

## Alergia ocupacional causada pelo veneno de serpente *Bothrops jararaca* em biólogos\*

### *Occupational allergy in biologists caused by the Bothrops jararaca snake venom*

Carlos R de Medeiros<sup>1</sup>, Kátia C Barbaro<sup>2</sup>, Marcela S Lira<sup>3</sup>, Francisco O S França<sup>4</sup>, Vera L Zaher<sup>5</sup>, Cristina M Kokron<sup>6</sup>, Jorge Kalil<sup>7</sup>, Fábio F M Castro<sup>8</sup>

#### Resumo

**Objetivos:** Desde 1930, os venenos das principais famílias de serpentes têm sido implicados como causadores de reações alérgicas. Esta condição tem sido observada em herpetologistas profissionais e amadores, entretanto, pouco se conhece a respeito da prevalência dessa doença entre esses trabalhadores, e seus determinantes. Os objetivos deste estudo foram avaliar a prevalência e os preditores da alergia ao veneno ofídico entre biólogos expostos ao veneno de *Bothrops jararaca* (VBJ), e demonstrar o envolvimento de um mecanismo IgE-mediado neste tipo de doença ocupacional.

**Métodos:** Biólogos expostos ao VBJ foram avaliados por questionários e testes imunológicos. A presença de sensibilização ao VBJ foi determinada pela quantificação da IgE-específica pelo teste *ImmunoCAP*. Os alérgenos foram caracterizados por Western blot e ensaios de inibição do *ImmunoCAP*.

**Resultados:** Dos 40 biólogos avaliados, 7 (17,5%) apresentaram IgE específica ao VBJ. Destes, seis tinham sintomas típicos de reação alérgica IgE-mediada quando expostos ao VBJ. A sensibilização ao veneno foi associada com tempo de atividade ( $P=0,016$ ), níveis elevados de IgE total ( $P=0,034$ ) e com tarefas específicas, sobretudo a limpeza de caixa de serpente ( $P=0,005$ ), alimentação de serpente ( $P=0,039$ ), extração de veneno ( $P=0,042$ ), manuseio de veneno em pó ( $P=0,033$ ) e limpeza da sala de cativeiro ( $P=0,005$ ).

**Conclusões:** A exposição ao VBJ pode resultar em alergia ocupacional em biólogos por mecanismo IgE-mediado. A prevalência desta condição parece ser elevada nesse grupo de trabalhadores e o exercício de tarefas específicas, níveis de IgE total acima de 100 kU/l e o tempo de exposição são preditores de sua ocorrência.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(6):240-246 1.Hipersensibilidade; 2.Venenos de serpentes; 3.Imunoglobulina E; 4.*Bothrops*; 5.Doenças profissionais.

#### Abstract

**Objectives:** Since 1930, venoms from the major snake families have been implicated as cause of allergic reactions. This condition has been observed in amateur and professional herpetologists. However, only limited information is available on the prevalence of the disease among those workers and their determinants. The aim of this study was to evaluate the prevalence and predictors of snake venom allergy among biologists exposed to *Bothrops jararaca* venom (BJV) and to demonstrate the involvement of IgE-mediated mechanisms in this occupational disease.

**Methods:** Biologists exposed to BJV were assessed for snake venom-related allergy using questionnaires and immunological tests. Presence of BJV sensitization was determined by quantification of specific IgE using the *ImmunoCAP* assay. Allergens were classified using the Western blots and inhibition assays.

**Results:** Of the 40 herpetologists evaluated, 7 (17.5%) presented specific IgE antibodies to BJV. Of those, 6 presented typical symptoms of an IgE-mediated allergic reaction when exposed to BJV. Venom sensitization was associated with length of employment ( $P=0.016$ ), high levels of total IgE ( $P=0.034$ ), and specific tasks, mainly snake cages cleaning ( $P=0.005$ ), snake feeding ( $P=0.039$ ), snake venom extraction ( $P=0.042$ ), handling of dried venom ( $P=0.033$ ), and snake room cleaning ( $P=0.005$ ).

**Conclusions:** Exposure to BJSV may result in occupational allergy in biologists by IgE-mediated mechanisms. The prevalence rate of this condition appears to be high among these workers and specific tasks, total IgE level above 100 kU/l, and length of employment were predictors of its occurrence.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(6):240-246 1.Hypersensitivity; 2.Snake venoms; 3.Immunoglobulin E; 4.*Bothrops*; 5.Occupational diseases.

1. Doutor Medicina pela USP, Médico Assistente do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da FMUSP, Médico Assistente do Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, São Paulo;
2. Doutora, Pesquisadora VI, Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, São Paulo;
3. Bióloga, Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, São Paulo;
4. Professor Livre-Docente, Médico Assistente do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, Diretor do Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, São Paulo;
5. Doutora, Laboratório de Investigação Médica (LIM-01) da FMUSP;
6. Doutora, Médica Assistente Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da FMUSP, Laboratório de Investigação Médica (LIM-60) da FMUSP;
7. Professor Titular e Chefa da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP;
8. Professor Livre-Docente da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.

\*Artigo ganhador do Prêmio Oswaldo Seabra no XXXIV Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia.

Artigo submetido em 01.10.2007, aceito em 24.11.2007.

## Introdução

Os venenos ofídicos estão entre os mais complexos venenos do mundo animal. Não são substâncias simples, mas compostos que contêm diversas substâncias, incluindo uma variedade de proteínas, enzimas e peptídeos, cada um com multiplicidade de efeitos em vários sistemas orgânicos<sup>1</sup>. Nas serpentes do gênero *Bothrops*, estes efeitos são caracterizados por processo inflamatório local, levando à formação de edema, bolhas e necrose no sítio da picada, e por alterações sistêmicas incluindo hemorragias, coagulopatia, insuficiência renal e distúrbios hemodinâmicos<sup>2</sup>. O gênero *Bothrops* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na América Latina, destacando-se a espécie *Bothrops jararaca* nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil<sup>2,3</sup> (figura 1).

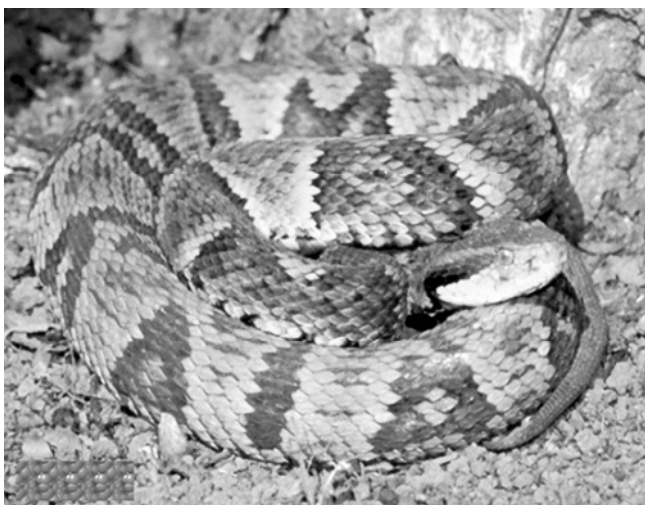


Figura 1 - *Bothrops jararaca*.

Enquanto as reações alérgicas aos venenos de outros animais, como abelhas e vespas, são bem conhecidas e extratos purificados e padronizados desses venenos estão disponíveis tanto para o diagnóstico quanto para a imunoterapia<sup>4</sup>, as reações alérgicas causadas pelos venenos ofídicos são incomuns<sup>1</sup> e, sobre estas, há poucos estudos na literatura, a maioria restringindo-se a descrições de casos clínicos.

Por outro lado, a alergia ocupacional tem sido reconhecida como um importante problema entre trabalhadores, principalmente os expostos às moléculas de alto peso molecular, que podem causar sensibilização por mecanismos IgE-mediados<sup>5</sup>. Esta condição é bem descrita em trabalhadores em contato com animais de laboratório e padeiros expostos ao trigo e à alfa-amilase<sup>5-8</sup>. Considerando o potencial alergênico dos venenos ofídicos<sup>9</sup>, a alergia a estes venenos pode ser um importante agravo ocupacional entre trabalhadores que manuseiam serpentes ou seus venenos.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a prevalência da alergia ao veneno de *Bothrops jararaca* (VBJ) entre biólogos expostos à serpente ou ao seu veneno, apontando os possíveis fatores preditores para o seu desenvolvimento, e demonstrar o envolvimento de um mecanismo IgE-mediado neste tipo de doença ocupacional.

## Métodos

### *Delineamento do estudo e população*

Um estudo do tipo observacional transversal foi realizado a partir de amostra de 40 biólogos, do total de 43, de

três unidades do Instituto Butantan, durante o mês de novembro de 2005.

O critério de inclusão no grupo de estudo foi unicamente a exposição aos venenos ou às serpentes do gênero *Bothrops*. As seguintes razões implicaram na escolha desse gênero de serpente: a importância epidemiológica dos acidentes botrópicos no Brasil e o freqüente manuseio desses animais e de seus venenos pelos profissionais do Instituto Butantan.

Todos os participantes eram adultos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto obteve prévia aprovação da comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 1039/03.

### *Questionário*

Os 40 trabalhadores foram submetidos a questionário contendo questões sobre a história pessoal de alergia, história ocupacional (tempo de atividade e tarefas específicas), acidentes sofridos com picadas de serpentes, contato de veneno em mucosas e sintomas alérgicos relacionados ao trabalho.

A história pessoal de alergia foi considerada positiva quando presente o relato de sintomas alérgicos clássicos como dispnéia, chiado no peito, coriza, espirros, lacrimejamento, prurido ocular ou prurido cutâneo, relacionados à exposição aos alérgenos comuns como poeira, animais domésticos ou mofo. Trabalhadores foram considerados tendo sintomas alérgicos relacionados ao trabalho quando responderam positivamente à questão: "Você tem sintomas de alergia (e.g., asma, rinite, conjuntivite ou urticária) quando em contato com a serpente e/ou seu veneno, durante o seu trabalho?".

Estimativas da exposição às serpentes e/ou aos seus venenos foram obtidas considerando-se cada uma das onze tarefas que os biólogos executavam no exercício profissional e que envolviam o contato direto com esses produtos. As seguintes questões foram utilizadas: "quantos dias por semana você executa ou executava [determinada tarefa]?" e "por quantos anos você vem executando ou executou [determinada tarefa]?". Para cada tarefa foi calculado um índice de exposição como uma variável contínua e obtida multiplicando-se a freqüência (dias/ano) pelo tempo de exposição (anos).

### *Determinação da IgE total e específica*

Dosagens das IgE séricas específicas para os alérgenos inalantes comuns (poeira doméstica, ácaros, fungos e epitélios de cão e gato), foram realizadas utilizando-se os testes *ImmunoCAP* (*Pharmacia Diagnostics AB*, Uppsala, Suécia) comercialmente disponíveis. Para o VBJ, foi desenvolvido um *ImmunoCAP* especialmente para este estudo pela *MIAB* (Uppsala, Suécia). Conforme as especificações do fabricante, os resultados foram considerados positivos para valores maiores que 0,35 kU/l.

As dosagens séricas da IgE total foram realizadas por nefelometria e consideradas alteradas para valores acima de 100 kU/l.

### *Critério de atopia*

Indivíduos foram considerados atópicos quando presente a história pessoal de alergia, associada à positividade a pelo menos um dos testes *ImmunoCAP* para antígenos inalantes comuns.

### *Antígenos*

Extrato bruto liofilizado de VBJ (Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, SP, Brasil) foi dissolvido em solução salina tampão PBS com pH 7,4 e estocada em freezer à temperatura de -20 °C até a sua utilização.

### Determinação da IgG específica (ELISA)

O título de anticorpos IgG anti-VBJ foi determinado pela técnica de ELISA com algumas modificações<sup>10</sup>. Para a sensibilização das placas de poliestireno, foram colocadas em cada poço 100 µl de solução contendo 10 µg/ml de VBJ, diluído em tampão alcalino. As placas foram incubadas por 18 horas, à 4 °C, e submetidas a três lavagens com PBS contendo 0,05% de Tween 20. Após a adição de 200 µl de solução bloqueadora (tampão alcalino contendo 3% de BSA) em cada poço, foram incubadas por duas horas, a 37°C. Após um novo ciclo de lavagens, adicionou-se a cada poço 100 µl dos soros (diluição inicial de 1:100) diluídos em tampão de incubação (PBS pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA) e realizada nova incubação por uma hora a 37 °C. Após três lavagens, as placas foram incubadas por uma hora a 37 °C com o conjugado imunoenzimático anti-IgG humano marcado com peroxidase, diluído (1:1000) com o tampão de incubação. Após novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição de mistura cromógena mais substrato da enzima, e interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%. A intensidade da reação foi determinada por leitura da absorbância através do leitor de placas Titertek Multiskan Plus a 492 nm. O título de anticorpos representou a recíproca da diluição máxima do soro, capaz de resultar em uma leitura de absorbância maior que 0,050.

### Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (SDS-PAGE) e Western blots

As proteínas do VBJ foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli<sup>11</sup>, utilizando-se o gel de empacotamento e o gel de resolução nas concentrações de 4% e 12,5%, respectivamente. Nesse processo, alíquotas de veneno (5 µg) foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (tampão TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% de SDS, 20% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol), e aplicadas no gel. Uma parte do gel foi corada com *Coomassie blue* e outra parte foi transferida para uma membrana de nitrocelulose sob corrente constante de 385 mA, durante duas horas, de acordo com a técnica descrita por Towbin *et al*<sup>12</sup>.

Para a caracterização imunoenzimática das proteínas presentes na membrana de nitrocelulose, tiras de 5 mm foram incubadas previamente durante uma noite com solução bloqueadora (tampão TRIS-salina pH 7,5 contendo 5% de leite em pó desnatado Molico-Nestlé-SP), a 4°C, e depois com soros dos pacientes diluídos (1:4) em solução bloqueadora por duas horas, à temperatura ambiente. Após lavagem com TRIS-salina, foram incubadas com conjugado anti-IgE humano marcado com peroxidase (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO, USA), diluído (1:100) em solução bloqueadora, por duas horas, à temperatura ambiente, e os componentes antigênicos revelados pela adição do cromógeno, em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%. A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água.

Como controles negativos, foram utilizados soros de voluntários que nunca haviam entrado em contato com serpentes ou seus venenos.

### Ensaio de inibição da IgE específica (inibição do ImmunoCAP)

Para o ensaio de inibição da IgE VBJ- específica, utilizou-se o teste de inibição do RAST com algumas modificações<sup>13-14</sup>. Resumidamente, amostras de 75µl de soros de dois indivíduos com altos níveis de IgE VBJ- específica (*ImmunoCAP* > 100 kU/l) foram incubadas separadamente com alíquotas de 225µl dos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus durissus durissus*, diluídos em PBS, em concentrações finais variando de 5 mg/ml até 5 pcg/ml, a 37 °C, por

uma hora. Em seguida, a IgE VBJ- específica foi quantificada em cada alíquota pelo teste *ImmunoCAP*.

A porcentagem de inibição foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = (1 - F_s / F_a)$$

onde: **F<sub>s</sub>** é o valor da fluorescência obtida com soro sem a incubação prévia com o veneno, e **F<sub>a</sub>** é o valor da fluorescência da amostra de soro incubada previamente com veneno.

### Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das distribuições dos valores das variáveis numéricas. O grau de associação entre a presença de sintomas alérgicos e a presença de sensibilização ao VBJ (i.e., *ImmunoCAP* positivo) foi estabelecido empregando-se o teste de Fischer, assim como para o estabelecimento de associações entre o desenvolvimento da sensibilização e a maioria dos fatores preditores. O *V de Cramér* foi utilizado como medida dos graus dessas associações. A associação entre o tempo de exposição ocupacional e o desenvolvimento de sensibilização ao VBJ foi verificada através da análise de variância de um fator (ANOVA). Para a análise de correlação entre os resultados da IgE-específica (*ImmunoCAP*) e da IgG-específica (ELISA) para o VBJ foi empregado o coeficiente de correlação de Spearman (*r<sub>s</sub>*). Para o estabelecimento das associações entre os índices de exposições, relacionados ao exercício das tarefas específicas, e a sensibilização ao VBJ, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Todos os valores de *P* mencionados neste artigo foram baseados em hipóteses bilaterais, e os valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

O pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows (versão 13.0, 2004; *Statistical Products and Service Solution Inc.*, Chicago, IL, USA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

### Resultados

Dos 40 trabalhadores, 21 (52,5%) eram do gênero feminino. A média de idade do grupo foi de 34,3 ± 11,5 anos, e o tempo total de atividade no emprego variou de um a 35 anos (mediana 4,5 anos). Dezesete (42,5%) indivíduos foram considerados atópicos, 18 (45,0%) apresentaram IgE sérica total acima de 100 kU/l, e dez (25,0%) referiram sintomas alérgicos quando expostos ao VBJ.

#### Grupo de trabalhadores sensibilizados ao veneno

As características dos indivíduos sensibilizados ao VBJ são apresentadas na tabela 1. Dos 40 trabalhadores, sete (17,5%) apresentaram *ImmunoCAP* positivo para VBJ, com valores variando entre 0,4 kU/l e acima de 100 kU/l. Destes, seis tinham história positiva de sintomas alérgicos relacionados à exposição ao VBJ. O único com história negativa tinha, no entanto, conjuntivite relacionada à exposição ao veneno de *Crotalus durissus* (cascavel). Foi demonstrada associação positiva entre *ImmunoCAP* positivo para VBJ e sintomas alérgicos relacionados à sua exposição (*P* < 0,001, *V* = 0,65). Os títulos de IgG específica ao VBJ foram positivos em nove indivíduos e variaram entre 80 e 1280; seis destes tinham sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno. Foi observada correlação positiva entre os níveis séricos de IgG e do *ImmunoCAP* venenos-específicos (Spearman *r<sub>s</sub>* = 0,74, *P* < 0,001).

**Tabela 1** - Trabalhadores sensibilizados ao veneno de *Bothrops jararaca*: sintomas, título de IgG específica e resultados do teste *ImmunoCAP*

Trabalhador	IgE* específica <i>B. jararaca</i> ( <i>ImmunoCAP</i> )	IgG† específica <i>B. jararaca</i> (ELISA)	Sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno de <i>B. jararaca</i>
1	0,85	160	Nenhum‡
4	12,4	320	Rinite
8	0,4	-	Rinite, urticária
13	> 100	320	Urticária
28	8,85	80	Rinoconjuntivite, asma, urticária
31	> 100	1280	Anafilaxia
40	40,9	160	Anafilaxia

\* kU/l;

† Título: recíproca da diluição máxima do soro capaz de resultar em leitura de absorvância maior que 0,100 a 492 nm; (-) para valores &lt; 40;

‡ Conjuntivite desencadeada pelo veneno de *Crotalus durissus*.**Indivíduos sensibilizados X não sensibilizados**

A tabela 2 mostra a comparação entre os indivíduos que apresentaram *ImmunoCAP* positivo para o VBJ (sensibilizados) e os que apresentaram o teste negativo (não sensibilizados).

Pela ANOVA foi verificada associação positiva e significativa entre o tempo de exposição ocupacional (após trans-

formação logarítmica) e o desenvolvimento de sensibilização ao VBJ [ $F(1,38)=6,3$ ,  $P=0,016$ ]. Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de atopia e *ImmunoCAP* positivo para VBJ ( $P=0,113$ ,  $V=0,27$ ). Por outro lado, associação positiva e significativa foi observada entre *ImmunoCAP* positivo para o VBJ e níveis séricos de IgE total acima de 100 kU/l ( $P=0,033$ ,  $V=0,38$ ).

**Tabela 2** - Comparação entre os trabalhadores não sensibilizados (*ImmunoCAP* negativo) com aqueles sensibilizados (*ImmunoCAP* positivo) ao veneno de *Bothrops jararaca*

	Não sensibilizados	Sensibilizados
Número de indivíduos	33	7
Tempo de atividade (anos): mediana, (intervalo interquartil)	3 (2-13,5)	14 (9-30)
Sexo: M/F (n)	14/19	5/2
Atopia*: n (%)	12 (36,6)	5 (71,4)
IgE > 100kU/L: n (%)	12 (36,6)	6 (85,7)
Sintomas relacionados ao trabalho: n (%)	4 (12,1)	6 (85,7)
Rinite: n (%)	3 (9,1)	5 (71,4)
Conjuntivite: n (%)	3 (9,1)	3 (42,9)
Asma: n (%)	1 (3,0)	3 (42,9)
Urticária: n (%)	3 (9,1)	5 (71,4)
Picada de serpente: n (%)	6 (18,2)	2 (28,6)
Contato do veneno com mucosas: n (%)	6 (18,2)	2 (28,6)

F = feminino; M = masculino.

\* Atopia definida como a presença de história pessoal de alergia e pelo menos um teste *ImmunoCAP* positivo para os inalantes comuns.**Sintomas alérgicos relacionados ao trabalho**

Correlações positivas foram demonstradas entre a presença de *ImmunoCAP* positivo para VBJ e rinite ( $P=0,002$ ,  $V=0,59$ ), urticária ( $P=0,002$ ,  $V=0,59$ ) e sintomas asmáticos ( $P=0,013$ ,  $V=0,50$ ), porém não em relação à conjuntivite ( $P=0,055$ ,  $V=0,36$ ).

**Acidentes por picadas de serpente e por contato do veneno em mucosas**

Dos 40 biólogos, oito (20,0%) já tinham sido picados por serpentes do gênero *Bothrops* e oito (20,0%) já tinham sofrido contato do veneno com mucosas (olhos ou boca). No entanto, não foram encontradas associações entre a presença de *ImmunoCAP* positivo para o VBJ e

acidentes por picadas ( $P=0,611$ ,  $V=0,10$ ) ou por contato de veneno com mucosas ( $P=0,611$ ,  $V=0,10$ ). Também não houve associação entre a presença de IgG veneno-específica e acidentes por picadas ( $P=0,348$ ,  $V=0,18$ ).

**Índices de exposição**

A associação entre os índices de exposições relacionados a cada tarefa específica e a presença de *ImmunoCAP* positivo para o VBJ foi verificada pela aplicação do teste de Mann-Whitney (tabela 3). Algumas tarefas tiveram associação positiva com a sensibilização ao VBJ: "limpeza de caixa de serpente", "alimentação de serpente", "extração de veneno", "manuseio de veneno em pó" e "limpeza de sala de cativeiro".

**Tabela 3** - Associações entre os índices de exposições relacionados às tarefas específicas e à sensibilização ao veneno de *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP* positivo)

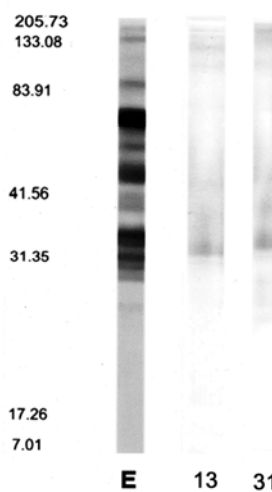
Tarefa específica	Índices de exposição (intervalo interquartil)		Mann-Whitney U teste		
	Sensibilizado	Não sensibilizado	U	z	P
Limpeza de caixa de serpente	1584 (1368-4800)	240 (96-1224)	15,5	2,78	0,005
Alimentação de serpente	192 (96-2208)	48 (24-312)	28,0	2,06	0,039
Extração de veneno	342 (57-1884)	12 (2-96)	18,0	2,03	0,042
Manuseio de veneno líquido	60 (30-1464)	48 (9,5-516)	35,5	0,55	0,583
Manuseio de veneno em pó	1104 (300-1704)	84 (4,5-672)	6,5	2,13	0,033
Limpeza de sala de catifeiro	1200 (648-3120)	180 (48-348)	10,0	2,87	0,005
Fixação de serpente	12 (12-12)	96(48-288)	1,5	1,39	0,163
Captura de serpente	22,5 (13,5-31,5)	12 (4-30)	28,0	1,04	0,298
Recepção de serpente	1056 (1056-1056)	288 (96-2040)	3,0	0,64	0,522
Limpeza de catifeiro	576 (576-576)	144 (72-576)	1,0	0,93	0,351
Dissecção de serpente	384 (384-384)	288 (96-1440)	3,0	0,22	0,827

**Identificação dos alérgenos**

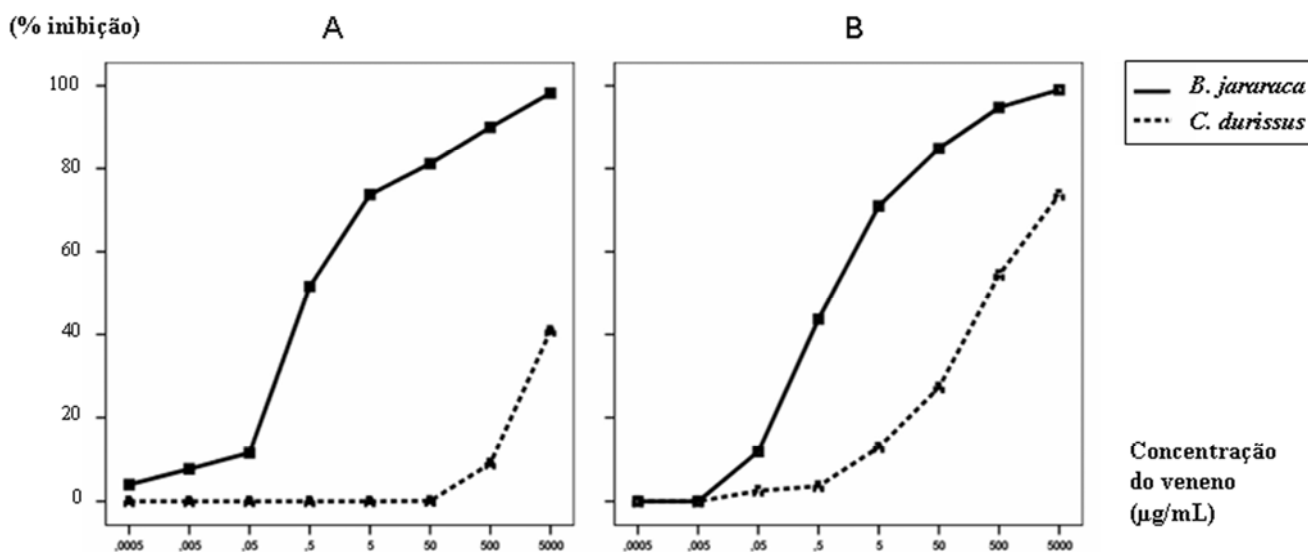
Para estabelecer os padrões de ligação da IgE específica aos componentes do VBJ, as proteínas do veneno foram inicialmente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e submetidas aos ensaios de *Western Blots*. Diferentes componentes de vários pesos moleculares, variando entre aproximadamente 30 a maior que 205 kDa, foram reconhecidos pela IgE (figura 2) presentes nos soros dos trabalhadores nº 13 e nº 31 (*ImmunoCAP* > 100 kU/l). Nos dois casos, um componente de aproximadamente 32 kDa foi reconhecido com maior intensidade. Nenhum dos soros utilizados como controle negativo reagiu com os componentes do veneno.

**Inibição do ImmunoCAP**

O teste de inibição do *ImmunoCAP* foi realizado utilizando-se os soros dos trabalhadores nº 13 e nº 31. A figura 3 mostra que a inibição foi total com o VBJ e parcial com o *Crotalus durissus*.



**Figura 2** - *Western blot* das proteínas do veneno de *Bothrops jararaca* com anti-IgE e soro dos trabalhadores nº 13 e nº 31. Os números à esquerda indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. (E) eletroforese do veneno de *Bothrops jararaca*



**Figura 3** - Inibição do *ImmunoCAP*. Inibição das dosagens dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP*) observada no soro dos trabalhadores nº 13 (A) e nº 31 (B) após absorção com diferentes concentrações do veneno botrópico (linha cheia) e veneno crotálico (linha pontilhada)

## Discussão

O primeiro caso de sensibilização alérgica ao veneno ofídico descrito data de 1930<sup>15</sup> e, desde aquela época, os venenos de todas as principais famílias de serpentes têm sido implicados como causadores de reações alérgicas<sup>1,15</sup>. O desenvolvimento deste tipo de hipersensibilidade tem sido descrito após recorrentes exposições aos venenos através de picadas<sup>14,16-20</sup> e, presumivelmente, de repetidas inalações ou contato desses venenos com a pele ou membranas mucosas<sup>1,16,21-28</sup>. Esta condição tem sido observada entre profissionais que manuseiam as serpentes e/ou os seus venenos, mas pouco se conhece a respeito da prevalência dessa doença entre esses trabalhadores, seus determinantes, extensão de reações cruzadas entre os diferentes venenos ofídicos e natureza molecular dos alérgenos envolvidos.

O diagnóstico da hipersensibilidade ao veneno ofídico é baseado em dois critérios: história clínica que relaciona temporalmente a reação alérgica com o contato com o veneno, e a detecção de anticorpos IgE venenos-específicos por testes cutâneos ou de testes sorológicos. Embora descrito na literatura médica o uso de testes cutâneos para o diagnóstico da alergia aos venenos de serpentes<sup>9,14,18</sup>, eles não foram utilizados neste estudo devido à inerente toxicidade do VBJ, que mostra exuberante atividade inflamatória local, além da possibilidade do desencadeamento de reações anafiláticas com um antígeno não padronizado para o uso clínico. Para a detecção "in vitro" de anticorpos IgE específicos ao VBJ, optou-se pelo desenvolvimento de um teste *ImmunoCAP*, por ser um dos testes mais sensíveis para a detecção de IgE específica disponíveis para a prática clínica<sup>29</sup>.

Dos 40 trabalhadores expostos, em sete foi constatada a presença de IgE VBJ-específica (prevalência = 17,5%). No entanto, este valor de prevalência pode estar subestimado, pois é possível que alguns indivíduos não tenham feito parte da amostra por já terem abandonado a atividade devido à gravidade dos sintomas alérgicos relacionados ao trabalho.

Seis dos sete trabalhadores com *ImmunoCAP* positivo referiram sintomas típicos de reações alérgicas IgE-mediadas quando expostos ao VBJ. O único desses sete que a que não referiu sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o VBJ, referiu, no entanto, sintomas com o veneno de cascavel (gênero *Crotalus*). Isto pode indicar a presença de alérgenos comuns aos venenos dos dois gêneros de serpentes (ambos pertencentes à família *Viperidae*), como anteriormente sugerido por Mendes et al.<sup>24</sup>. Foi demonstrada correlação positiva entre a presença de sintomas alérgicos relacionados à exposição ao VBJ e o teste *ImmunoCAP* positivo ( $P < 0,001$ ). Isto sugere que o teste sorológico *ImmunoCAP*, altamente reprodutível e facilmente disponível para uso clínico, possa ser utilizado rotineiramente para a monitorização de indivíduos expostos ao VBJ.

Associação positiva e estatisticamente significativa foi observada entre a sensibilização ao VBJ e a referência de sintomas alérgicos de urticária, rinite e asma. Entretanto, esta associação não foi verificada com sintomas de conjuntivite. Provavelmente alguns sintomas de conjuntivite relatados foram provocados pela ação inflamatória local do VBJ<sup>2,3</sup> e não por mecanismos IgE-mediados.

Diversos estudos têm mostrado que a intensidade de exposição aos alérgenos, o nível sérico elevado de IgE total e a história pessoal de atopia são fatores predisponentes de sensibilização em outras doenças alérgicas ocupacionais como a hipersensibilidade a proteínas de alto peso molecular em trabalhadores expostos aos animais de laboratório e em padeiros<sup>5-8</sup>. Neste presente estudo, foi possível demonstrar a associação entre a sensibilização ao VBJ e o tempo total de trabalho na atividade ( $P = 0,016$ ), que pode

ser considerado um indicador simples da intensidade acumulativa de exposição, e o nível sérico de IgE total maior que 100 kU/l ( $P = 0,033$ ), mas não com a presença de atopia ( $P = 0,113$ ), provavelmente devido ao número relativamente pequeno de participantes.

Este é o primeiro estudo a descrever relações entre o desenvolvimento de sensibilização ao veneno ofídico e níveis de exposição, por análises das diversas tarefas associadas ao manuseio das serpentes e/ou seus venenos, e dos acidentes decorrentes de picadas ou do contato do veneno com membranas mucosas. Aqui foi demonstrada associação com significância estatística entre a sensibilização ao VBJ e as tarefas "limpeza de caixa de serpente" ( $P = 0,005$ ), "alimentação de serpente" ( $P = 0,039$ ), "extração de veneno" ( $P = 0,042$ ), "manuseio de veneno em pó" ( $P = 0,033$ ) e "limpeza de sala de catifeiro" ( $P = 0,005$ ). Estes dados estão de acordo com alguns casos clínicos descritos na literatura que sugerem o contato direto por via inalatória, sobretudo com o veneno em pó, como possível via de sensibilização alérgica ao veneno ofídico<sup>1,16,21-26</sup>. Quanto aos acidentes provocados pelas picadas das serpentes e os pelo contato do veneno com as membranas mucosas, apontados como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno ofídico em algumas descrições de casos clínicos publicadas<sup>14,16-20,27,28</sup>, não foram verificadas estas associações neste estudo.

Por outro lado, a aplicação da técnica de ELISA no estudo de venenos ofídicos tem permitido a identificação de anticorpos antiveneno da classe IgG no soros de pacientes picados pelas serpentes peçonhentas<sup>10,30</sup>. Entretanto, a associação entre a história de acidentes por picadas de serpentes e títulos séricos de IgG VBJ-específica não foi comprovada neste estudo. É provável que os níveis séricos de IgG VBJ-específica sejam decorrentes de outras vias de sensibilização, como a inalação e o contato repetitivo das membranas mucosas com o veneno. Em seis dos sete trabalhadores com sensibilização alérgica ao VBJ, detectou-se a presença de IgG veneno-específica, o que já tinha sido observado em outros estudos<sup>1,9,20</sup>.

Pela técnica de eletroforese em gel de poliácridamida o VBJ foi decomposto em numerosas proteínas. Após a realização do *Western blot*, utilizando-se amostras de soros dos trabalhadores nº13 e nº31, observou-se que os anticorpos séricos da classe IgE reconheceram diversos componentes do VBJ. Nos dois casos, um componente de aproximadamente 32 kDa foi reconhecido com maior intensidade pelos anticorpos, podendo ser um dos alérgenos principais presentes no veneno. Naturalmente, isto precisará ser demonstrado com as amostras de soros de outros trabalhadores sensibilizados.

Os ensaios de inibição do *ImmunoCAP* para o VBJ mostraram inibição completa com o VBJ, confirmando a especificidade da reação positiva do *ImmunoCAP*. O veneno de *Crotalus durissus*, por sua vez, produziu uma inibição parcial, sugerindo a existência de alérgenos comuns entre os dois venenos. Estes achados estão de acordo com as observações de Mendes et al.<sup>24</sup>, que sugeriram a ocorrência dessa reação cruzada ao verificarem, por testes cutâneos de transferência passiva, a existência de pacientes com teste positivo com venenos que nunca haviam tido contato prévio. Alonso et al.<sup>20</sup>, com o RAST de inibição, também sugeriram a existência de epitopos comuns entre esses venenos, entretanto, estes achados merecem futuras investigações.

Finalmente, a extrema toxicidade do VBJ provavelmente torna inviável o tratamento dos trabalhadores sensibilizados com imunoterapia, da forma como é realizada hoje para o tratamento dos pacientes alérgicos às picadas de *Hymenoptera*<sup>1,9</sup>. Sendo assim, a inexistência de um tratamento de dessensibilização eficaz e seguro, tornam fundamentais as medidas de vigilância médica e de prevenção à

exposição ocupacional aos venenos no ambiente de trabalho. Os trabalhadores reconhecidamente alérgicos aos venenos ofídicos devem ser encorajados a evitar qualquer futuro contato com as serpentes e/ou seus venenos. Caso isto não seja possível, devem ser orientados quanto às medidas preventivas de exposição (uso de equipamentos de proteção individual como luvas, botas, aventais, gorros e máscaras apropriadas, além de medidas de controle ambientais), conscientizados quanto à possibilidade de reações alérgicas graves, como a anafilaxia, e treinados a utilizar kits de auto-administração de adrenalina<sup>27</sup>.

Concluindo, este estudo sugere que o VBJ pode ser considerado uma fonte potencial de alérgenos para o desenvolvimento de alergia ocupacional em biólogos que manuseiam as serpentes e/ou os seus venenos. A prevalência desta doença parece ser alta neste grupo de trabalhadores. Foi demonstrado o envolvimento de mecanismo de hipersensibilidade IgE-mediado na sua gênese. O desempenho de tarefas envolvendo o contato íntimo como a serpente ou com o seu veneno, como a limpeza da caixa de serpente, a alimentação da serpente, a extração do veneno, o manuseio do veneno em pó e a limpeza da sala de cativeiro, são fatores de exposição predisponentes ao desenvolvimento desta sensibilização.

## Referências

1. Wadee AA, Rabson AR, Path MCR. Development of specific IgE antibodies after repeated exposure to snake venom. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:695-8.
2. França FOS, Barbaro KC, Fan HW, Cardoso JLC, Sano-Martins IS, Tomy SC et al. Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia and severity on admission to hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:312-7.
3. Fan HW, Cardoso JLC. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meir J, White J, editors. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Florida: CRC Press; 1995. p. 667-88.
4. Hamilton RG. Diagnostic methods for insect sting allergy. *Curr Opin Clin Immunol* 2004;4:297-306.
5. Suarathana E, Vergouwe Y, Nieuwenhuijsen M, Heederik D, Grobbee DE, Meijer E. Diagnostic model for sensitization in workers exposed to occupational high molecular weight allergens. *Am J Ind Med* 2005;48:168-74.
6. Houba R, Doekes G, Heederik D. Occupational respiratory allergy in bakery workers: a review of the literature. *Am J Ind Med* 1998;34:529-46.
7. Nieuwenhuijsen MJ, Heederik D, Doekes G, Venables KM, Newman Taylor AJ. Exposure-response relations of alpha-amylase sensitisation in British bakeries and flour mills. *Occup Environ Med* 1999;56:197-201.
8. Nieuwenhuijsen MJ, Putcha V, Gordon S, Heederik D, Venables KM, Cullinan P et al. Exposure-response relations among laboratory animal workers exposed to rats. *Occup Environ Med* 2003;60:104-8.
9. Kopp P, Dahinden CA, Müllner G. Allergic reaction to snake venom after repeated bites of *Vipera aspis*. *Clin Exp Allergy* 1993;23:231-2.
10. Theakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom antibody. *Lancet* 1977;24:639-41.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
12. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
13. Yunginger JW, Adolphson CR, Gleich GJ. Technical performance and clinical use of the RAST inhibition assay. *J Clin Immunology* 1983;6:155-9.
14. Reimers AR, Weber M, Müller UR. Are anaphylactic reactions to snake bites immunoglobulin E-mediated? *Clin Exp Allergy* 2000;30:276-82.
15. Zozaya J, Stadelman RE. Hypersensitivity to snake venom proteins. A case report. *Bull Antivenin Inst Am* 1930;3:93-5.
16. Parrish HM, Pollard CB. Effects of repeated poisonous snake-bites in man. *Am J Med Sci* 1959;20:257-86.
17. Lounsbury CR. Rattlesnake anaphylaxis associated with dermatitis. *Arch Dermat and Syph.* 1934;29:658-67.
18. Hogan DE, Dire DJ. Anaphylactic shock secondary to rattlesnake bite. *Ann Emerg Med* 1990;19:1814-6.
19. Ryan KC, Caravati EM. Life-threatening anaphylaxis following envenomation by two different species of Crotalidae. *J Wilderness Med* 1994;5:263-8.
20. Alonso A, Scavini LM, Marino GA, Rodríguez SM. IgE antibodies against snake venoms. *J Invest Allerg Clin Immunol* 1995;5:31-4.
21. Barros EF. Contribuição ao conhecimento da hiper-sensibilidade ao veneno ofídico. *Brasil Médico* 1936;50:243-6.
22. Mendes E. Alergia ao veneno botrópico e crotálico. *O Hospital* 1950;38:175-7.
23. Stanic M. Allergenic properties of venom hypersensitivity in man and animals. In: Buckley E, Porges N, editors. *Venoms*. Washington: American Association for the Advancement of Science; 1956. p. 181-8.
24. Mendes E, Cintra AU, Corrêa A. Allergy to snake venoms. *J Allergy* 1960;31:68-73.
25. Ellis EF, Smith RT. Systemic anaphylaxis after rattlesnake bite. *JAMA* 1965;193:151-2.
26. Kelly JF, Patterson R. Allergy to snake venom: the use of radioimmunoassay for the detection of IgE antibodies against not suitable for cutaneous tests. *Clin Allergy* 1973;3:385-8.
27. Brooks DE, Graeme KA. Airway compromise after first rattlesnake envenomation. *Wilderness Environ Med* 2004;15:188-93.
28. Prescott RA, Potter PC. Hypersensitivity to airborne spitting cobra snake venom. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005;94:600-3.
29. Williams BB, Barnes JH, Szeinbach SL, Sullivan T. Analytical precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1221-30.
30. Theakston RDG. The application of immunoassay techniques, including enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon* 1983;21:341-52.

Correspondência:  
Dr. Carlos Roberto de Medeiros  
Hospital Vital Brazil – Instituto Butantan  
Av. Vital Brazil, 1500,  
05503-900 - São Paulo - SP  
Fone/fax: 55-11-37267962  
Email: carlosmedeiros@butantan.gov.br