

Case report: Autochthonous Cutaneous Loxoscelism with Oedematous Predominance (CLEP) in Madrid, Spain



Caso clínico: loxoscelismo autóctono cutáneo con predominancia edematosa (CLEP) en Madrid, España

A 69-year-old Spanish woman was admitted to our hospital due to sudden onset facial oedema after an arthropod bite. During the night, while she was asleep, an arthropod walking across her face was noted and she tried to remove it. She noted an acute pain over the upper lip. No flying or terrestrial arthropod was seen when the light was switched on. Nevertheless next day a partially “knocked out” spider was captured between the sheets of her bed. The patient lives in a single-family house in Talamanca del Jarama, a village located in a rural area of the Province of Madrid (3500 inhabitants).

On admission at the emergency room the burning pain was still present, and an asymmetrical left sided facial oedema was noted. The bite occurred at the left side of the upper lip approximately 2 cm from philtrum and a double mark corresponding to the bite of the arthropod (the chelicerae or jaws of a spider bite marks) could be lightly noticed. Surrounding this bite mark a pale plaque of approximately 1.5 cm of maximum diameter could be seen, surrounded by an erythematous halo of approximately 2.5 cm. General symptoms such as general discomfort, fever, dyspnoea or rash were absent. No lymphadenopathies were noticed. Methylprednisolone and amoxicilina–clavulanate were started at the emergency room. Blood parameters were normal. A facial CT-scan was performed, showing mild subcutaneous oedema, with no other bone or soft-tissue lesions.

Antibiotics and steroids were stopped at hospitalisation (48 h after those treatments were started). The patient had a very good self-limiting evolution and was discharged. At ambulatory follow-up, six days after the bite, necrosis signs started at the chelicerae bite marks and expanding approximately 1 cm of diameter (where it was the white plaque). The pain was well relief with habitual analgesics. Drainage and chirurgic debridement were not required.

An entomological study categorised the spider as *Loxosceles rufescens*. Together with the typical clinical manifestations, this gave us a definitive diagnosis of Cutaneous Loxoscelism with an Oedematous Predominance (CLEP) (Fig. 1).

Spider of the genus *Loxosceles* are also called “brown spiders”. Their main characteristic is a brown violin-shape pattern located on the prosoma (cephalothorax).¹ They habit in isolated places indoors, rather than outdoors. Bites occur when they feel endangered and have been reported mainly in spring and summer.²

L. rufescens is known to live in the Mediterranean Basin.¹ However, not many cases of *Loxosceles* spider bite have been reported in the Iberian Peninsula. According to modified loxoscelism criteria settled by Rader et al.,³ the case presented should be considered as “documented”. Only few other documented cases have been reported in Spain,^{4,5} although there are some more presumptive and probable cases^{6–8} reported.

Two main subtypes of loxoscelism have been described: Cutaneous and systemic or visceral loxoscelism.¹

Most common symptoms of cutaneous loxoscelism are oedema and erythema, burning pain and perilesional hyperesthesia. Few hours after the bite a pale-livedoid plaque appears surrounded by an erythematous area. This pale patch is caused by vasoconstriction and can develop in necrosis in a period of 4–5 days.² This is explained by the cytotoxic effect of the venom, which activates complement and induces neutrophil chemotaxis and apoptosis of keratinocytes, producing this dermonecrosis.¹

Visceral loxoscelism occurs when venom is injected directly in the blood stream, triggering hemolysis, vasculitis and coagulation



Fig. 1. Clinical features and *Loxosceles rufescens* specimen. (A) Left facial asymmetric oedema 6 h after spider bite. (B) Pale plaque (arrow) 24 h after spider bite. (C) Necrotic eschar (arrow) 7 days after spider bite. (D) *L. rufescens*.

alterations. Patients develop fever, haematuria and jaundice in the first 6 h, progressing to decreased level of consciousness and coma with a 25% of mortality.¹

Oedema is not a common finding of loxoscelism, most of the bites occur at the limbs.² A rare type of cutaneous loxoscelism is CLEP, described mainly when the spider bite takes place in the face, usually with a benign prognosis. CLEP is presented frequently with an important oedema, that causes difficulties in diagnosis, and necrotic eschar, is often absent or very small. It is postulated that oedema may abort the necrotic process as it dilutes the venom injected. CLEP occurs in about 4% of loxoscelism cases.⁹ To our knowledge, we present the first reported case of CLEP in Spain.

There is no consensus about the best treatment. As it is, in most cases, a self-limiting process, main treatment is supportive.²

Conflict of interest

The authors declare not to have any conflict of interest.

References

- Puerto C, Saldías-Fuentes C, Curi M, Downey C, Andino-Navarrete R. Experiencia en loxoscelismo cutáneo y cutáneo-visceral de manejo hospitalario: clínica, evolución y propuesta terapéutica. *Rev Chil Infectol.* 2018;**35**: 266–75.
- Nguyen N, Pandey M. Loxoscelism: cutaneous and hematologic manifestations. *Adv Hematol.* 2019;2019:1–6.
- Rader R, Stoecker W, Malters J, Marr M, Dyer J. Seasonality of brown recluse populations is reflected by numbers of brown recluse envenomations. *Toxicon.* 2012;**60**:1–3.
- Garriga S, Montero M, Noqué S. Picadura por *Loxosceles rufescens*. *Rev Toxicol.* 2006;**23**:156–7.
- Morales-Moreno HJ, Carranza-Rodríguez C, Borrego L. Cutaneous loxoscelism due to *Loxosceles rufescens*. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;**30**:1431–2.
- Jerusalem K, Salavert M. Probable cutaneous loxoscelism with mild systemic symptoms: a case report from Spain. *Toxicon.* 2018;**156**:7–12.
- Hernández N, Alonso JM, Fuentes L. Loxoscelismo cutáneo. *Rev Clin Med Fam.* 2012;**5**:73–5.
- Portilla-Cuenca J, Maresca-Quintero M, Hoyos-Sanabria B, García-Benito J, Velez-Medina J. Spider's bite that develop eyelid necrosis. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2005;**80**:105–7.
- Schenone H. Loxoscelismo cutáneo de predominio edematoso. *Bol Chil Parasitol.* 1998;**53**:78–83.

Ana Esteban Vazquez^a, Eduardo Malmierca Corral^{b,*}^a Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Infanta Sofía, Spain^b Servicio de Medicina Interna/Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Infanta Sofía, Universidad Europea de Madrid, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: edumalmi@yahoo.es (E. Malmierca Corral).<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.10.005>

0213-005X/ © 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Estabilidad del ARN viral en muestras clínicas para el diagnóstico viral**Stability of viral RNA in clinical specimens for viral diagnosis**

En biología molecular la conservación del material genético de muestras clínicas es clave cuando se realizan experimentos con ARN. Por ello, es importante tomar las máximas precauciones para evitar su degradación, principalmente por las ARNasas que pueden provocar la fragmentación del material genómico. Estas son proteínas robustas con actividad enzimática que participan en procesos fisiológicos diversos y su función principal es hidrolizar y degradar el ARN, además se pueden introducir en los experimentos de forma exógena^{1,2}.

Cuando las muestras clínicas se mantienen en el laboratorio largos períodos de tiempo, el ARN de las mismas es especialmente vulnerable a la degradación^{3,4}, lo que podría influir en el diagnóstico viral al disminuir la sensibilidad de las técnicas de amplificación.

Diversos estudios han demostrado que los inhibidores de ribonucleasas presentan un amplio espectro de actividades inhibitorias contra las ARNasas, protegiendo eficazmente el ARN durante los procedimientos de laboratorio lo que permite una gran flexibilidad en el diseño experimental. Su utilización puede ser una solución para minimizar estos problemas de degradación^{5–7}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la integridad del ARN viral de muestras clínicas tras su almacenaje a 4°C, después de un periodo de tiempo de trabajo estándar (10 días), que se considera suficiente para realizar todos los procesos rutinarios que implica el diagnóstico viral de una muestra, y analizar la eficacia y el rendimiento de un inhibidor de ARNasas para evitar su degradación.

De las muestras procesadas en la Unidad de Virología del Hospital Central de Asturias durante 2 meses, se estudiaron 67 exudados (42 nasofaríngeos y 25 faríngeos) recogidos en un medio de trans-

porte de virus. Se llevó a cabo una extracción y purificación del material genómico con el Reactivo MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, en el sistema automático MagNA Pure LC 2.0 (Roche Diagnostics, Suiza). Se obtuvieron 100 µl para una posterior amplificación de fragmentos de genoma viral y se aplicaron protocolos de diagnóstico síndromico del laboratorio. En todos ellos se evaluaba la cantidad y la calidad de la muestra, y con la amplificación del gen de la β-globina humana se informaba la carga viral normalizada (por número de células). Del extracto nucleico total se separaron 2 alícuotas de 10 µl y en una se añadió 1 µl RNase[®] Inhibitor (Applied Biosystems, EE. UU.), ambas se almacenaron a 4°C.

Las 67 muestras incluidas fueron sometidas al proceso diagnóstico habitual en el laboratorio para enterovirus (n: 53), parainfluenzavirus (n: 11) e influenza A (n: 3). A los 10 días, a las 2 alícuotas almacenadas se les volvió a realizar la misma PCR y se compararon los ciclos de amplificación (Ct) con y sin inhibidor. También se dividieron en 3 grupos según su Ct (< 20, 20–25 y 25–35 ciclos) y el tipo de virus.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa para ordenador, GraphPad InStat v2.04a (GraphPad Software, EE. UU.) según los requerimientos específicos.

En la **tabla 1** observamos que en todas las muestras estudiadas se evidencia la presencia de ARN viral, y en ningún grupo se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 10 días independientemente de añadir o no inhibidor. Además, la media de los Ct no varía de manera significativa en ningún virus.

Las muestras repitieron el rango de amplificación en 59 (88,1%) de las ocasiones después de 10 días, y en 58 (86,6%) de los casos, cuando a la muestra extraída se la añadió RNasin[®].

El presente estudio demuestra que, aunque el uso de RNasin[®] suele estar recomendado en los protocolos de manejo de virus ARN, no parece imprescindible, al menos en los virus estudiados. En algún caso disminuyó ligeramente el rendimiento en las muestras con y sin inhibidor, y es importante señalar que ninguna muestra resultó indetectable después de 10 días.

Así pues, mantenemos que para estudios virales que se realicen en un periodo de 10 días conservados a 4°C no disminuye la capacidad diagnóstica y no sería necesario añadir reactivos preservantes lo que disminuiría la manipulación de las muestras y además no supondría un aumento en el coste de las pruebas diagnósticas. Sería útil realizar estudios en periodos de tiempo más largos para establecer a partir de qué tiempo la posible degradación del ARN podría ser minimizada al utilizar un inhibidor enzimático.

Financiación

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Green MR, Sambrook J. How to Win the Battle with RNase. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019, <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.top101857>.
- Hook B, Hendricksen A, Schagat T. RNase Inhibition: A Head-to-Head Comparison of Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor to RNaseOUT[™]

Tabla 1
Resultados de los Ct en cada uno de los protocolos y media de ellos según el tipo de virus

Ct	Con (sin) inhibidor	Con (sin) inhibidor			Valor de p
		<20	20–25	25–35	
Ct					
<20 n = 18		16 (16)	2 (2)	0 (0)	Ns
20–25 n = 31		4 (1)	20 (24)	7 (6)	Ns
25–35 n = 18		0 (0)	3 (3)	15 (15)	Ns
		Estándar	Con inhibidor	Sin inhibidor	
		24,78 ± 3,44 (21–28)	25,07 ± 2,37 (22–27)	25,28 ± 2,44 (22–27)	
Virus					
IA n = 3		28,67 ± 4,16 (24–32)	28,34 ± 3,78 (24–31)	28,67 ± 5,13 (23–33)	Ns
PIV n = 11		23,54 ± 5,80 (15–30)	24,09 ± 5,75 (17–31)	24,18 ± 5,87 (17–32)	Ns
ETV n = 53		22,13 ± 4,12 (12–29)	22,79 ± 5,53 (11–36)	23,00 ± 5,25 (12–34)	Ns

Ct: ciclos de amplificación; ETV: enterovirus; IA: Influenza A virus; Ns: no significativo; PIV: Parainfluenza virus.