissus*, foram adicionadas após a imunopurificação - ELISA direta

A população específica de IgG para “componentes específicos” do veneno de: **B. atrox** (IgG anti- CE de **BA**); **L. muta** (IgG anti-CE de **LM**); de **Crotalus durissus** (IgG anti- CE de **CD**) ou **Bothrops spp** (IgG anti- CE de **Bspp**) foram utilizados num ensaio de ELISA com o objetivo de observar a presença de antígenos circulantes no soro de animais inoculados experimentalmente ou em soro de pacientes acidentados. Utilizou-se também este método de ELISA para observar a presença de crotoxina e crotamina em soro de pacientes acidentados além da identificação do veneno de **Crotalus durissus terrificus** em crotamina positivo e crotamina negativo na tentativa de eliminar o teste realizado em camundongos.

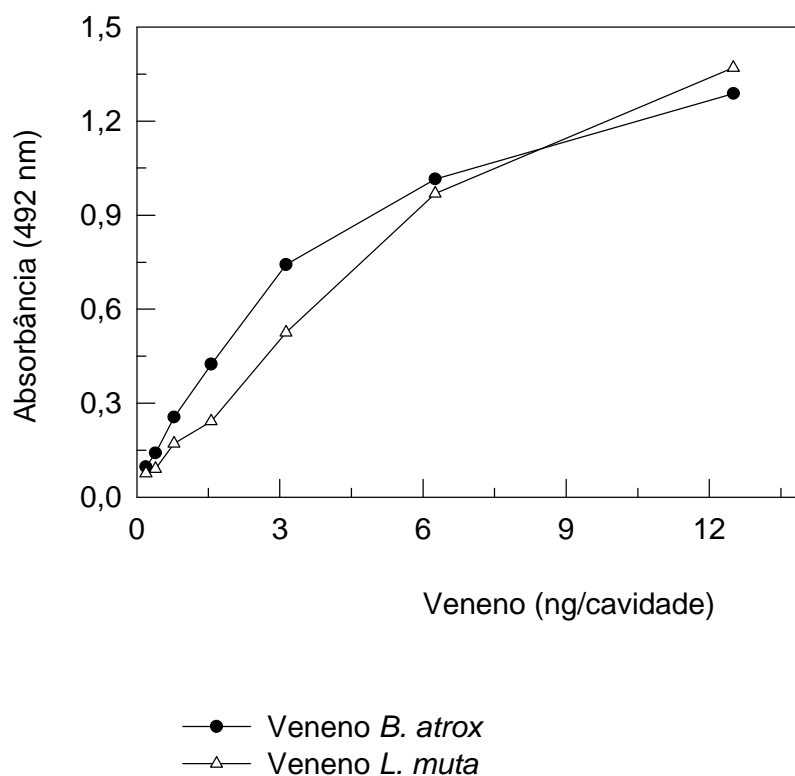
Nas condições de ELISA Sanduíche, o antígeno é capturado pelo anticorpo ligado a placa e então revelado pela adição do anticorpo homólogo acoplado à peroxidase. Imunoglobulinas de cavalo (molécula completa) contra “componentes específicos” de **B. atrox**, **L. muta**, **C. durissus** e, **Bothrops spp**, IgG de coelho (molécula completa) anti- crotamina e IgG F(ab')₂ de cavalo anti-crotoxina, conjugadas à peroxidase (HRP), foram tituladas como descrito na metodologia.

As diluições adequadas para o ELISA foram: (dados não mostrados)

- 1:800 IgG cavalo HRP anti-CE-**BA**;
- 1:200 IgG cavalo HRP anti CE-**LM**;
- 1:800 IgG cavalo HRP anti-CE-**CD**;
- 1:1000 IgG coelho HRP anti-crotamina;
- 1:200 IgG F(ab')₂ cavalo HRP anti-crotoxina.

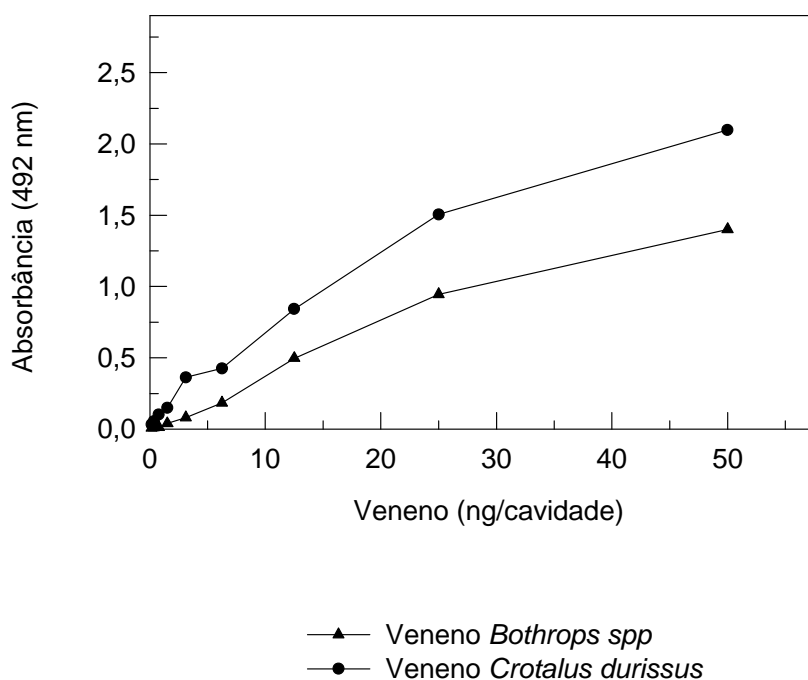
Uma vez definida a diluição adequada para se utilizar os conjugados, o próximo passo foi testar a sensibilidade do ensaio ELISA-Sanduíche para concentrações conhecidas de cada veneno:- **B. atrox**, **L. muta**, **Crotalus durissus**, **Bothrops spp** e componentes do veneno de **C. durissus terrificus**: crotamina e crotoxina. Os resultados obtidos demonstram que o teste é capaz de quantificar concentrações superiores a 1 ng/cavidade desses venenos ou componentes de maneira dose dependente (figura 5,6 e 7).

Figura 5 - ELISA Sanduíche para titulação do veneno de *B. atrox* e *L. muta muta*.



As placas foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de: *B. atrox* ou *L. muta muta* e então incubadas com diferentes diluições do antígeno. Os resultados da titulação dos antígenos de *B. atrox* (●) e *L. muta muta* (△) são mostrados no mesmo gráfico. A ligação foi revelada pela adição de HRP acoplada a IgG de cavalo anti-CE de: *B. atrox* (diluição 1:800) ou *L. muta muta* (diluição 1:200). O ensaio foi realizado como descrito em material e métodos.

Figura 6 - ELISA Sanduíche para titulação do veneno de *Bothrops spp* e *Crotalus durissus*



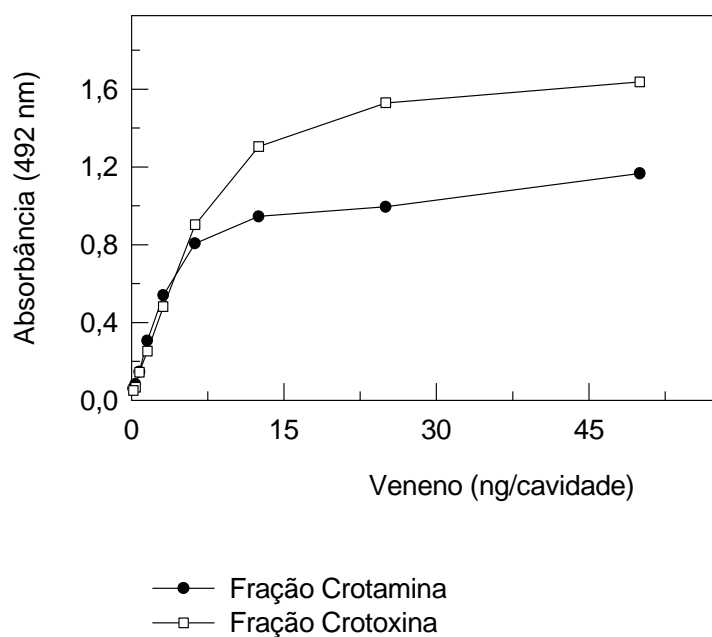
As placas foram sensibilizadas com IgG de cavalo anti-CE de: *Bothrops spp* ou *Crotalus durissus* e então incubadas com diferentes diluições do antígeno. Os resultados da titulação dos antígenos de *Bothrops spp* (●) e *C. durissus* (▲) são mostrados no mesmo gráfico. A ligação foi revelada pela adição de HRP acoplada a IgG de cavalo anti-CE de: *Bothrops atrox* (diluição 1:800) ou *C. durissus* (diluição 1:800).

Para se testar a capacidade da ELISA-Sanduíche em quantificar o nível de antígenos circulante em soro de animais, camundongos CF1 foram inoculados experimentalmente com doses subletais de cada veneno ou componente.

As figuras 8 e 9 (A e B) mostram a distribuição cinética dos diferentes venenos, onde o soro de 4 camundongos foram analisados para cada ponto da curva.

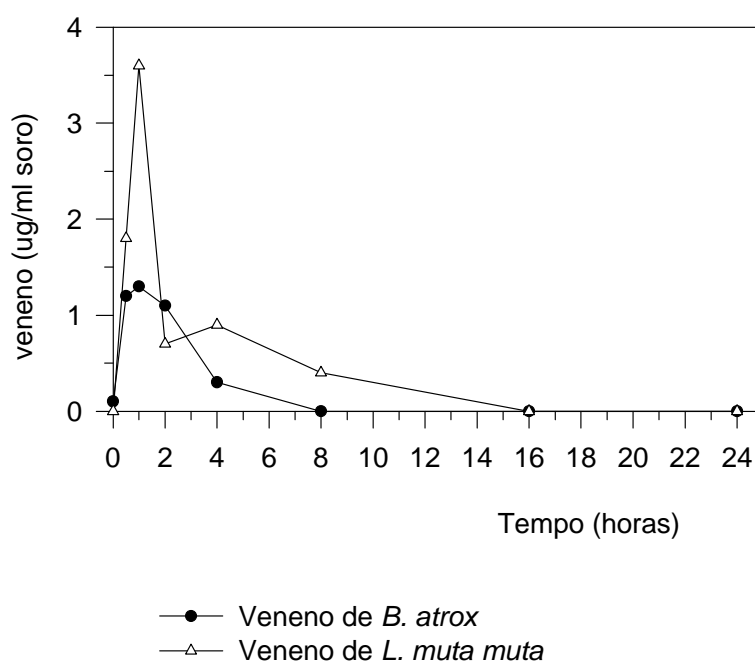
A concentração dos antígenos de ***B. atrox*** e ***L. muta*** circulantes no soro atingiu o pico máximo em 1 hora após a inoculação, decaindo a níveis não mensuráveis pelo teste após às 16 horas (figura 8). Através dessa cinética, o nível aparente de antígeno circulante de ***L. muta*** parece ser maior que em ***B. atrox***. Já as concentrações do antígeno de ***Crotalus durissus*** e ***Bothrops spp***(9A) e das frações crotamina e crotoxina de ***C. d terrificus*** (figura 9B) circulantes no soro atingiu o pico máximo em 15 minutos após a inoculação decaindo após o intervalo de 8-24 horas para crotamina e 2-4 horas para crotoxina (figura 9B)

Figura 7 - ELISA Sanduíche para titulação da Crotoxina e Crotamina do veneno de *Crotalus durissus*



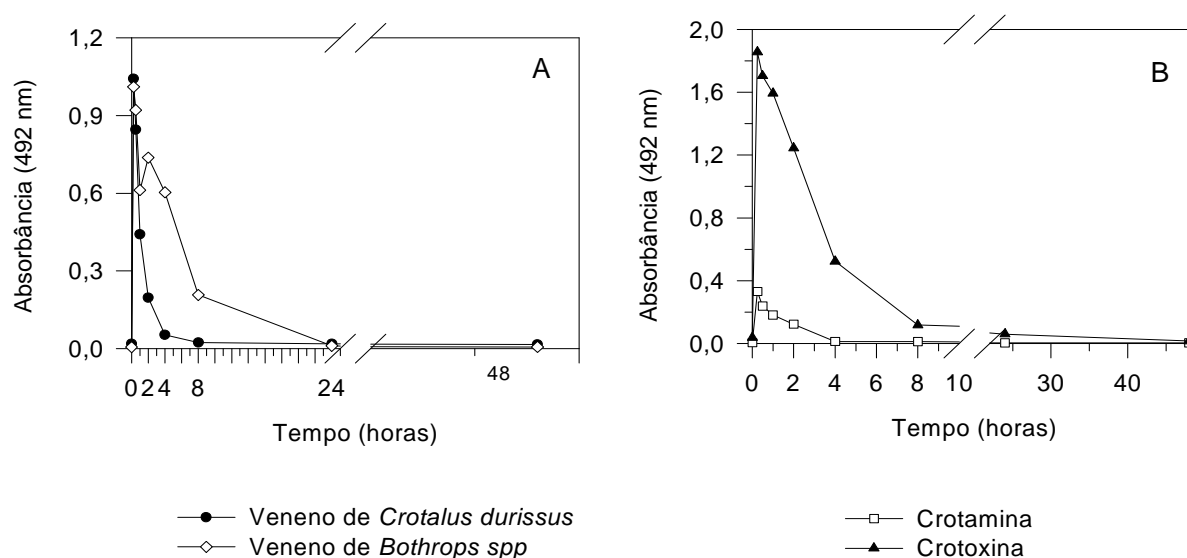
As placas foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-crotamina ou IgG F(ab')₂ de cavalo anti crotoxina e então incubadas com diferentes diluições destas frações. Os resultados da titulação de crotamina (●) e crotoxina (□) são mostrados no mesmo gráfico. A ligação foi revelada pela adição de HRP acoplada a IgG de coelho anti crotamina (diluição 1:1000) e IgG F (ab')₂ de cavalo anti crotoxina (diluição 1:200). O ensaio foi realizado como descrito em material e métodos.

Figura 8 - Cinética em camundongos inoculados com doses não letais do veneno de *B. atrox* e *L. muta muta*



Soluções de 100 μ l de PBS contendo 5 μ g do veneno de *B. atrox* e ou *L. muta muta*, foram inoculados por via subcutânea em camundongos CF1 (20g de peso). Amostras de sangue foram coletadas em intervalos de tempo por incisão da veia subclávia. O soro foi então separado do sangue total e o nível de antígeno foi analisado por ELISA Sanduíche.

Figura 9 - Cinética em camundongos inoculados com doses não letais do veneno de *Crotalus durissus*, *Bothrops spp*, crotoxina e crotamina:

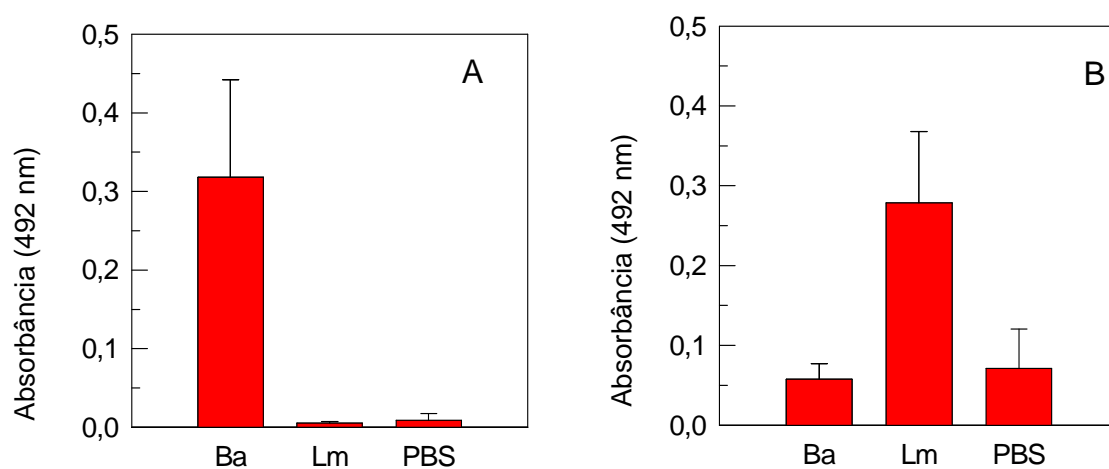


Soluções de 100 μ l de PBS contendo 5 μ g do veneno de *Crotalus durissus* ou *Bothrops spp* (A), 2,5 μ g de crotamina e crotoxina, foram inoculados por via subcutânea em camundongos CF1 (20g de peso). Amostras de sangue foram coletadas em intervalos de tempo por incisão da veia subclávia. O soro foi então separado do sangue total e o nível de antígeno foi analisado por ELISA Sanduíche.

A especificidade do teste de ELISA-Sanduiche foi verificada em dois experimentos, onde três grupos de camundongos, identificados individualmente, foram inoculados com veneno total de: 1) ***B. atrox***, ***L. muta*** e PBS (controle); 2) ***Crotalus durissus***, ***Bothrops spp*** e PBS. Amostras de soro foram obtidas uma hora após a inoculação, como descrito na metodologia e então testado por ELISA-Sanduiche. Os resultados obtidos são mostrados na figura 10 para o primeiro experimento e figura 11 para o segundo, onde cada barra representa a média (X) dos resultados encontrados em 30 camundongos, analisados individualmente.

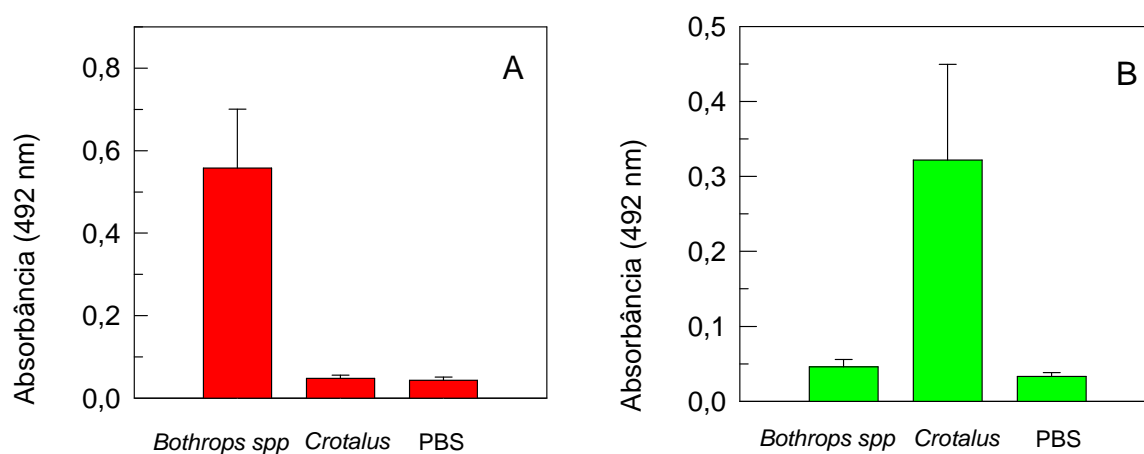
A natureza do antígeno circulante foi determinada pelo teste e comparada, posteriormente, com o veneno inoculado no camundongo correspondente (dado não mostrado). Em todas as amostras analisadas, o teste identificou corretamente o antígeno (figura 10 e 11).

Figura 10 - ELISA Sanduíche para detectar especificamente veneno de ***B. atrox*** e ***L. muta muta*** em soro de camundongos:



O soro individual de três grupos de dez camundongos inoculados com veneno de ***B. atrox***, ***L. muta muta*** ou PBS (de acordo com a metodologia), foram submetidos ao teste de ELISA Sanduíche. Placa A foi sensibilizada com IgG anti-CE de ***B. atrox*** e placa B com IgG anti-CE de ***L. muta muta***. Os resultados estão relacionados em valores de absorbância para os três diferentes experimentos. Após a determinação da natureza do antígeno circulante por ELISA, este foi comparado com o veneno inoculado no camundongo correspondente.

Figura 11 - ELISA Sanduíche para detectar veneno de *Bothrops spp* e *Crotalus durissus* em soro de camundongos:



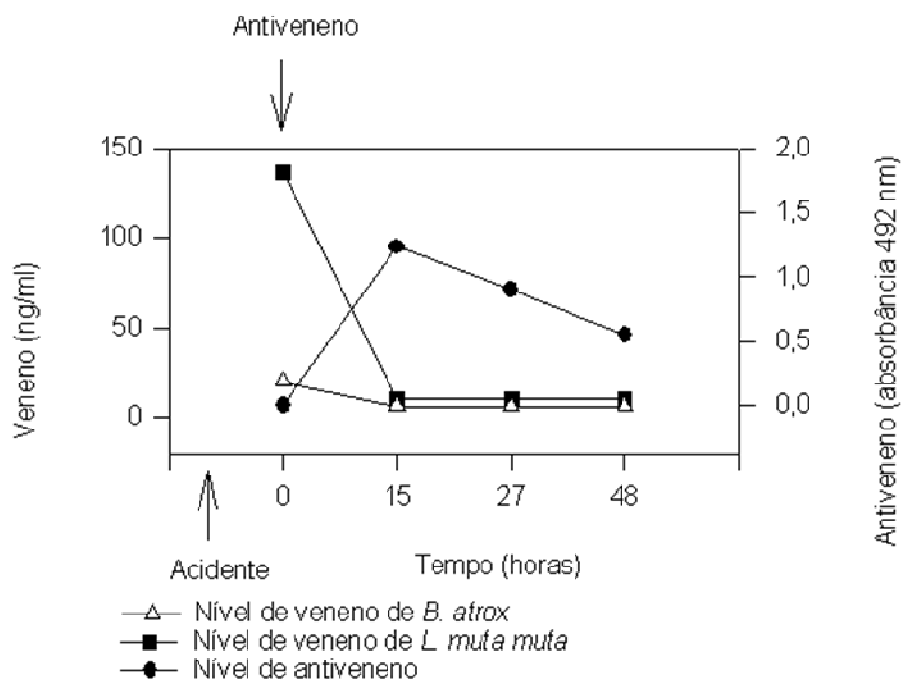
O soro individual de três grupos de dez camundongos inoculados com veneno de *Bothrops spp*, *Crotalus durissus* ou PBS (de acordo com a metodologia), foram submetidos ao teste de ELISA Sanduíche. Placa A foi sensibilizada com IgG anti-CE de *Bothrops spp* e placa B com IgG anti-CE de *C. durissus*. Os resultados estão relacionados em valores de absorbância para os três diferentes experimentos. Após a determinação da natureza do antígeno circulante por ELISA, este foi comparado com o veneno inoculado no camundongo correspondente.

Quando as placas foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de **B. atrox**., os soros dos camundongos inoculados com veneno de **B. atrox** mostraram valores de absorvância maiores que 0,3, enquanto que camundongos inoculados com veneno de **L. muta** ou PBS, apresentaram valores menores que 0,02 (figura 10A). Diferenças significativas de valores também foram obtidos em soros de camundongos inoculados com veneno de **L. muta** e testados em placas de sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de **L. muta**, embora os valores do controle tenham sido pouco maiores (figura 10B). Os mesmos resultados foram obtidos no experimento 2, onde camundongos inoculados com veneno de **Bothrops spp** mostraram valores de absorvância de 0,55, enquanto camundongos inoculados com veneno de **Crotalus durissus** ou PBS apresentaram valores menores que 0,05, quando placas foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de **Bothrops spp** (figura 11A). Quando as placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de **Crotalus durissus**, diferenças de valores também foram obtidos (figura 11B).

A utilidade do método de ELISA em casos de pessoas acidentadas por **B. atrox** ou **L. muta** foi demonstrado (figura 12) em uma pessoa picada pela serpente **L. muta muta**, hospitalizado algumas horas após o acidente. Amostras de sangue foram coletadas em diferentes intervalos de tempo antes e após a administração do antiveneno específico.

O nível de antígeno circulante e os anticorpos antiveneno (do soro de cavalo) foram determinados em cada amostra. Inicialmente, a concentração de antígeno circulante (veneno de *L. muta muta*) foi elevada (aproximadamente 130 ng/ml) decaindo para valores não mensuráveis após 15 horas. A reação cruzada do antígeno circulante com IgG anti-CE de *B. atrox* foi insignificante quando comparada com a reação deste mesmo antígeno à IgG anti-CE de *L. muta*. O nível de anticorpo de cavalo (antiveneno) também foi analisado, com valores em absorvância aumentando até atingir um pico máximo (1.386) após 15 horas, e decaindo até valores de aproximadamente 0.600 em 48 horas.

Figura12- Concentração plasmática de antígenos circulantes do veneno e antiveneno em um paciente acidentado por *Lachesis muta muta*, antes e após a soroterapia.



O nível de antígeno circulante de *B. atrox* (△) e de *L. muta muta* (■) em soro de paciente acidentado, coletado em intervalo de tempo, foram analisados por ELISA Sanduíche. Níveis de anticorpos de cavalo anti-*L. muta muta* (●) foram analisados em amostras de soro utilizando ELISA direta, onde o veneno de *L. muta muta* foi utilizada para sensibilizar as placas - como descrito em métodos.

Outros suspeitos de acidentes com serpentes, atendidos no “Hospital de Medicina Tropical de Manaus” (Manaus, AM), foram analisados pelo método de ELISA Sanduíche. Amostras de soro eram coletadas antes da administração do antiveneno (T₀) onde os resultados são mostrados na TAB. 1. Antes da utilização deste método, a maioria dos casos não eram identificados (88,5%), atualmente essa porcentagem é de aproximadamente 39,4%.

TABELA 1 - Acidentes ofídicos atendidos no “Hospital de Medicina Tropical de Manaus” no período de Janeiro/86 a Outubro/94:

Ano	Gênero da serpente				Total
	<i>Bothrops</i>	<i>Lachesis</i>	Outras	Não identificado	
1986/91 (antes ELISA)	61	06	-	519 (88,5%)	586
1992/94 (após ELISA)	183	02	03	122 (39,4%) ^A	310

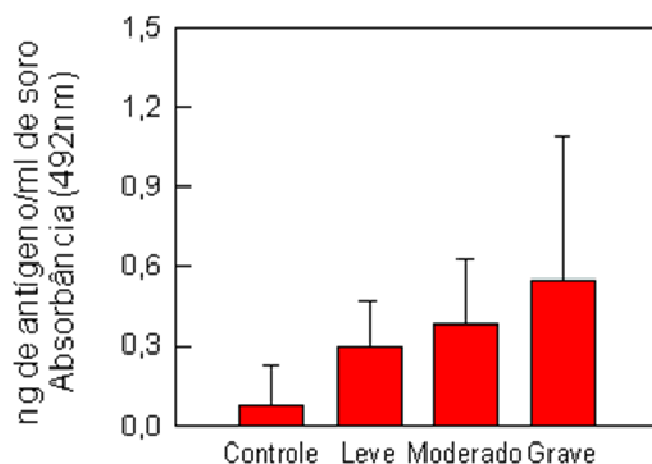
A - Antígenos de *B. atrox* ou *L. muta* não detectados por ELISA

Os soros (T₀ - amostras de soro antes da administração do antiveneno) de pacientes acidentados por serpentes admitidos no “Hospital de Medicina Tropical de Manaus”, foram analisados por ELISA Sanduíche - condições descritas em materiais e métodos.

Foram analisados também amostras de soro (T_0) de 25 pacientes acidentados por **B. atrox** (figura 13), atendidos no “Hospital Universitário João de Barros Barreto” (Belém, Pará), num tempo médio entre picada e atendimento médico de 24 horas. Os resultados obtidos são mostrados na figura 13 onde cada barra representa a média (\bar{X}) dos resultados encontrados em análise individual dos pacientes dentro da classificação do estado clínico dos mesmos: leve, moderado e grave. Pode-se observar que existe uma relação entre os níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA (absorbância) e o estado clínico desses pacientes.

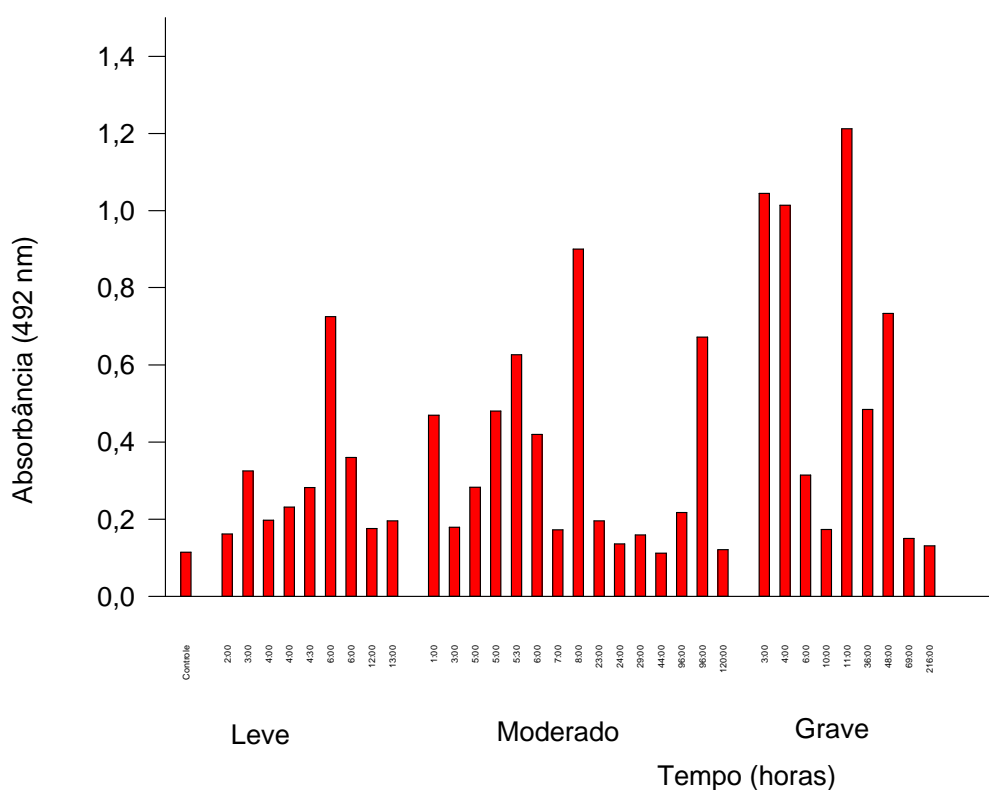
Ao analisarmos o soro desses pacientes em tempos individuais de picada e atendimento médico, observa-se que existe uma grande variação na relação do nível de antígenos circulantes medidos por ELISA (absorbância) e o estado clínico desses pacientes (figura 14).

Figura 13- Relação entre níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA em estado clínico de pacientes acidentados por *Bothrops atrox* atendidos no HUIBB, Belém, Pará, 1993:



Níveis de antígenos circulantes em soro de 25 pacientes atendidos no tempo médio entre picada e atendimento médico de 24 horas, foram analisados por ELISA Sanduíche. As placas foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de *B. atrox* - condições descritas em material e métodos.

Figura 14 - Níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA, tempo entre picada e atendimento médico e estado clínico de pacientes acidentados por *B. atrox*, atendidos no HUJBB - Belém, Pará, 1993;



Níveis de antígenos circulantes em soro de pacientes atendidos no hospital em diversos intervalos de tempo entre picada e soroterapia, foram analisados por ELISA Sanduíche. As placas foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de *B. atrox* - condições descritas em material e métodos.

Outros suspeitos de acidentes com serpentes, atendidos pelo “Hospital João XXIII” (Pronto Socorro), foram analisados pelo método ELISA - Sanduíche. Amostras de soro foram coletadas antes da administração do antiveneno (T_0) e as concentrações de antígenos circulantes são mostrados na TAB. 2. Os resultados obtidos confirmaram o diagnóstico clínico sobre o gênero das serpentes envolvidas nos acidentes. Os pacientes de números 1,2,3 e 6 foram picados por serpentes do gênero ***Crotalus*** e os números 4,5 e 8 por serpentes do gênero ***Bothrops***. Os pacientes de número 9 a 12 foram usados como controle, sendo os soros obtidos de pessoas envolvidas em outros tipos de acidentes (por exemplo: queimaduras).

O método foi demonstrado também em pacientes acidentados por ***Crotalus durissus*** atendidos no “Hospital João XXIII”(TAB. 3). Aqui foram analisados, por ELISA Sanduíche, níveis circulantes no soro (T_0) de: veneno total, crotamina e crotoxina. Pode-se observar que o antígeno total de ***Crotalus durissus*** pode ser determinado em quase todos os soros analisados, exceto os casos de número 5,15(acidentes leves) e 17 (acidente grave, seguido de óbito).

Tabela 2 - Níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA em pacientes acidentados por *Bothrops spp* ou *Crotalus durissus*, atendidos no “Hospital João XXIII”, BH, MG, 1994:

Caso	Nível de antígeno T ₀ (ng/ml)*	
	<i>Bothrops spp</i>	<i>Crotalus durissus</i>
1	-	102
2	-	155
3	-	327
4	105	-
5	85	-
6	-	185
7	-	-
8	300	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	143
13	-	379
14	-	143
15	-	1569-
16	-	327

* T₀ - Amostra de soro antes da administração do antiveneno

Foram analisados, por ELISA Sanduíche, níveis de antígenos circulantes em soros (T₀) de pacientes acidentados por serpentes atendidos no Hospital João XXIII. Os casos de números 9 a 11 são utilizados como controle (pacientes admitidos no hospital envolvido em outros tipos de acidentes).

Tabela 3 - Dados clínicos, doses de SAC e níveis circulantes no soro ,medidos por ELISA, de: veneno total, crotamina, crotoxina em pacientes acidentados por ***Crotalus durissus*** , atendidos no Hospital João XXIII - BH - MG, 1994:

Caso	idade/ sexo	ident.	Sintomas	Tempo entre picada e sorot. (horas)	Dose de SAC (ml)	Gravidade	Antígeno Crotoxina (ng/ml)	Antígeno Crotamina	Veneno total (ng/ml)
1	27/M	+	-	3:00	150	Leve	80	+	327
2	32/M	-	+	1:00	150	Leve	0	-	141
3	33/F	-	+	4:00	200	Moderado	31	-	97
4	38/M	-	+	4:00	100	Moderado	ND	-	51
5	22/M	+	-	2:00	100	Leve	0	-	0
6	38/M	-	+	2:50	100	Moderado	74	+	101
7	16/M	+	-	4:00	100	Leve	21	+	57
8	22/M	-	+	5:00	200	Moderado	32	-	102
9	19/M	-	+	2:00	100	Moderado	64	+	167
10	15/M	-	+	7:00	200	Grave	58	-	185
11	53/M	+	+	2:00	150	Moderado	39	+	83
12	28/M	-	+	7:00	100	Moderado	0	-	77
13	26/M	-	+	3:00	200	Grave	34	+	139
14	14/M	-	-	5:00	200	Moderado	37	-	102
15	39/M	+	-	6:00	100	Leve	0	-	0
16	11/M	-	+	1:50	100	Moderado	ND	-	330
17	27/M	-	+	56:00	200	Grave	0	-	0
18	11/M	-	+	2:50	200	Moderado	60	+	168
19	13/F	-	-	3:00	200	Moderado	29	+	58

Foram analisados, por ELISA Sanduíche, níveis de antígenos circulantes no soro de: veneno total, crotamina e crotoxina, em pacientes acidentados por ***C. durissus*** . As placas foram sensibilizadas com IgG cavalo anti-CE de ***C. durissus*** , IgG coelho

anti-crotamina e IgG F(ab')₂ cavalo anti-crotoxina - condições descritas na metodologia.

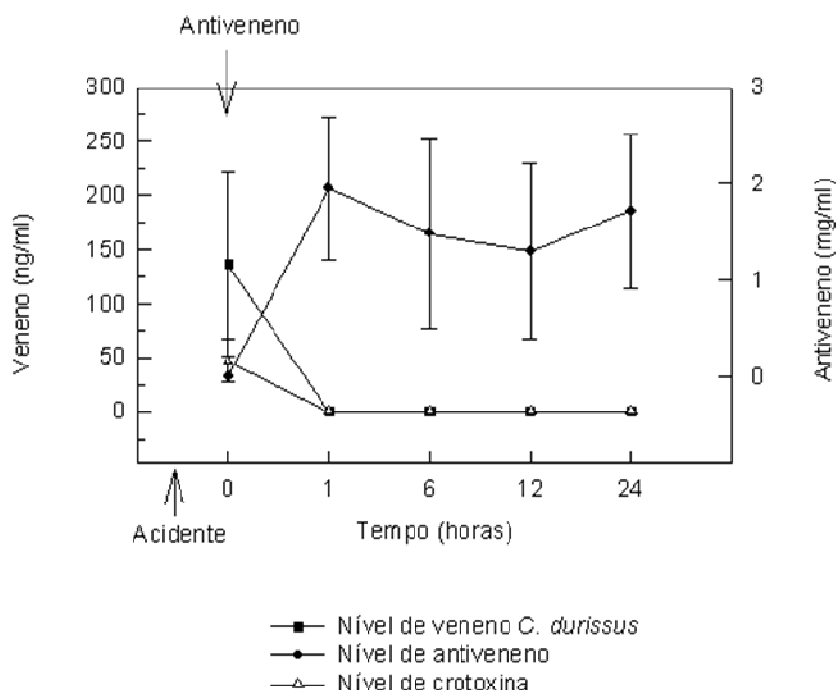
A crotoxina também foi determinada em quase todos os casos , apresentando aproximadamente a metade da concentração do antígeno total, exceto os de número 2,5,12,15,17 e 4 e 16 não puderam ser determinados, pois não havia amostra de soro suficiente. Já a crotamina foi analisada em todos os casos, onde a presença ou não dessa fração parece não estar relacionada ao estado clínico dos pacientes.

Na figura 15 é mostrada a concentração plasmática dos antígenos tóxicos circulantes do veneno e antiveneno de 16 dos pacientes citados na TAB. 3. Amostras de sangue foram coletadas em diferentes intervalos de tempo antes e após a administração do antiveneno específico. O nível de antígenos circulante e anticorpos antiveneno (do soro de cavalo) foram determinados em cada amostra. Inicialmente a concentração de antígeno circulante (veneno de *Crotalus durissus*) foi alta (aproximadamente 136 ng/ml) e crotoxina aproximadamente 46 ng/ml, decaindo a valores não mensuráveis nas primeiras horas. O nível de anticorpos de cavalo foi analisado apresentando concentrações de 2,0 mg/ml (pico máximo) e mantendo-se alto até às 24 horas.

Foi possível a redução do teste de ELISA Sanduíche que era realizado em 2 horas e 30 minutos para 1 hora e 30 minutos. Os resultados são mostrados na FIG. 16.

Figura 15- Concentração plasmática de antígenos tóxicos do veneno e antiveneno em soro de pacientes acidentados por *Crotalus durissus*, antes e após a soroterapia.

Figura 15 - Concentração plasmática de antígenos tóxicos do veneno e antiveneno em pacientes por *Crotalus durissus*, antes e após soroterapia



O nível de antígeno circulante de *Crotalus durissus* (■) e crotoxina (△) em soros de pacientes acidentados, coletados em intervalo de tempo, foram analisados por ELISA Sanduíche. Níveis de anticorpos de cavalo anti-crotálico (●) foram também analisados utilizando ELISA direta, onde o veneno de *C. durissus* foi utilizado para sensibilizar as placas - como descrito em material e métodos.

O método de ELISA-Sanduiche, foi utilizado para identificar o veneno de **C. durissus** em crotamina positivo e crotamina negativo na tentativa de eliminar o teste realizado em camundongos.

A análise foi feita utilizando o índice de “Kappa” dos dados relacionados na TAB. 4, encontrando-se:

$$\kappa = 0.7235$$

$$SE (\kappa) (\text{zero}) = 0.08721$$

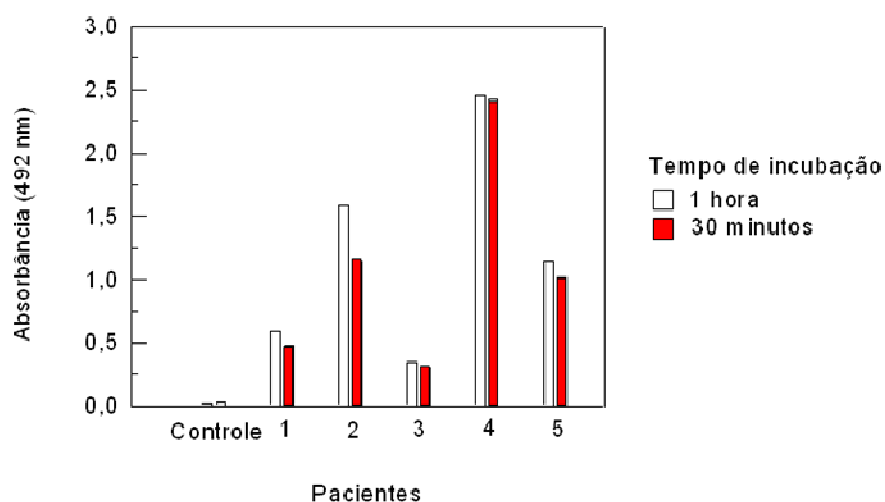
$$SE (\kappa) = 0.06040$$

Tabela 4 - ELISA-Sanduiche e teste *in vivo* para classificar a peçonha de **C. durissus** em crotamina positivo e crotamina negativo:

N° de amostras	Positivo		Negativo	
	ELISA	<i>in vivo</i>	ELISA	<i>in vivo</i>
22	9	12	13	10
12	5	7	7	5
10	3	4	7	6
49	19	19	30	30
10	6	3	4	7
10	9	5	1	5
18	11	8	7	10
Total	131	62	69	73

Foram analisados 131 venenos de **Crotalus durissus**, por ELISA -Sanduíche de acordo com metodologia

Figura 16 - Níveis circulantes de antígenos medidos por ELISA Sanduiche em diferentes tempos de incubação, em pacientes acidentados por *Crotalus durissus* atendidos no "Hospital João XXIII".



As placas foram sensibilizadas com IgG de cavalo anti-CE de *C. durissus* (10 μ g/ml à 4°C por uma noite). Em (□) os soros foram incubados por 1 hora a 25°C, e em (■) e por 30 minutos à 37°C. O conjugado foi incubado por 1 hora à 25°C em (□) e por 30 minutos à 37°C em (■). O substrato foi adicionado como descrito em material e métodos.

Para o método ELISA Sanduíche desenvolvido neste trabalho, determinou-se o limite entre teste positivo e negativo (“cutoff”) para todos os soros analisados.

1 . ELISA para identificar antígenos tóxicos circulantes do veneno de ***B. atrox*** e ***L. muta muta***:

A média da absorvância dos soros de 100 pacientes controles foi de $0,028 \pm 0,041$. A absorvância de 0,110 (média + 2 desvios padrão da média) foi utilizada como limite (“cutoff”) entre teste positivo do ELISA e corresponde a uma concentração igual a 7,5 ng/ml do veneno de ***B. atrox*** e 19 ng/ml de ***L. muta muta***.

2 . ELISA para identificar antígenos tóxicos circulantes do veneno de ***C. durissus*** e ***Bothrops spp***:

A média da absorvância dos soros de 110 pacientes controles foi de $0,037 \pm 0,017$. A absorvância de 0,071 (média + 2 desvios padrão da média) foi utilizada como limite (“cutoff”) entre teste positivo e negativo do ELISA e corresponde a uma concentração aproximada igual a 20,5 ng/ml do veneno de ***C. durissus*** e 75 ng/ml para ***Bothrops spp***.

3 . ELISA para identificar crotoxina, componente de ***C. durissus*** ,circulante em soros:

A média da absorbância dos soros de 110 pacientes controles foi de $0,060 \pm 0,013$. A absorbância de 0,086 (média + 2 desvios padrão da média) foi utilizada como limite ("cutoff") entre teste positivo e negativo do ELISA e correspondendo a uma concentração de aproximadamente 20 ng/ml da crotoxina.

4 . ELISA para identificar crotamina, componente do veneno de ***C. durissus*** , circulante:

A média da absorbância dos soros de 110 pacientes controles foi de $0,066 \pm 0,076$. A absorbância de 0,218 (média + 2 desvios padrão da média) foi utilizada como limite ("cutoff") entre teste positivo e negativo do ELISA

Determinou-se também a especificidade, sensibilidade, prevalência e valores preditivos positivos e negativos do método. De acordo com as tabelas 5, 6, 7, 8, e 9 os valores encontrados foram:

	<i>C. durissus</i>	Crotoxina	<i>Bothrops spp</i>	<i>L muta muta</i>	<i>B. atrox</i>
Sensibilidade	91%	93,5%	88%	92%	97,6%
Especificidade	99%	100%	96%	97%	98%
Prevalência	29%	21,9%	13%	10%	68%
Preditivo positivo	98%	100%	79%	79%	99%
Preditivo negativo	96%	100%	98%	99%	95%

Tabela 5 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de ***C. durissus*** em soro de pacientes acidentados:

ELISA	Pacientes	Controles
Positivo	41	1
Negativo	4	109
Total	45	110

Tabela 6 - Relação dos resultados do ELISA para determinação da crotoxina em soro de pacientes acidentados por ***C. durissus***:

ELISA	Pacientes	Controles
Positivo	29	0
Negativo	2	110
Total	31	110

Tabela 7 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de *Bothrops spp* em soro de pacientes acidentados:

ELISA	Pacientes	Controles
Positivo	15	4
Negativo	2	106
Total	17	110

Tabela 8 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de *L. muta muta* em soro de pacientes acidentados:

ELISA	Pacientes	Controles
Positivo	11	3
Negativo	1	97
Total	12	100

Tabela 9 - Relação dos resultados do ELISA para determinação de antígenos do veneno de *B. atrox* em soro de pacientes acidentados:

ELISA	Pacientes	Controles
Positivo	208	2
Negativo	5	98
Total	213	100

5 . DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Acidentes envolvendo serpentes são frequentes no Brasil, onde cerca de 20.000 casos anuais tem sido registrado nos últimos anos (Ministério da Saúde, 1993). Este problema de saúde pública é agravado pelo fato de que serpentes de diferentes gêneros e espécies são comumente encontradas na mesma área onde a espécie envolvido no acidente nem sempre é corretamente identificada. O tratamento médico para acidentes ofídicos utiliza, basicamente, o soro antiveneno desenvolvido em animais, principalmente cavalos inoculados com misturas de venenos de serpentes representativas da região. Este tratamento poderia ser melhorado pela administração do antiveneno de cavalo espécie-específico e isto poderá se tornar possível quando a serpente envolvida no acidente for corretamente identificada (Ministério da Saúde, 1991). O uso do antiveneno monoespecífico é o mais indicado, visto que o volume inoculado é menor, minimizando os riscos de reações anafiláticas não desejadas (THEAKSTON, 1989).

O estabelecimento da cinética de um veneno no soro é um passo essencial no desenvolvimento de um teste capaz de determinar a dose de veneno inoculada. Este

conhecimento proporciona um tratamento personalizado, onde a vítima recebe apenas a quantidade necessária de antiveneno (BARRAL-NETTO e cols., 1990).

A imunodeteção de veneno em animais tem sido alcançada pelo uso de diversas metodologias (HO e cols., 1986). Em 1977, THEAKSTON e cols. descreveram o uso da técnica de ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) na detecção de veneno ou anticorpos em pacientes acidentados por serpentes.

Neste trabalho, desenvolveu-se métodos de imunodiagnóstico, utilizando a técnica de ELISA, que identifica e discrimina venenos e antivenenos em envenenamentos por serpentes brasileiras dos gêneros *Lachesis*, *Bothrops* e *Crotalus*. A técnica de ELISA foi escolhida por tratar-se de um método de baixo custo, fácil execução, prescindir do manuseio de materiais radioativos e sensível para determinar macromoléculas qualitativa e quantitativamente. Este método tem sido aplicado para o acompanhamento do nível de veneno em soros de pacientes (KHIN-OHN-LWIN e cols.,1982; AUDEBERT e cols., 1992) além do gênero da serpente envolvida no acidente (THEAKSTON ,1977, 1983).

Como venenos de serpentes podem apresentar antígenos comuns, os quais induzem anticorpos com reação cruzada em soro de cavalos imunizados com o veneno total (HO e cols.,1988), foi necessário remover do soro de cavalos hiperimunizados com veneno de: 1) *B. atrox* ou *L. muta*; 2) *Bothrops spp* ou *C. durissus*, as imunoglobulinas G (IgG) que apresentavam reatividade cruzada com o veneno oposto

(FIG. 1 A e B; FIG. 2 A e B). No trabalho utilizou-se anticorpos policlonais por serem mais estáveis à tratamentos químicos e físicos, adsorverem bem à superfícies plásticas e possuírem reatividade menor que a apresentada pelos anticorpos monoclonais (HO e cols., 1986a).

Técnicas de imunoafinidade foram utilizadas para purificação de IgGs que reagiam com alta especificidade a apenas um dos venenos (FIG. 3 A e B; FIG.4 A e B). Essas frações de IgGs foram escolhidas para sensibilização de placas e soluções de venenos foram utilizados para padronizar o ensaio (FIG. 5 e 6). O ELISA Sanduíche foi rápido (tempo total de duas horas, desde que as placas tenham sido sensibilizadas e bloqueadas anteriormente e estocadas) e sensível (FIG. 5 e 6) onde os antígenos apresentaram valores de absorbância positivos de aproximadamente 2 - 5 ng/ensaio. Como as concentrações de veneno nos flúidos corporais se encontram na ordem de nanogramas (KHIN-OHN-LWIN e cols., 1984; HO e cols., 1896), nosso teste pode ser usado para investigação *in vivo* na detecção real da concentração de veneno circulante levando em consideração o nível de sangue, peso da vítima e o tempo de picada.

A especificidade do ensaio e a sua utilização como teste diagnóstico, foi demonstrado em uma série de experimentos, nos quais camundongos foram inoculados com veneno

total. Os soros foram testados, individual e aleatoriamente, e o antígeno circulante (ou ausência dele) foi corretamente identificado em todos os camundongos (FIG. 10 e 11).

Soros humanos de pacientes acidentados também foram testados pelo método ELISA-Sanduiche. Os resultados obtidos confirmaram o diagnóstico clínico sobre os gêneros das serpentes envolvidas (TAB. 1 e TAB. 2). A TAB. 1 mostra o número de casos de acidentes ofídicos identificados pelo ELISA-Sanduiche na região de Manaus, onde houve um aumento de certeza no diagnóstico do acidente ofídico. A TAB. 2 , mostra níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA-Sanduiche após a análise dos soros de 16 pacientes atendidos pelo “Hospital João XXIII”, incluindo alguns soros controles.

A técnica de ELISA utilizada em estudos clínicos está condicionada a determinação do ponto limite (“cutoff”) entre teste positivo e teste negativo de modo a permitir que se estabeleça a sensibilidade e especificidade do ensaio (HO e cols., 1986a). Para tanto, é necessária a seleção meticulosa de pelo menos 100 pacientes controles para a determinação da absorbância média no plasma utilizando o ELISA. Estes controles devem pertencer ao mesmo estrato sócio-econômico, residirem na mesma região geográfica dos pacientes a serem estudados e não possuir história prévia de acidente por animal peçonhento ou de terem recebido soroterapia heteróloga (HO e cols., 1986a; HO e cols., 1986b; THEAKSTON e cols., 1992). De acordo com estas

recomendações, foi possível determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e prevalência do ELISA desenvolvido para detecção de antígenos tóxicos circulantes do veneno de **C. durissus**, crotoxina, **Bothrops spp**, **L. muta muta** e **B. atrox**, obtendo-se os valores respectivamente de 91%, 99%, 98%, 96% e 29% para **C. durissus**; 93,5%, 100%, 100%, 100% e 21,9% para crotoxina; 88%, 96%, 79%, 98% e 13% para **Bothrops spp**; 92%, 97%, 79%, 99% e 10% para **L. muta muta**; 97,6%, 98%, 99%, 95% e 68% para **B. atrox**.

Ligações não específicas podem ser minimizadas quando se testa flúidos corporais que possuem baixo conteúdo de proteínas, tais como urina ou líquido aspirado do local da picada. Porém na análise da urina, um teste positivo dependeria do tempo entre a picada e a retirada de amostra do paciente. Já o líquido aspirado depende da velocidade de dispersão do veneno - um teste positivo não é prova de que o envenenamento sistêmico tenha ocorrido, não sendo, portanto, um indicador de terapia (HO e cols., 1986a). O soro de paciente demonstrou ser o material mais adequado para identificação do veneno de uma serpente (MINTON, 1987), por esta razão, optou-se pela utilização do soro como material teste.

Foram analisados os níveis de antígenos circulantes e anticorpos antiveneno em soro de pacientes acidentados, coletados em diferentes intervalos de tempo, no qual as serpentes envolvidas foram corretamente identificadas (FIG 12 e 15). Observa-se que os níveis de antígenos estão em altas concentrações no soro dos pacientes antes da

soroterapia. As variações das concentrações plasmáticas do veneno observadas nos pacientes (FIG. 15) podem ser explicadas por fatores como as diferenças de volume corporal, via de inoculação (intravenosa ou subcutânea), influência do tempo decorrido entre o acidente e a coleta do material para teste e a quantidade de veneno inoculada no momento da picada. Todas essas variáveis devem ser observadas para uma melhor padronização do método. A pesquisa de antígenos realizada nas primeiras horas após a administração do soro antiofídico e em horas posteriores, não detectou a presença do veneno. Títulos elevados de anticorpos de cavalo antiveneno ofídico foram constatados já na primeira hora após a soroterapia e pelo menos até 24 horas (FIG. 15) e 48 horas (FIG. 12) após a mesma. Estas observações demonstram a eficácia da soroterapia específica em neutralizar o antígeno circulante. Tem sido registrado que o antiveneno pode ser mais efetivo quando administrado em altas doses (RUSSELL e cols., 1985) e logo após o acidente. Entretanto, este procedimento aumenta o risco de reações adversas como choque anafilático e deposição de imunocomplexos com consequência renal grave (AMARAL e cols., 1985, 1986; CAIAFA e cols., 1994). Os casos letais resultantes do choque anafilático podem chegar, nas regiões mais distantes a 2,1% dos acidentes (Ministério da Saúde, 1989). De acordo com a cinética observada nas FIG. 12 e 15, onde o veneno é rapidamente neutralizado pelo antiveneno, não parece justificável a administração de altas doses de antiveneno como proposto.

Analizamos por ELISA-Sanduiche, amostras de soro (T_0) de pacientes acidentados por ***B.atrox*** (FIG. 13) atendidos pelo “Hospital Universitário João de Barros Barreto”, Belém, Pará, num tempo médio entre picada e atendimento médico de 24 horas (tempo médio em que os pacientes chegam ao hospital após o acidente). Observamos a existência de uma relação entre níveis de antígenos circulantes medidos por ELISA (absorbância) e o estado clínico desses pacientes. Ao analisarmos os soros destes pacientes em tempos individuais entre picada e soroterapia, observa-se que existe uma grande variação na relação do nível de antígeno circulante medidos por ELISA e estado clínico do paciente. A classificação do acidente em leve, moderado e grave e a quantidade de antiveneno a ser administrado em cada quadro (100, 150 e 250 ml respectivamente), é sugerido pelo Ministério da Saúde. Entretanto, nossos dados mostram que a terapia antiveneno seria mais efetiva se utilizasse, além dos parâmetros clínicos, um método que quantificasse o veneno circulante a ser neutralizado. Como exemplo, podemos observar que os casos de acidentes leves (casos de nº 2, 6 e 7) apresentaram níveis similares de veneno na circulação como os mostrados pelos casos moderados, sugerindo que alguns desses casos necessitam de uma quantidade maior de antiveneno do que a sugerida pelos parâmetros clínicos somente. Da mesma forma, alguns casos graves apresentam níveis circulantes de antígenos como os mostrados por casos leves e moderados, sugerindo dessa forma uma dose menor de antiveneno,

o que diminuiria as reações adversas apresentadas por administrações de altas doses de antiveneno.

Foram também analisados os níveis de crotoxina e a presença ou não de crotamina em soros de pacientes acidentados por ***C. durissus***. Este estudo foi feito na tentativa de relacionar o estado clínico dos pacientes com os níveis desses componentes na circulação, visto que a crotoxina, principal componente neurotóxico do veneno de ***C. durissus*** produz efeitos tanto em nível do sistema nervoso central, quanto em nível de sistema nervoso periférico (HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971, 1976; VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL e cols., 1966, 1973) e a crotamina, com atividade miotóxica sendo capaz de induzir a despolarização do potencial de membrana das células musculares, causando dessa forma paralisia (LAURE, 1975; BRAZIL e cols., 1978). BARRAL-NETTO (1991), em seu trabalho observando a cinética da crotoxina, realizado em camundongos inoculados com veneno total de ***C. durissus***, mostrou uma rápida depuração desse componente tóxico na circulação desses animais. Considerando-se que, em pacientes humanos essa depuração também ocorra e o tempo entre o acidente e o atendimento médico seja de algumas horas, torna-se difícil à detecção correta do nível de crotoxina presente na circulação.

A presença, isolada ou não, de crotamina na circulação de pacientes acidentados por ***C. durissus***, parece não apresentar uma relação direta com o estado clínico desses pacientes, visto que se pode determinar a presença isolada da crotamina em alguns

casos leves e a ausência em casos considerados graves. A presença ou não deste componente tóxico, está relacionada com o espécime e com a região geográfica a qual pertence (GONÇALVES e VIEIRA, 1950). BARRIO e BRAZIL (1951) examinando a ação neuromuscular de ratos inoculados com veneno de ***Crotalus terrificus terrificus***, encontrou duas respostas, onde as atividades eram geograficamente distribuídas: tipo I (caracterizado por tremores, hipotonia e paralisia) estando presentes em veneno de serpentes da Argentina, Paraguai e Bolívia; tipo II (caracterizado por hipotonia inicial e flacidez muscular) encontrado em veneno de serpentes do Brasil, concomitantemente com o tipo I. SCHENBERG (1959) estabeleceu a distribuição geográfica da crotamina presente em veneno de serpentes ***Crotalus dirissus*** na região de São Paulo. Duas áreas foram descritas: uma onde o veneno apresenta crotamina, e outra, híbrida, onde a crotamina pode estar ou não presente no veneno.

A técnica original do teste de ELISA para envenenamento de serpentes foi descrita por THEAKSTON e cols. (1977) com o tempo total de 3 horas, mas testes mais rápidos já foram desenvolvidos (LABROUSSE e cols, 1988; DHALIWAL e cols., 1983). O tempo total necessário para se realizar o teste de ELISA Sanduíche descrito neste trabalho, até então era de 2 horas e 30 minutos, desde que as placas tivessem sido preparadas anteriormente e estocadas. As placas podem ser estocadas por mais de 6 meses, após sensibilização e bloqueio. Não há nenhuma diferença significativa entre

placas estocadas por 1 ou 6 meses, quando comparadas com placas que tenham sido sensibilizadas e utilizadas imediatamente (DHALIWAL e cols., 1983). O próximo passo seria tentar diminuir o tempo total de realização do método tornando-se fundamental para a eficácia do mesmo. A FIG. 16 mostrou que os resultados continuavam significativos após a mudança do tempo de incubação dos soros e conjugado, com tempo total de realização do teste em 1 hora e 30 minutos.

O método de ELISA-Sanduiche também foi utilizado para identificar o veneno de **C. durissus** em crotamina positivo e crotamina negativo na tentativa de eliminar o teste realizado em camundongos. Essa classificação é feita para veneno de **Crotalus durissus** que participam da mistura utilizada como imunógeno para produção do soro anti-crotálico onde 75% do veneno deve ser crotamina positivo (de acordo com métodos convencionais adotados pela comissão de padronização de venenos e antivenenos das instituições produtoras de antiveneno). O teste *in vivo* tem resultado positivo quando camundongos inoculados com 1,25 mg/ml (salina) do veneno total de **Crotalus durissus**, por via subcutânea, apresenta paralisia das patas posteriores, lacrimejamento, dificuldade respiratória, convulsão e morte num período de 30 minutos de observação. O programa de índice de "Kappa" foi utilizado para auxiliar na interpretação dos resultados descritos na TAB. 4. Após análise, obtivemos um índice de 0.721, mostrando que existe um grau de concordância substancial entre os dois experimentos. Em alguns casos onde o teste de ELISA foi crotamina positivo e o teste

in vivo negativo, foi feita eletroforese SDS-PAGE- (dados não mostrados), onde observamos uma banda de mesmo peso molecular da crotamina, justificando a diversidade da intensidade nas diferentes amostras do veneno, mostrando que o método pode ser utilizado com êxito para este propósito, por apresentar maior sensibilidade.

A utilização do teste de ELISA em casos humanos é desejável, visto que este ensaio proporciona uma rápida e segura identificação de antígenos circulantes em indivíduos acidentados. Entretanto, um estudo vem sendo realizado para uma redução do tempo total do ensaio (LABROUSSE e cols., 1988) sem uso da placa ou do leitor de ELISA que poderá ser utilizado por clínicos e epidemiologistas sem o auxílio de equipamentos de laboratório (GREENWOOD, 1991).

6. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O método de ELISA Sanduíche, utilizando imunoglobulinas G de cavalos ou coelhos induzidos pelos diferentes venenos foi capaz de identificar, diferenciar e quantificar, com boa especificidade e sensibilidade venenos em soro de animais de experimentação e humanos acidentados pelas serpentes:

B. atrox ou **L. muta muta**: Observou-se a existência de uma relação entre a concentração de veneno circulante, tempo entre picada e atendimento médico (intervalo de 24 horas) e gravidade do caso em soros de pacientes picados pela serpente **B. atrox**, podendo o método sugerir doses de antiveneno necessárias para o tratamento destes pacientes.

C. durissus ou **Bothrops spp**: A relação entre concentração de veneno circulante, tempo entre picada e atendimento médico e gravidade do caso não foi observada em soro de pacientes acidentados por **C. durissus**.

Componentes do veneno de **C. durissus**: crotamina e crotoxina: Não se observou uma relação existente entre presença e concentração ou não desses componentes em soro de pacientes acidentados por **C. durissus** com a gravidade do caso.

- O método de ELISA direto foi capaz de identificar e quantificar antivenenos em soros de pacientes submetidos a soroterapia após acidente por picada de serpente. Nosso método sugere que se faça uma nova avaliação na eficácia da soroterapia e doses de antivenenos necessárias para o tratamento destes pacientes, visto que o veneno é rapidamente neutralizado pelo

antiveneno nas primeiras horas após a administração do soro não sendo detectado em horas posteriores e o soro antiofídico permanece em altas concentrações na circulação pelo menos até 24 horas após sua administração.

- O método de ELISA Sanduíche desenvolvido para identificar o veneno de **C. durissus** em crotamino positivo e crotamino negativo, obteve um grau substancial de concordância com o teste *in vivo*, demonstrando que o método poderá ser utilizado para este propósito apresentando maior sensibilidade.
-

7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARO, B. B. & BOZA, M. A. (1983). Ofidismo en hospital rural del Pacífico Sur durante 1981. *Acta Medica Costarricense*. **26**: 24-27.
- AMARAL, C. F. S., SILVA, O. A., GODOY, P. and MIRANDA, D. (1985). Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon*. **23**: 877-885.
- AMARAL, C. F. S. REZENDE, N. A., and SILVA, O. A. (1986). Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico . Análise de 63 casos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **28**: 220-227.
- ARAGON-ORTIZ, F. and GUBENSEK, F. (1985). A thrombin-like enzyme from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. In: *World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins 8*, Newcastle. - 11-16 August.
- AUDEBERT, F.; SORKINE, M.; BON, C. (1992). Envenoming by Viper bites in France: clinical gradation and biological quantification by ELISA. *Toxicon*. **30**:(5/6), 599-609.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. (1985). Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*. **23**: 631-636.
- BARRAL-NETO, M.; SCHRIEFER, A.; BARRA, A.; ALMEIDA, A. R. P.; MANGABEIRA, A. (1991). Serum levels of bothropic venom on patients without anti venom intervention. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**: 751-754.
- BARRAL-NETO, M.; von SOHSTEN, R. L. (1991). Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice: evidence for a rapid clearance. *Toxicon*. **29**(415): 527-531.

- BARRAL-NETTO, M.; SCHRIEFFER, A.; VINHAS, D. V.; ALMEIDA, A. R. (1990). Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. **28**: 1053-1061.
- BARRIO, A. (1961). Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoamerican*. **11**: 224.
- BARRIO, A. and BRAZIL, O. V. (1951). Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* poison. *Acta Physiol. Lat. Am*. **1**: 291-308.
- BIEBER, A. L. (1979). Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: *Snake Venoms*. Berlin: Springer-Verlag. (C. Y. Lee). 295-308.
- BOCHE, R. D.; RUSSELL, F. E. (1968). Passive hemagglutination studies with snake venom and antivenin. *Toxicon* **6**: 125-128.
- BRAZIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. (1989). Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos. Junho de 1986 a dezembro de 1987.
- BRAZIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (1991). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes. 1 ed., Brasília:
- BRAZIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (1993). Ofidismo; análise epidemiológica. Brasília DF. CENEPI - CCZP.
- BRAZIL, O. V. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan*. **33**: 981-992.
- BRAZIL, O. V. (1972). Neurotoxins from the South american rattlesnake venom. *J. Formosan. Med. Assoc.* **71**: 394.
- BRAZIL, V. O.; EUGÊNIO, A. G.; LASLIO, J. M. (1973). Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. *Ciê. Cultura*. **25**: 1165.
- BRAZIL, O. V.; PRADO-FRANCESCHI, J.; LAURE, C. J. (1978). Repetitive muscle response induced by crotamine. *Toxicon*. **17**: 61-67.
- BRAZIL, O. V.; PRADO-FRANCESCHI, J.; WAISHICH, E. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. *Mem. Inst. Butantan*. **33**: 973.

- BRAZIL, V. and VELLARD, E. P. (1928). Contribuição ao estudo da coagulação e da proteólise. *Brasil Médico*. **40**: 239-243.
- CAIAFFA, W. T. ; VLAHOV, D.; ANTUNES, C. M. F.; OLIVEIRA, H. R. and DINIZ, C. R. (1994). Snake bite and antivenom complications in Belo Horizonte, Brazil. *Trans. Royal S. Trop. Med. and Hyg.* **88**: 81-85.
- CALMETTE, A. (1894b). Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'èvenimation. In snake Venoms: *Handb. Exp. Pharm.***52**, pp 1 - 1130; 1979.
- CAMERON, D. L. and TU, A. T. (1978). Chemical and functional homology of myotoxin a from praire rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake. *Biochem. Biophys. Acta.* **532**: 147-154.
- CAMPBELL, J. A. and LAMAR, W. W. (1989). In: *The venomous Reptiles of Latin America* . Ithaia, New York; Comstock.
- CHAVÉZ-OLORTEGUI, C.; LOPES, C. S.; CORDEIRO, F. D.; GRANIER, C.; DINIZ, C. R. (1993). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between ***Bothrops atrox*** and ***Lachesis muta muta*** venoms. *Toxicon.* **31**: 417-425.
- CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVELLER, M. (1971). Actions neuromusculaire comparee de la crotamine et du venin de ***Crotalus durissus terrificus*** var crotaminicus. I. Sur perparation neuromusculaire in situ. *Toxicon.* **9**: 279-286.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon.* **29**:(11), 1279-1303.
- CHIPPAUX, J. P. and THEAKSTON, R. D. G. (1987). Epidemiological studies of snakebites in French Guiana. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **81** : 301-304.
- COULTER, A. R. HARRIS, R. D. and SUTHERLAND, S. K. (1980). Enzyme immunoassay for the rapid clinical identification of snake venom. *Med. J. Aust.* **1**: 433-435.

- COULTER, A. R.; COX, J. C.; SUTHERLAND, S. K.; WADDELL, C. J. A. (1978). New solid-phase sandwich radioimmunoassay and its application to detection of snake venom. *J. Immunol. Meth.* **23**: 241-247.
- COULTER, A. R.; SUTHERLAND, S. K.; BROAD, A. J. (1974). Assay of snake venoms in tissue fluids. *J. Immunol. Meth.* **4**: 297-300.
- COX, J. C.; MOISIDIS, A. V.; SHEPHERD, J. M.; DRANE, D. P.; JONES, S. L.. (1992). A novel format for a rapid sandwich EIA and its application to the identification of snake venoms. *J. Immunol. Methods.* **146**:213-218.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. (1988). Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (***Crotalus durissus terrificus***) envenomation in children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 924-929.
- DA SILVA, N. J.; AIRD, S. D.; SEBART, C.; KAISER, I. I. (1989). A gyrotxin analog from the venom of the bushmaster (***Lachesis muta muta***). *Toxicon* **27**: 763-771.
- DAVEY, M. G. and LUSCHER, E. F. (1967). Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature*. **216**: 857-858.
- DENSON, K. W. E. and ROUSSEAU, W. E. (1970). Separation of the coagulant components of ***Bothrops jararaca*** venom. *Toxicon*. **8**: 15
- DEUTSCH, H. F. and DINIZ, C. R. (1955). Some proteolytic activities of snake venoms. *J. Biol. Chem.* **216**: 17-26.
- DHALIWAL, J. S.; LIM, T. W.; SUKUMARAN, K. D. (1983). A double antibody sandwich micro-ELISA kit for rapid diagnosis of snake bite. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth.* **14**(3): 367-373.
- DINIZ, M. V. and OLIVEIRA, E. B. (1992). Purification and properties of a Kininogenin from the venom of ***Lachesis muta*** (Bushmaster). *Toxicon*. **3**: 247-258.
- EAGLE, H. J. (1937). The coagulation of blood by snake venoms and its physiological significance. *J. Exp. Med.* **6**: 613-639.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* **8**: 871-874.

- EY, P. L.; POWSE, S. J.; JENKIN, C. R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein-A-Sepharose. *Immunochem.* **15**: 429-436.
- FERREIRA, S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *British J. Pharmacol.* **24**: 163-169.
- FURUKAWA, Y. and HAYASHI, K. (1977). Factor X - converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon.* **15**: 107.
- GALEN, R. S. and GAMBINOS. R. (1975). Beyond Normality; the predictive value and efficiency of Medical Diagnosis. New York: John Wiley and Sons.
- GAWADE, S. P.; GAITONDE, B .B. (1980). Immunological studies on monovalent *Enhydrina schistosa* antivenin. *Indian. J. Med. Res.* **72**: 895-899.
- GONÇALVES, J. M. and VIEIRA, L. G. (1950). Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. *Anais Acad. Bras. Cienc.* **22**: 141-150.
- GREENWOOD, B. M. and WHITTLE, H. C. (1974). Nature of the antigen present in the cerebrospinal fluid and serum of patients with group A meningococcal meningitis. *Clin. Exp. Immun.* **16**: 413.
- GREENWOOD, B. M. (1991). Rapid diagnosis tests for field laboratories. In: Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. pp 549-555. (VAHERI, A.; TILTON, R. C. and BARLOW, S. A. Eds.). Berlin: Springer.
- HAWGOOD, B. J. (1992). Review article - Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr. Vital Brazil (1865- 1950). *Toxicon.* **30**: 745-779.
- HENDON, R. A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1971). Biological roles of two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 1560.
- HENDON, R. A. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1976). The role complex formation in the neurotoxicity of crotoxin components A and B. *Toxicon.* **14**: 283-289.
- HENDON, R. A. and TU, A. T. (1979). The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. *Biochim. Biophys. Acta.* **578**: 243-252.

- HENEINE, L. G. D.; CATTY, D. (1993). Species-specific detection of venom antigens from snakes of **Bothrops** and **Lachesis** genera. *Toxicon*. **31**:(3).
- HO, M.; SILAMUT, K.; WHITE, N. J.; DARBWANG, J.; LOOAREESUWAN, S.; PHILLIPS, R. E.; WARRELL, D. A. (1990). Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients evenomed by malayan pit viper (**Calloselasma rhodostoma**) in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 260-266.
- HO, M.; WARRELL, D. A.; LOOAREESUWAN, S.; PHILLIPS, R. E.; CHANTHAVANICH, P.; KARBWANG, J.; SUPANARANOND, W.; VIRAN, C.; HUTTON, R. A.; VEJCHO, S. (1986b). Clinical significance of venom antigens levels in patients evenomed by the malayn pit viper (**Calloselasma rhodostona**). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 579-587.
- HO, M.; WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A.; BIDWELL, D.; VOLLER, A. (1986a). A critical reappraisal of the use of Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) on the study of snake bite. *Toxicon* .**24**:(3), 211-221.
- HOFMANN, H. and BON, C. (1987b). Blood coagulation induced by the venom of **Bothrops atrox**. I. Identification purification and properties of a prothrombin activator. *Biochem.* **26**: 772 - 779.
- HOFMANN, H. and BON, C. (1987a). Boold coagulation induced by the venom of **Bothrops atrox**. 2. identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochem.* **26**: 780-787.
- HOLLEMAN, W. H. and WEISS, L. J. (1976). The thrombin-like enzyme from **Bothrops atrox** snake venom. *J. Biol. Chem.* **251**: 1663-1669.
- JANSKY, B. (1950). The solubility of fibrin clots produced by thrombin and by snake venoms. *Science*. **112**: 173.
- JENG, T. W.; HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. (1978). Search for relationship among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**: 600-604.
- KAMIGUTI, A. S., CARDOSO, J. L. C., THEAKSTON, R. D. G., SANO-MARTINS, I. S., HUTTON, R. A. , RUGMAN, F. P., WARRELL, D. A. and HAY, C. R. M. (1991).

- Coagulopathy and hemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. *Toxicon*. **29**: 961-971.
- KHIN-OHN-LWIN and AYE-AYE-MYINT. (1982). The use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of Russell's viper venom in body fluid. *Snake*. **14**: 77-82.
- KIN-OHIN-LWI; AYE-AYE-MYIN; TUN, P.; NIVE, T.; NAING, M. (1984). Russell's viper venom levels in serum of snake bite victims in Burma. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 165-168.
- LABROUSSE, H.; NISHIKAWA, A. K.; BON, C.; AVRAMEAS, S. (1988). Development of a rapid and sensitive ELISA for measuring venom antigens after an experimental snake bite. *Toxicon*. **26**(12): 1157-1167.
- LAMB, G. (1902). On precipitin of cobra venom: a means of distinguishing between the proteins of different snake poisons. *Lancet*. **16**: 431-435.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. **33**: 159-174..
- LARRICK, J. W., YOST, J. A. and KAPLAN, J. (1978). Snakebites among the Waorani indians of Eastern Ecuador. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 542-543.
- LAURE, C. J. (1975). Estrutura da crotamina. - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP. (Tese de Livre Docência).
- LILIENFELD, A. M. and LILIENFELD, D. E. (1980). Foundations of epidemiology. Oxford: Oxford University Press. 375p.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MAGALHÃES, A.; DE OLIVEIRA, G. J.; DINIZ, C. R. (1981). Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon*. **19**: 279.

- SILVEIRA, A. M.; MAGALHÃES, A. M. S.; DINIZ, C. R.; DE OLIVEIRA, E. B. (1989). Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of **Lacheis muta muta**. *Intern. J. Biochem.* **21**(8): 863-871.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. (1983). Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum cretine kinase. *Toxicon* **21**: 293-404.
- MINTON, S. A. (1987). Present test for detection of snake venom: clinical applications. *Amm. Emerg. Med.* **16**: 932-937.
- MUELING, R. J.; SAMSON, R. F.; BEVEN, T. (1957). The precipitin test in elucidating the cause of death. *Am. J. Clin. Path.* **28**: 489.
- NAHAS, L.; DENSON, K. W. E.; Mc FARLANE, R. G. (1964). A study of coagulant action of eight snake venoms. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **12**: 355.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. (1979). Thrombin-like and factor X activator components of **Bothrops** snake venoms. *Thromb. Haemost.* **41**: 314-328.
- NAKANE, P. K. and KAWOI, A. (1974). Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**: 1084-1091.
- NELSON, B. K. (1989). Snake envenomation: incidence, clinical presentation and management. *Medical Toxicology.* **4**: 17-31.
- PHISALIX, M.; BERTRAND, G. (1894a). Atténuation du venin de vipère par la chakeur et vaccination du vobaye contre u venin le sérum sanguin des animaux vaccinés. In snake Venoms: *Handb. Exp. Pharm.* **52**, 148-150; 1979.
- PHISALIX, M.; BERTRAND, G. (1894b). Sur la propriété, antitoxique du sang des animau vaccinés contre le venim de vipère. In snake Venoms: *Handb. Exp. Pharm.* **52**, pp 1 - 1130; 1979.
- PRADO-FRANCESCHI, J. and BRAZIL, O. V. (1969). Convulxina, uma nova neurotoxina da peçonha de **Crotalus durissus terrificus** In: Congr. Latamer. Cienc. Fisiol , IX, Brasil.

- PUGH, R. N. H.; THEAKSTON, R. D. G. and REID, H. A. (1980). Epidemiology of human encounters with the spitting cobra, *Naja nigricollis*, in the Malumfashi area of northern Nigeria. *Ann. Trop. Med. and Parasit.* **74**: 523-530.
- QUEIROZ, L. S. ; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. (1984). Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *B. jararacussu* snake venom. *Toxicon.* **22**: 339 - 346.
- QUEIROZ, L. S. AND PETTA, C. A. (1984). Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*B. alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **26**: 247 - 253.
- RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. (1986). Isolation and characterization of thrombin-like enzyme from the venom *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **19**: 333.
- ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating principle released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* **156**: 261-273.
- ROSENBERG, P. (1990). Phospholipases. In: *Hand Book of Toxinology*. New York: Marcel Dekker. 67-278.
- ROSENFELD, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South American. In: *Venomous Animals and their venoms*. New York: Bücherl, W. and Buckley, E. E. II: 345p.
- ROSING, J. and TANS, G. (1992). Structural and functional properties of snake prothrombin activators. *Toxicon.* **30**(12): 1515-1527.
- RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMAN, E. (1971). Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **279**: 274.
- RUSSELL, F. E.; and DART, R. C. (1991). Toxic effects of animal toxins. In: *Toxicology*, AMDUR, M. O.; DOULL, J. and KLAASSEN, C. D. (editors). New York: Pergamon Press, pp. 753-803.

- RUSSELL, F. E.; CARISON R. W.; WAINSCHEL, J. and OSBORNE, A. H. (1975). Snake venom poisoning in the United States. *J. American Medical Assoc.* **233**:341-344.
- RUSSEL, F. E.; SULLIVAN, J. B.; EGEN, N. B. et al (1985). Preparation of a new anivenin by affinity chromatography. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**(1): 141-150.
- SAKURAI, N.; SUGIMOTO, K.; SUGIHARA, H.; SHIRASAWA, H.; MURO, H.; KANEKO, M.; NIKAI, T.; SHIBATA, K. (1986). Glomerular injury in mice induced by **Agkistrodon** venom. *Am. Pathol.* **122**:240-251.
- SCHENBERG, S. (1959). Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake sub species. *Science.* **129**: 1361-1363.
- SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. (1980). Purification of gyroxin from South American rattlesnake (***Crotalus durissus terrificus***) venom. *Toxicon.* **18**: 235.
- SEWALL, H. (1887). Experiements on the preventive inoculation of rattlesnake venom. *J. Physiol.* **8**: 203-210.
- SILAMUT, K.; HO, M.; LOOAREESUWAN, S.; VIRAVAN, C.; WUTHIEKANUN, V.; WARRELL, D. A. (1987). Detection of venom by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in patients bitten by snakes in Thailand. *Br. Med. J.* **294**: 402-404.
- SLOTTA, K. H. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1938). Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan.* **12**: 505-512.
- STAVITSKY, A. B.; ARQUILA, E. B. (1955). Procedure and applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with bisdiazotized benzidine and protein-conjugated red blood cell. *J.Immunol.* **74**: 306-312.
- STOCKER, K. and BARLOW, G. H. (1975). Characterization of defibrase. In: *Defibrinierung mit thrombin-ahnlichen schalagengiftinzy-men.*(MARTIN, M. and SCHOOP, W.) 45pp.
- STOCKER, K.; FISHER, H.; MEIER, J. (1982). Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon.* **20**: 265.

- STOCKER, K. F. (1990a). Composition of snake venoms. In: *Medical use of snake venom proteins*. 1 ed. Boca Raton; CRC Press, 15-19.
- SUTHERLAND, S. K.; COULTER, A. R.; BROAD, A. J.; HILTON, J. M. N.; LANE, L. H. D. (1975). Human snake bite victims: the successful detection of circulating snake venom by radio immunoassay. *Med. J. Aust.* **1**: 27-29.
- SUTHERLAND, S. K.; COULTER, A. R. (1977). Three instructive cases of tiger snake (*Notechis scutatus*) envenomation and how a radioimmunoassay proved the diagnosis. *Med. J. Aust.* **2**: 177-180.
- TENG, C. M. and WANG, J. P. (1988). Edema formation in rat hind-paw induced by some proteases isolated from *Trimesurus mucrosquamatus* snake venom. In: *World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*.
- THAN, T.; HAN, K. E.; HUTTON, R. A.; LWIN, M.; EWE, T. N.; PHILIPS, R. E.; WARRELL, D. A. (1987). Evolution of coagulation abnormalities following Russell's viper bite in Burma. *Br. J. Haematol.* **65**: 193-198.
- THEAKSTON, R. D. G.; FAN, H. W.; WARRELL, D. A.; DIAS da SILVA, W. D.; WARD, S. A.; HIGASHI, H. G. THE BUTANTAN INSTITUTE ANTIVENOM STUDY GROUP (BIASG). (1992). Use of enzyme immunoassay to compare the effect and assess the dosage regimens of three brazilian *Bothrops* antivenoms. *Am. J. Trop. med. Hyg.* **47**: 593-604.
- THEAKSTON, R. D. G.; LOYD-JONES, J. M.; REID, H. A. (1977). Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom- antibody. *Lancet*. (sept.):639-641.
- THEAKSTON, R. D. G; PUGH, R. N. H. and REID, H. A. (1981a). Enzyme-linked Immunosorbent assay of venom antibodies in human victims of snakebite. *J. Trop. Med. Hyg.* **84**:109-112.
- THEAKSTON, R. D. G; REID, H. A. (1979). ELISA in assessing antivenom potency. *Toxicon* . **17**: 511-515.
- THEAKSTON, R. G. D. (1983). The application of immunoassay techniques, including ELISA to snake venom research. *Toxicon*. **21**(3): 341-352.

- THEAKSTON, R. G. D. (1989). Snake venom in science and clinical medicine. 2. Applied immunology in snake research. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**(6): 741-744.
- THETHEWIE, E. R. and THOMAS, W. L. (1969). Some effect of material obtained from snake bite area. *Toxicon.* **7**: 243-246.
- TIRU-CHELVAM, R. (1972). Demonstration of sites of snake venom localisation by immunofluorescence techniques. *J. Path.* **107**: 303.
- TU, A. T. and SALAFRANCA, E. S. (1974). Immunological properties and neutralization of sea snake venoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**: 135-138.
- VELLARD, J. (1948). El veneno de *Lachesis muta*. *Publicaciones del museo de Historial Natural Javier Prado*. Universidade Nacional Mayor de San Marcos, Peru 1-49.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. (1979). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstrats of microplate applications. **Guernsey: Dynatech Europe.** 28p.
- von KLOBUSITZKY, D. and KONIG, P (1935/36). Estudos biochimicos sobre os venenos das serpentes do gênero *Bothrops*. III. Separação do princípio coagulante dentre a bothropxina e outras substâncias contidas na secreção natural. *Mem. Inst. Butatan.* **10**: 223.
- WALTER, S. D. and COOK, R. J. (1988). Program for analysis of interobserver variation. PC-Agree (version 2.5) Departament Clinical Epidemiology and Biostatistics, Mc Master University, Medical Center, Hamilton, Ontario, Canadá.
-