

ARTIGO ORIGINAL

Parâmetros inflamatórios do teste cutâneo por puntura determinados por fotografia digital e termometria cutânea*

Evaluation of skin prick test using digital photography and skin infrared thermography

Rosalay V. dos Santos¹, Nelson A. Rosário Filho², Hermênio C. Lima³

Resumo

Objetivo: Empregar novos recursos na leitura do prick test pela fotografia digital e variação da temperatura através de câmera infravermelha.

Método: Estudo experimental. Determinação da área da pápula e intensidade do eritema por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus* por puntura, face volar do antebraço de 93 voluntários de diferentes fototipos. Câmera digital fixada e fotografias à mesma distância, 0, 3, 5, 10, 15 e 20min. Círculo como referência de área próximo ao teste. Fotografias armazenadas e dados determinados pelo Adobe Photoshop. Área da pápula determinada por filtros. Intensidade e luminosidade das cores comparadas com área normal. Leitura feita por medida do diâmetro médio e pela reação transferida à fita adesiva e analisada por computador. Filmagem do local do teste com câmera infravermelha.

Resultados: Aumento na área da pápula por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus*, sem diferença entre as curvas ($p=0,73$). Ponto máximo de proximidade entre as curvas no 10 min, com área média da pápula de 27,47mm² e 30,7mm², respectivamente. Cor vermelha variou significativamente quando comparada à pele normal. Intensidade do vermelho variou de $0,38 \pm 2,57$ a $8,26 \pm 3,48$ ($p < 0,001$). Cor verde reduziu ao mesmo tempo. Aumento na temperatura de ± 2 C ao 20 min de observação, com curvas semelhantes àquelas da área da pápula.

Conclusão: Fotografia digital permite medida objetiva da área da pápula e intensidade do eritema. Este método poderá ser usado para avaliar intensidade de

Abstract

Objective: The present study was to apply the digital photography and skin thermography for objective evaluation of prick test.

Methods: Histamine and *Dermatophagoides pteronyssinus* was used on the forearm of volunteers with different phototypes. The camera was held at a fixed distance and digital photos of wheal and flare were obtained at 0, 3, 5, 10,15 and 20 min. All pictures were stored and data determined by Adobe Photoshop®. Briefly, a circle with a known area was used for size reference. The wheal area was determined by several filter masks and selected by the magic wand tool of the software. Basic colors intensity and brightness of the flare were compared to that of a normal skin area.

Results: The computer analysis of the wheal size obtained showed the increase these values with maximum point between histamine and allergen at 10 min (27,47 and 30,7 mm²). Regarding color intensity, the red color varied significantly during the reaction. Intensity of red varied from $0,38 \pm 2,57$ to $8,26 \pm 3,48$ at 10 min ($p < 0,001$). However, the green color reduced over time. The skin temperature increased during 20 min. Similar data were observed with increased of the wheal size.

Conclusions: The digital photography has allowed an objective method for evaluation of skin test reactions. The intensity of erythema and the increase of temperature looks like the increase of the wheal size.

* Trabalho agraciado com o Prêmio Oswaldo Seabra no XXX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia, 2003.

inflamação cutânea. Intensidade do eritema e aumento da temperatura parecem ser diretamente proporcionais ao aumento da área da pápula.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(1):02-09
Prick test; fotografia digital; termometria cutânea, histamina; *Dermatophagoides pteronyssinus*; hipersensibilidade tipo I.

1 - Mestranda em Pediatria; 2 - Professor Titular de Pediatria da universidade federal do Paraná; 3 - Professor Adjunto da Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná e Pesquisador do Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Criança (CEGEMPAC).

Introdução

O prick test é o método mais rápido, barato e sensível para o diagnóstico de atopia e é a principal ferramenta para avaliação de hipersensibilidade imediata. É geralmente feito na face volar do antebraço e praticamente sem efeitos colaterais. O teste detecta a presença de anticorpo IgE específico contra um antígeno na superfície dos mastócitos. A inoculação de pequena quantidade do alérgeno na pele resulta na liberação de histamina e, por fim, na reação tríplice de Lewis na pele.

O resultado é determinado pelo tamanho da pápula, que é interpretado como a intensidade da reação. Alguns autores consideram também o eritema na determinação da reatividade cutânea¹. Existem três métodos para avaliação da pápula usados rotineiramente. A comparação visual da área da pápula induzida por aeroalérgeno com àquela por histamina, a medida do diâmetro mais longo e do perpendicular a este, tanto para pápula quanto para eritema² e a transferência dos contornos da pápula e eritema através de fita transparente e cálculo da área por planimetria³.

Apesar da simplicidade do procedimento, há alguns problemas relacionados ao teste, entre eles a reprodutibilidade, imprecisão na avaliação do tamanho das pápulas de contorno circular⁴, a detecção visual do eritema em peles melanodérmicas, e subjetividade. Além do mais, costuma-se desprezar os outros componentes desta reação, tais como prurido e temperatura, como índices de avaliação e que podem ter importância clínica. Por exemplo, demonstrou-se que a intensidade da reação correlaciona-se com o aumento da temperatura local sobre o eritema utilizando um termômetro cutâneo elétrico. Existe, portanto,

This method can be used for interpretation of the skin test in dark skin patients and for evaluation of cutaneous inflammation.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(1):02-09
digital photography, skin infrared thermography, histamine, type I hypersensitivity.

a necessidade de implementação de nova técnica para determinação da resposta cutânea induzida por este teste que seja mais objetiva, reprodutível e que aumente a sensibilidade e especificidade do teste.

Pelos motivos acima descritos, resolvemos avaliar componentes da reação inflamatória induzidos pelo teste cutâneo por puntura por técnica desenvolvida utilizando-se a fotografia digital. Esta técnica apresenta a vantagem da rapidez, reprodutibilidade, análise objetiva, precisão e documentação. Outro método, a termometria cutânea, foi utilizado para averiguar a variação da temperatura cutânea com as mesmas vantagens mencionadas anteriormente. Assim, este trabalho demonstra e avalia novas implementações na técnica de análise e determinação de doenças mediadas por IgE, e permite a incorporação de parâmetro ainda não estudado no contexto clínico.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi descrever e avaliar um método novo, preciso e prático de determinação da resposta cutânea à reação por puntura em pele de pacientes de qualquer fototipo.

Material e métodos

Pacientes

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética. Consentimento informado foi obtido previamente ao teste em todos os indivíduos ou de seus responsáveis. Setenta e três voluntários adultos jovens e 20 crianças, estas em acompanhamento ambulatorial de pneumologia pediátrica, fizeram parte do estudo para avaliação do teste cutâneo por fotografia digital, e 15 voluntários adultos para determinação da temperatura local por termometria infravermelha. Todos eles negaram uso recente de anti-histamínicos ou outras drogas que pudessem interferir na leitura do teste. O fototipo foi determinado baseado na classificação de Fitz-

patrick. Os testes cutâneos foram executados pela manhã e no mesmo local entre os adultos e no ambulatório de pneumologia pediátrica entre as crianças, no período da tarde, em diferentes dias.

Fotografias e testes

As fotografias foram realizadas com câmera digital Olympus 650C sempre à mesma distância entre a lente e a pele. Um círculo foi utilizado como referência de área em um local próximo a realização do teste. Em todos os testes, uma gota de histamina (10mg/mL), uma de solução salina e uma gota de extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* foram colocadas na face volar do antebraço esquerdo dos voluntários, com distância mínima de 2cm entre elas, as quais foram introduzidas na epiderme por puntura com agulha 26-gauge em ângulo de 45° com a superfície da pele. Fotografias digitais foram feitas em 0, 3, 5, 10 e 15 e 20 minutos. A seguir, realizada a leitura do teste por régua milimetrada e transparente para medida do diâmetro médio e os contornos da reação transferidos à uma fita adesiva transparente. Foi realizada a filmagem da face volar do antebraço com uma câmera infravermelha de alta sensibilidade na região do teste por 20 minutos.

Avaliação da pápula

Para avaliação da pápula, uma área ao redor do prick test foi selecionada. A área da pápula foi determinada por vários filtros e selecionada com uma caneta do software. Uma correlação matemática foi usada comparando a quantidade de pixels da área da pápula com os da área conhecida. A área de cada pápula nos diferentes pontos de análise foi assim obtida. Os resultados foram expresso em média \pm desvio padrão.

Teste de reprodutibilidade

Avaliação de reprodutibilidade foi feita intra-observador e interobservadores. Na primeira avaliação, duas determinações foram realizadas pelo mesmo observador, com intervalo de três meses entre a leitura e sem conhecimento dos valores prévios. Na avaliação interobservadores, os resultados de um dos autores foram comparados a determinações de outros três observadores. Um deles médico, alergista, dermatologista e especialista em fotografia digital com experiência de uso do software, e dois não médicos, com e sem experiência com o programa de computador.

Teste de acurácia

Os resultados obtidos pela fotografia digital foram comparados com a determinação da área pela fita adesiva e a medida do diâmetro médio em mm. A determinação da área pela fita adesiva foi feita sempre pelo mesmo observador e seguiu-se com utilização de metodologia previamente descrita com pequenas modificações³. A medida do diâmetro médio foi realizada por dois observadores no mesmo tempo do teste.

Avaliação do eritema

A intensidade do eritema foi determinada em 20 voluntários adultos na área da reação induzida por histamina. Para análise, o espectro da intensidade do vermelho, azul e verde varia de 0 a 255 pelo software. A média das intensidades das cores determina a luminosidade de cada pixel. Por exemplo, preto significa vermelho, azul e verde iguais a zero, enquanto branco significa vermelho, verde e azul iguais a 255. Os resultados foram comparados com uma área adjacente não afetada pela vasodilatação induzida pela histamina e/ou DP. Para cada parâmetro determinado, a mediana do histograma foi subtraída dos valores de controle. As diferenças das cores básicas foram corrigidas pela luminosidade e avaliadas em relação ao tempo. A diferença da intensidade da cor para cada tempo de observação foi expressa em média \pm desvio padrão.

Avaliação da temperatura

Filmagem na região do teste por 20 minutos em ambiente controlado, sem corrente de ar, temperatura ambiente de 22°C e umidade relativa do ar em 50%. A gravação da imagem digital foi feita em 14 bits em tempo real. Os dados foram acumulados em software específico e a intensidade da temperatura determinada em relação aos valores basais.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo software Statistica (statsoft, USA) e JMP (SAS Institute, USA). Testes paramétrico (teste t de student), não paramétrico (Wilcoxon) e ANOVA para medidas repetidas foram aplicados dependendo da análise. Significância estatística para comparação dos dados foi expressa em valores de p, com significância aceitável nos valores menores e/ou iguais a 0.05.

Resultados

Caracterização da população

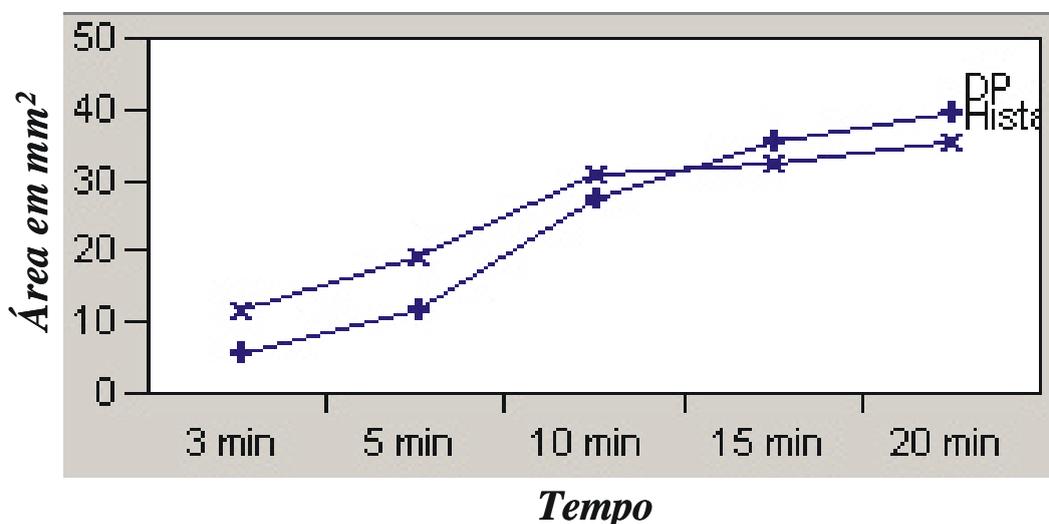
Teste cutâneo por puntura foi analisado em noventa e três voluntários. Setenta e seis deles (76/93) foram classificados como fototipo II ou III e cinco deles eram fototipo V na classificação de cor de pele feita por Fitzpatrick⁵. A média de idade foi de 20,2 anos. Trinta voluntários apresentaram positividade ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, com média de idade de 16 anos e fototipo mais freqüente do tipo III. Entre os voluntários com apenas histamina positiva, a média de idade foi 22,1 anos, sendo mais comum o fototipo III. Houve diferença estatisticamente significativa da positividade ao *Dermatophagoides pteronyssinus* entre as crianças em relação aos adul-

tos ($p=0,021$). A análise do fototipo, por Quiquadrado, não demonstrou diferença significativa entre os grupos do alérgeno e da histamina ($p=0,2$)

Tamanho da pápula

Pelas fotografias digitais seriadas, fomos capazes de determinar a área da pápula em mm^2 induzida por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus*. A média da área da pápula foi obtida para cada ponto de análise. Um aumento progressivo foi observado na área tanto do *Dermatophagoides pteronyssinus* quanto da histamina sem diferença entre as curvas ($p=0,73$), porém com diferença em relação ao tempo da reação (0,0001). O ponto máximo de curva ascendente e de proximidade entre elas ocorreu no décimo minuto, com área média da pápula de histamina de $27,47 \text{ mm}^2$ e de DP de $30,7 \text{ mm}^2$.

Figura 1 - Cinética do tamanho da pápula induzida por histamina e por *Dermatophagoides pteronyssinus*. As curvas não apresentam diferença estatisticamente significativa entre elas, apenas em relação ao tempo nos vários pontos de análise.



Teste de reprodutibilidade e acurácia

Considerando que os dados dependem da capacidade de análise do observador, foram feitas análises intra e interobservadores (quatro diferentes observadores). Pelo teste t de Student, não houve diferença estatisticamente significativa intra-observador ($p = 0,98$) nem interobservadores. Para avaliação da acurácia do método, a área da pápula

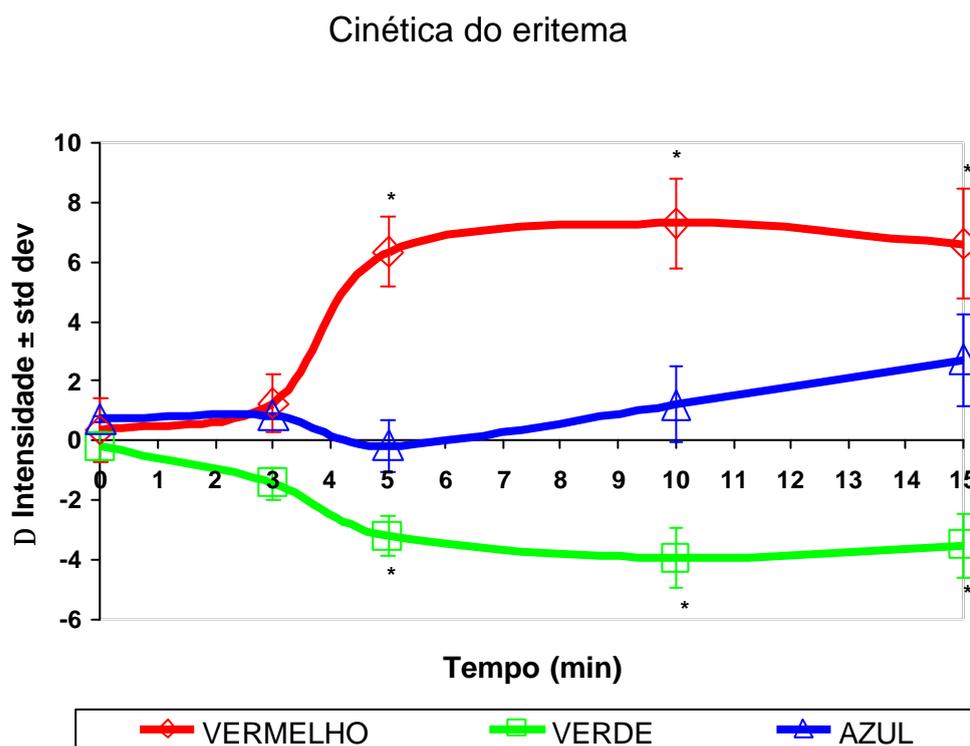
obtida por fotografia digital foi comparada com dados obtidos com leituras feitas por régua (diâmetro médio) e por fita adesiva (área escaneada). Houve correlação estatisticamente significativa entre os métodos de fotografia digital e fita adesiva no diferentes pontos de análise ($p<0,0001$), e entre a fotografia digital e o diâmetro médio ($p<0,0001$), exceto no terceiro minuto.

Intensidade do eritema

A intensidade do eritema foi determinada em cada voluntário. Pela cinética das cores básicas similares entre os sujeitos testados, independente do fototipo, os dados foram agrupados e realizada a média nos pontos 0,3,5,10 e 15 minutos. A cor vermelha variou significativamente durante o tempo de observação quando comparada à pele normal. A intensidade desta cor foi $0,38 \pm 2,57$; $1,29 \pm 2,29$; $5,45 \pm 3,32$; $8,26 \pm 3,48$ e $7,80 \pm 3,89$, respectivamente. A intensidade desta cor foi estatisticamente maior na área do prick test nos tem-

pos 5,10 e15 minutos que na área controle. O pico da cor vermelha ocorreu ao décimo minuto ($p<0,05$). Entretanto, não apenas a cor vermelha foi diferente em relação à área controle. A intensidade da cor verde variou com o tempo, com redução nos tempos 5, 10 e 15 minutos após aplicação da histamina. A intensidade da cor azul foi a única que não apresentou alterações com o tempo. Porém, no penúltimo ponto, um aumento da intensidade do azul foi observado, apesar de não ser estatisticamente significante ($p=0,2367$).

Figura 2 - Cinética da intensidade do eritema induzido por histamina. A intensidade das cores básicas vermelha, verde e azul foram determinadas na área do teste cutâneo e área controle nos tempos 0,3,5,10 e 15 minutos. As cores foram corrigidas pela intensidade da luminosidade. O símbolo * indica $p<0,05$.

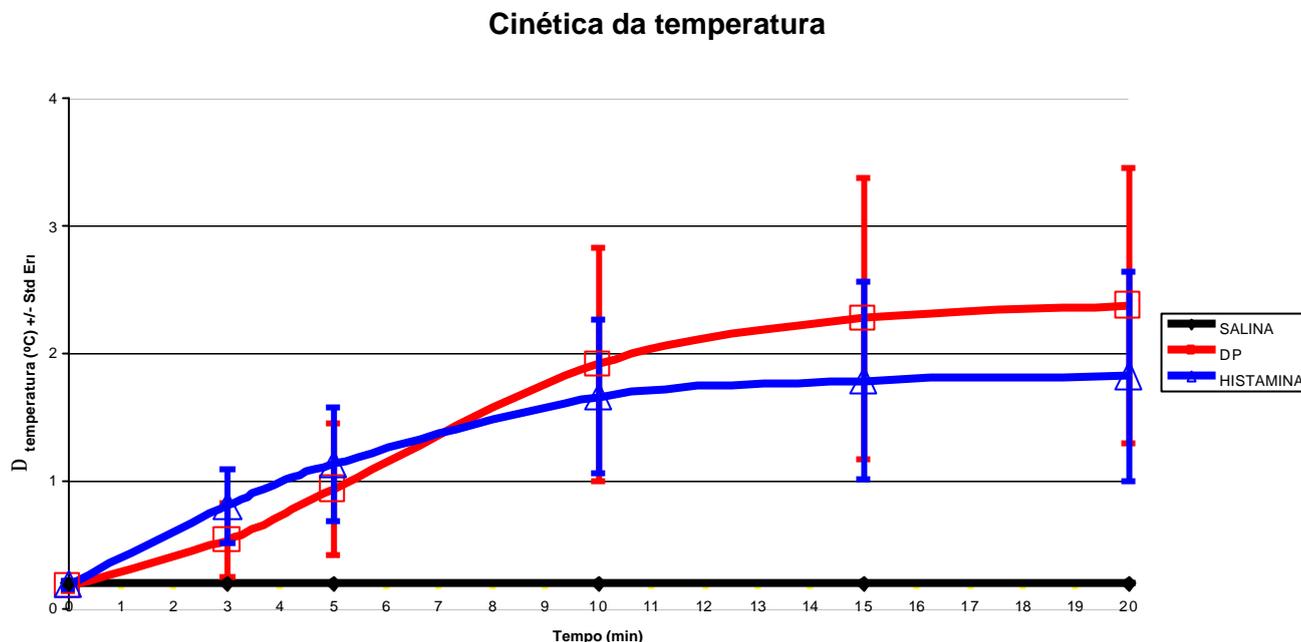


Temperatura por termometria

Foi possível determinar a progressão da variação da temperatura cutânea após o teste cutâneo por puntura com histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus* em tempo real. Inicialmente a temperatura manteve-se quase constante nos níveis basais nos primeiros dois minutos. Após este pe-

ríodo, iniciou-se um aumento progressivo da intensidade da temperatura cutânea com um aumento linear de 2°C até o 20º minuto de observação. As curvas de temperatura da histamina e do *Dermatophagoides pteronyssinus* foram semelhantes às suas curvas em relação à área da pápula.

Figura 3 - Cinética da temperatura no local do teste. Padrão semelhante às curvas do tamanho da pápula, tanto da histamina quanto do *Dermatophagoides pteronyssinus*.



Discussão

Inoculação de quantidade mínima do alérgeno na pele induz uma reação imediata em indivíduos sensibilizados, que consiste na formação de eritema ao redor da pápula, e prurido. Mastócitos são ativados e mediadores pré formados, como a histamina, são liberados. Outros mediadores, como leucotrienos, prostaglandinas e interleucinas são liberados poucas horas mais tarde e atraem outras células que estão envolvidas na reação de fase tardia⁶. O teste cutâneo por puntura tem sido usado como ferramenta diagnóstica para reação alérgica induzida por IgE contra um antígeno específico. Apesar da técnica ter sido primeiro relatada há mais de 100 anos⁷, não existe padronização para leitura do teste.

O prick test pode ser avaliado pelo prurido, pápula e eritema. Entretanto, a maioria dos médicos utiliza apenas a pápula para avaliação do teste. O valor do prick test como parâmetro para avaliação de processo inflamatório, da eficiência da imuno-

terapia ou para estudos farmacológicos depende da reprodutibilidade do teste⁸.

Vários métodos têm sido desenvolvidos na tentativa de uma avaliação precisa do teste cutâneo por puntura. Na rotina clínica, geralmente é feita a leitura do teste pela medida, da pápula, pelo diâmetro mais longo e do perpendicular a este e calculado o diâmetro médio. O teste é considerado positivo se o tamanho da pápula for $\geq 3\text{mm}^2$. A precisão do teste varia entre os métodos e depende de quem o realiza. Poulsen *et al* criaram um método para leitura da área da pápula ou do eritema *escaneando* a imagem do teste desenhada em uma fita adesiva e então calculada por um sistema computadorizado³. Estudo semelhante foi realizado também por Pijnenborg *et al*¹. Outros métodos têm sido desenvolvidos para o estudo do prick test. Medidas do fluxo sanguíneo no local da pápula e do eritema, por fluxometria por doppler, têm sido descritos⁹⁻¹⁰. Clough *et al* avaliaram mudanças no fluxo sanguíneo da pele por

scanning laser doppler imaging. Neste estudo, as áreas do eritema foram calculadas por imagem calibradas por um software. A pápula foi traçada e a área calculada por planimetria¹⁰. Estes métodos não quantificam a intensidade do eritema. Impedância elétrica foi realizada para caracterizar objetivamente e quantificar a pápula, mas não o eritema¹¹.

Não há estudo na literatura que avalie áreação cutânea induzida por puntura por fotografia digital. Há um estudo que avalia a reação ao teste cutâneo intradérmico por fotografia digital. Neste estudo, a reação cutânea foi realizada em cães e induzida por histamina. A avaliação do grau de eritema foi feita e comparada com a cromometria. Observou-se que, por cromometria, não foi possível diferenciar os vários graus da intensidade do eritema observados visualmente e por fotografia digital. Na mesma linha de análise por imagens digitais, Flemming usou câmeras digitais para interpretar alterações de pele em certas dermatoses¹². Ainda, Cascinelli *et al*, em 1992, utilizaram fotografia digital para analisar melanoma através de um televisor com imagens coloridas e digitalizaram essas imagens por um sistema de computação¹³. Jamora *et al* têm estudado melanoma por imagem computadorizada das lesões e concluíram que por estas imagens pode-se avaliar as lesões pigmentadas de pele sem suspeita clínica e que poderiam ter sido negligenciadas sem a análise digital¹⁴.

A termometria cutânea é o método de mensuração da temperatura da pele e que pode ser feita de diversas maneiras. Alguns autores verificaram a variação da temperatura no local do prick test através de termômetro elétrico, onde os sensores foram posicionados na área de eritema junto à pápula. A termometria cutânea sem contato, por imagem infravermelha, conhecida por teletermografia ou apenas termografia, introduziu na medicina um método diagnóstico não invasivo. Os sensores infravermelhos atuais de alta sensibilidade surgiram no final da década de 90, com uma sensibilidade de até 0,02°C e detecção na faixa de ondas longas do espectro infravermelho (7,5 – 13 µm). A introdução da termometria cutânea no teste cutâneo por puntura pretende medir de forma objetiva e quantitativa a reação alérgica. Bagnato *et al* mediram as variações térmicas da pele no local do prick test, feito com alérgeno por termo-

grafia por câmera infravermelha, e compararam com as medidas do diâmetro da pápula em milímetros, encontrando correlação estatisticamente significativa entre os métodos¹⁵.

Portanto, podemos demonstrar que a avaliação da área da pápula por fotografia digital é significativamente reprodutível intra-observador e inter-observadores e correlaciona-se com métodos utilizados rotineiramente, independente do aeroalérgeno e do tempo da reação. Além do mais, pode-se, pela primeira vez analisar a intensidade do eritema em peles de diferentes fototipos, especialmente nas peles melanodérmicas, onde a leitura visual torna-se difícil, usando metodologia simples e acessível. Finalmente, confirmando as correlações dos fenômenos determinantes da reação de Lewis, demonstrou-se neste estudo que a intensidade do eritema e aumento da temperatura são diretamente proporcionais ao aumento da área da pápula e podem ser utilizados na aferição da reação induzida pelo teste de puntura.

Referências bibliográficas

1. Pijnenborg H, Nilsson L, Dreborg S. Estimation of skin prick test reactions with a scanning program. *Allergy*. 1996;51:782-8.
2. Aas K. Clinical and experimental aspects of standardization and purification of allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1975;49:44-54.
3. Poulsen LK, Liisberg C, Bindsvlev-Jensen C, Malling HJ. Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. *Clin Exp Allergy*. 1993; 23:61-8.
4. Dreborg S, Holgersson M, Nilsson G, Zetterstrom O. Dose response relationship of allergen, histamine, and histamine releasers in skin prick test and precision of the skin prick test method. *Allergy*. 1987;42:117-25.
5. Lu H, Edwards C, Gaskell S, Pearse A, Marks R. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. *Br J Dermatol*. 1996;135:263-7.
6. Dreborg S. Histamine reactivity of the skin. *Allergy*. 2001;56:359-64.
7. Cohen SG. Asthma among the famous. Charles H. Blackley (1820-1900) British physician. *Allergy Asthma Proc*. 1997;18:196-8.

8. Malling HJ. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. *Allergy*. 1985; 40:400-4.
9. Olsson P, Hammarlund A, Pipkorn U. Wheal-and-flare reactions induced by allergen and histamine: evaluation of blood flow with laser Doppler flowmetry. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:291-6.
10. Clough GF, Bennett AR, Church MK. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging. *Br J Dermatol*. 1998; 138:806-14.
11. Nyren M, Ollmar S, Nicander I, Emtestam L. An electrical impedance technique for assessment of wheals. *Allergy*. 1996;51:923-6.
12. Fleming MG. Digital dermoscopy. *Dermatol Clin*. 2001;19:359-67, ix.
13. Cascinelli N, Ferrario M, Bufalino R, Zurrada S, Galimberti V, Mascheroni L, *et al*. Results obtained by using a computerized image analysis system designed as an aid to diagnosis of cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 1992;2:163-70.
14. Jamora MJ, Wainwright BD, Meehan SA, Bystryn JC. Improved identification of potentially dangerous pigmented skin lesions by computerized image analysis. *Arch Dermatol*. 2003;139:195-8.
15. Bagnato GF, Gulli S, Denuzzo G, Di Cesare E, Sansotta C, D'Ambrosio FP, *et al*. Measurement of allergen-induced skin reactions by computerized dynamic telethermography (CDTT). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1997;7:238-41.

Endereço para correspondência

Prof. Dr. Hermênio C. Lima
Centro de Genética Molecular e Pesquisa do
Câncer em Criança (CEGEMPAC)
Rua Agostinho Leão Júnior, 400
80060-110 - Curitiba - PR - Brasil
Tel/FAX: 0XX-41-3029.3204
E-mail: hclima@ufpr.br
rosalyvs@hotmail.com