

**ROSALY VIEIRA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO OBJETIVA DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA  
INDUZIDO POR HISTAMINA E AEROALÉRGENO ATRAVÉS DE  
FOTOGRAFIA DIGITAL E TERMOMETRIA CUTÂNEA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Pediatria, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho**

**CURITIBA**

**2003**

Santos, Rosaly Vieira dos

Avaliação objetiva do teste cutâneo por puntura induzido por histamina e aeroalérgeno através de fotografia digital e termometria cutânea / Rosaly Vieira dos Santos. Curitiba, 2003.

76 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: José Hermênio Cavalcante Lima Filho

Co-orientador: Nelson Augusto Rosário Filho

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Pediatria. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Fotografia. 2. Histamina. 3. *Dermatophagoides pteronyssinus*. 4. Hipersensibilidade tipo I. 5. Eritema I. Título. II. Lima Filho, José Hermênio Cavalcante. III. Rosário Filho, Nelson Augusto.

*A meu pai, in memoriam, e à minha mãe pelo amor,  
atenção, formação e pela vida que me deram.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ailema L. L. Franck, in memoriam,  
por ter sido a primeira pessoa a me conscientizar  
sobre a importância e a responsabilidade da  
pesquisa médica.*

*Ao Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho  
que guiou meus passos carinhosamente para a  
realização deste estudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho, orientador e amigo, por ter tornado possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, pela orientação à minha formação médica e pelo incentivo à pesquisa desde a época de residência.

À Fernanda Marques Paoelli e Roberto Vieira dos Santos que prontamente analisaram alguns dados necessários para a realização deste.

Aos doutorandos que colaboraram com detalhes técnicos do estudo.

Ao engenheiro Mário Cimbalista Jr. que gentilmente cedeu os equipamentos e realizou as filmagens de termometria em infravermelho.

Ao Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo, pela colaboração no estudo.

Aos meus amigos, em especial a Elke Christine Ferreira Mascarenhas, pelo apoio.

A todos os outros que participaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Em especial a todos os voluntários que participaram deste estudo.

*Uma longa viagem começa  
com um único passo.*

Lao-Tse

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	4
<b>ARTIGO I - DETERMINAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA INDUZIDA PELO DESAFIO DO TESTE DE PUNTURA POR FOTOGRAFIA DIGITAL</b> .....	5
<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>OBJETIVO</b> .....	9
<b>CASUÍSTICA E MÉTODO</b> .....	10
TESTES E FOTOGRAFIAS .....	10
DETERMINAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA .....	11
TESTE DE REPRODUTIBILIDADE .....	11
TESTE DE ACURÁCIA .....	11
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	13
CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO .....	13
TESTE DE REPRODUTIBILIDADE E ACURÁCIA .....	13
ÁREA DA PÁPULA POR FOTOGRAFIA DIGITAL .....	14
COMPARAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA ENTRE OS MÉTODOS .....	14
<b>DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	18
<b>ARTIGO II - MEDIDA OBJETIVA DO TAMANHO E INTENSIDADE DO ERITEMA, NO TESTE POR PUNTURA INDUZIDO POR HISTAMINA E AEROALÉRGENO, PELA FOTOGRAFIA DIGITAL, EM INDIVÍDUOS DE DIFERENTES FOTOTIPOS CUTÂNEOS</b> .....	27
<b>RESUMO</b> .....	28
<b>ABSTRACT</b> .....	29

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>OBJETIVO</b> .....	31
<b>CASUÍSTICA E MÉTODO</b> .....	32
TESTES E FOTOGRAFIAS.....	32
AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE E DA ÁREA DO ERITEMA.....	33
TESTE DE REPRODUTIBILIDADE.....	34
TESTE DE ACURÁCIA.....	34
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
CASUÍSTICA.....	36
TESTE DE REPRODUTIBILIDADE E ACURÁCIA.....	36
INTENSIDADE E ÁREA DO ERITEMA.....	37
<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	42
<b>ARTIGO III - PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO TESTE CUTÂNEO INDUZIDO POR PUNTURA DETERMINADOS POR FOTOGRAFIA DIGITAL E TERMOMETRIA CUTÂNEA</b> .....	54
<b>RESUMO</b> .....	55
<b>ABSTRACT</b> .....	56
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	57
<b>OBJETIVO</b> .....	58
<b>CASUÍSTICA E MÉTODO</b> .....	59
TESTES E FOTOGRAFIAS.....	59
DETERMINAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA.....	60
DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DO ERITEMA.....	60
DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA.....	61
TRANSFORMAÇÃO POR UNIDADE E DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE.....	61
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	62

CASUÍSTICA .....	62
CINÉTICA DA ÁREA DO ERITEMA .....	62
CINÉTICA DA ÁREA DA PÁPULA .....	62
CINÉTICA DA INTENSIDADE DO ERITEMA .....	62
CINÉTICA DA TEMPERATURA NO LOCAL DO TESTE CUTÂNEO .....	63
CINÉTICA DA VELOCIDADE DA REAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR HISTAMINA E POR AEROALÉRGENO .....	63
<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>CONCLUSÃO</b> .....	76

## INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas ocorrem comumente na pele e nas mucosas por ser fácil o contato dessa superfície com os antígenos no meio ambiente. Todas as reações imunes classificadas por Gell e Coombs podem ser visualizadas na pele.

O diagnóstico de uma doença alérgica do tipo I deve basear-se na história clínica e no exame físico do paciente e na determinação de anticorpos IgE específicos. Para a detecção desses anticorpos, o teste cutâneo por puntura é o método mais empregado, por ser rápido, barato e sensível.

O teste cutâneo por puntura teve sua primeira aplicação prática para detecção clínica da hipersensibilidade do tipo I no ano de 1912. Com base no teste cutâneo foram desenvolvidos os extratos alérgenos e as vacinas. Hoje em dia é um método amplamente usado para detecção de IgE específicos. Além da sua importância clínica, é indispensável para padronização dos extratos alérgenos e para estudos dos mecanismos alérgico, inflamatório e farmacológico.

Feito geralmente na face anterior do antebraço do indivíduo, o teste é quase isento de efeitos colaterais.<sup>1</sup> O antígeno, introduzido na pele, dá início a uma resposta de hipersensibilidade imediata em um indivíduo sensibilizado, que é a ligação do antígeno à IgE na superfície dos mastócitos ou basófilos. Essas células são ativadas por ligação cruzada de moléculas pré-fixadas à superfície da IgE, induzindo a liberação de mediadores, particularmente a histamina. A histamina é um agonista H1 e H2 endógeno que pela ação H1 mobiliza cálcio e pela H2 estimula a adenilciclase nos neurônios, levando à vasodilatação que caracteriza o eritema. Este, por sua vez, é substituído por um edema mole resultante do extravasamento de plasma, o que forma a pápula.<sup>2</sup>

O resultado do teste é baseado, principalmente, no tamanho da pápula. Alguns autores consideram também o eritema na determinação da reatividade cutânea ao antígeno. A leitura é feita por detecção visual da reação formada, com medidas manuais ou com desenhos da reação transportados para um sistema digitalizado.

O teste é considerado positivo quando o tamanho da pápula é  $\geq 3\text{mm}$  de diâmetro ou  $\geq 7\text{mm}^2$  de área, e o eritema  $\geq 10\text{mm}$  de diâmetro.<sup>3</sup> Apesar da simplicidade do teste e de ser realizado há quase cem anos, ainda não há um método padronizado para a sua leitura. Os problemas para isso estão na subjetividade e na impossibilidade de avaliação precisa do tamanho da pápula, de contornos irregulares, e do tamanho do eritema, especialmente em peles melanodérmicas. Além disso, costuma-se desprezar os outros componentes dessa reação, tais como prurido e temperatura, que podem ter importância clínica.

Fotografia digital<sup>4</sup>, termometria cutânea<sup>5</sup>, Doppler<sup>6</sup>, entre outros meios, têm sido usados para a análise do teste cutâneo, porém sem a incorporação simultânea das variáveis da reação.

A câmera digital consiste em uma máquina com corpo e lentes convencionais com CCD ou *Charge Coupled Device*, que ocupa o lugar do filme. O CCD é um *chip* de silicone composto por elementos individuais, ou *pixels*, que reage à luz como os filmes nas câmeras tradicionais e a transforma em voltagem. O computador da câmera converte essa voltagem em dados binários. O CCD é insensível a cores, mas com um filtro vermelho, verde ou azul na sua frente, o *chip* digitaliza os componentes individuais das cores na imagem para reproduzir a representação colorida. O CCD é a unidade crítica da câmera; sua habilidade de reproduzir uma imagem digital é função de sua resolução, que pode ser definida como a densidade dos elementos fotossensíveis, ou *pixels*, que ela contém.<sup>7,8</sup> A documentação fotográfica médica deve ser tecnicamente perfeita e fiel. Os objetos importantes e seus detalhes devem estar todos em foco, ou seja, nítidos. A imagem deve ser padronizada e reprodutível; para isso, deve-se antes padronizar e adequar a iluminação, a exposição e a profundidade de campo, o enquadramento e o fundo das fotos. A fotografia digital é bastante satisfatória nos quesitos qualidade e precisão, além de possibilitar a realização de análises colorimétricas no computador e a quantificação objetiva dos resultados dos procedimentos.

Os sistemas infravermelhos têm por objetivo transformar a radiação captada em informação térmica, que pode ser qualitativa ou quantitativa. A visão humana

abrange a faixa espectral de comprimentos de onda entre 0,40 e 0,75 $\mu\text{m}$ . A máxima sensibilidade ocorre entre 0,50 e 0,55 $\mu\text{m}$ , dependendo do grau de adaptação dos olhos à luminosidade. Os recursos da fotografia infravermelha estendem-se até o comprimento de onda de 0,9 $\mu\text{m}$ , além do qual a energia associada à radiação já não é suficiente para sensibilizar emulsões fotográficas. Nessa faixa, a imagem registrada deve-se à radiação refletida a partir de alguma fonte externa, visto que a emissão própria de corpos com temperaturas menores que 250°C é muito pequena. A detecção de comprimentos de ondas mais longos é obtida com auxílio de equipamentos denominados “sistemas infravermelhos”, que convertem a radiação captada em sinais eletrônicos, possibilitando a formação de imagens térmicas e a medição de temperatura a distância. Os elementos básicos que compõem esse sistema são: óptica do sistema, mecanismo de varredura, detector, processador e *display*. Normalmente as imagens são formadas a partir da varredura bidimensional da cena; são apresentadas em tubos de raios catódicos, onde um feixe eletrônico varre a tela em sincronismo com os movimentos do mecanismo de varredura. O deslocamento do feixe produz linhas que formam a imagem, composta por uma sucessão de pontos denominados *pixels*. Para ter boa qualidade visual, a imagem deve incluir o maior número de *pixels*, e a frequência de varredura deve ser tal que não produza cintilação. As medições baseiam-se na comparação entre o sinal gerado no detector a partir de uma referência de temperatura e o sinal decorrente do corpo em medição.<sup>9</sup>

Neste estudo foram empregadas a fotografia digital e a termometria cutânea para avaliar, de forma mais reprodutível, objetiva e precisa, o teste cutâneo por puntura e para demonstrar e comparar, *in vivo*, a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea inter-relacionados. Esses três sinais, apesar de conhecidos na reação tríplice de Lewis, ainda não foram interpretados em um único desenvolvimento cinético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TRIPATHI, A.; PATTERSON, R. Clinical interpretation of skin test results. **Immunol Allergy Clin North Am**, v.21, n.2, p.291-300, 2001.
2. SERAFIN, W. E.; AUSREN, K. F. Current concepts: mediation of immediate hypersensitivity reactions. **N Engl J Med**, v.317, p.30, 1987.
3. POULSEN, L. K.; LIISBERG, C.; BINDSLEV-JENSEN, C.; MALLING, H. J. Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. **Clin Exp Allergy**, v.23, n.1, p.61-68, 1993.
4. BOYSEN, L.; SORENSEN, P.; LARSEN, M.; SERUP, J.; KRISTENSEN, F. Evaluation of skin erythema by use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. **Am J Vet Res**, v.63, n.4, p.565-569, 2002.
5. BAGNATO, G. F.; GULLI, S.; DENUZZO, G.; DI CESARE, E.; SANSOTTA C.; D'AMBROSIO, F. P.; VERMIGLIO, G. Measurement of allergen-induced skin reactions by computerized dynamic telethermography (CDTT). **J Investig Allergol Clin Immunol**, v.7, n.4, p.238-241, 1997.
6. 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**, v.82, n.2, p.291-6, 1988.
7. SMITH, R. V. The digital camera in clinical practice. **Otolaryngol Clin North Am**, v.35, n.6, p.1175-1189, 2002.
8. RATNER, D.; THOMAS, C.O.; BICKERS, D. The users of digital photography in dermatology. **J Am Acad Dermatol**, v.41, n.5, p.749-756, 1999.
9. KAPLAN, H. Infrared spectral bands: the importance of color in the infrared. **InfraMation, Proceedings**, v.1, n.24-27, p.95-102, 2000.

## ARTIGO I

**Determinação da área da pápula induzida pelo  
desafio do teste de puntura por fotografia digital**

***Skin papule area measurement induced  
by pricktest using digital photography***

**Título abreviado: Avaliação da pápula do prick test fotografia digital**

Rosaly V. dos Santos<sup>1</sup>; Nelson A. Rosário<sup>2</sup>; Hermênio C. Lima<sup>3</sup>

1. Mestranda em Pediatria.
2. Professor Titular em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.
3. Professor Adjunto de Imunologia Clínica da Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

## RESUMO

**Objetivo:** Empregar novo recurso na leitura do *prick test* pela fotografia digital.

**Método:** O estudo avaliou a área da pápula induzida por histamina ou por antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* em 80 voluntários. Com a câmera digital mantida a uma distância fixa, fotografias seriadas foram realizadas aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. Definiu-se o contorno da pápula com filtros de transformação de imagem contidos no *software* Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup>. A área selecionada a partir do procedimento anterior foi determinada em *pixels*, e seu valor comparado ao de um círculo com área conhecida. Foram feitos testes de acurácia e reprodutibilidade. As medidas obtidas por este método foram comparadas com as obtidas pela leitura do diâmetro médio da pápula e por planimetria computadorizada a partir de contorno da pápula desenhado em fita adesiva.

**Resultados:** A partir das fotografias digitais observou-se na área da pápula um aumento progressivo induzido por histamina e por extrato de *D. pteronyssinus*, não se detectando diferença entre as cinéticas de desenvolvimento de ambos os desafios ( $p=0,81$ ). O teste foi acurado e reprodutível por meio de uma correlação significativa intra e interobservadores ( $p<0,0001$ ). Os dados da fotografia digital também se correlacionaram com os obtidos pelos métodos tradicionais.

**Conclusão:** A avaliação da área da pápula por fotografia digital é reprodutível intra e interobservadores e correlaciona-se com os métodos freqüentemente empregados; além disso, permite a medição rápida e objetiva da pápula no teste cutâneo por puntura.

## ABSTRACT

**Objective:** The present study was to apply digital photography for an objective evaluation of prick test.

**Methods:** Histamine and *D. pteronyssinus* antigen were used on the forearm of volunteers to induce a typical wheal and flare reaction. The camera was held at a fixed distance and digital photos of the reaction were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min. All pictures were stored and data determined by Adobe Photoshop 6.0®. 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 when necessary. The area size was derived from a direct correlation with the known circle area. The reproducibility was evaluated between different observers. Moreover, this method was compared with traditional methods of wheal evaluation.

**Results:** It could be observed a progressive increase in the papule area overtime induced by histamine and *D. pteronyssinus* extract without any difference between both stimuli ( $p=0.81$ ). The digital photography method is accurate and precise among different observers ( $p<0.0001$ ). The data obtained by digital photography was similar to the one determined by others methods.

**Conclusions:** The digital photography's method is precise and accurate to determine the prick test kinetic response. Therefore, this new technique has allowed an objective method for evaluation of area of wheal skin reaction against antigens or histamine.

**Palavras-chave:** Fotografia digital; histamina; *Dermatophagoides pteronyssinus*; hipersensibilidade tipo I, prick test; histamine, computer, software.

## INTRODUÇÃO

O teste cutâneo por puntura é o método mais rápido, barato e sensível para o diagnóstico de doenças alérgicas mediadas por IgE. Geralmente realizado na face anterior do antebraço, quase não produz efeitos colaterais. O teste detecta a presença de anticorpo IgE específico contra um antígeno na superfície de mastócitos. Estes liberam histamina após a inoculação de pequena quantidade do antígeno na pele, o que resulta na reação tríplice de Lewis, que é visualizada por eritema e pápula no local.<sup>1</sup>

O resultado do teste é baseado principalmente no tamanho da pápula. Alguns autores consideram também o eritema na determinação da reatividade cutânea ao antígeno.<sup>2</sup>

Três métodos são usados rotineiramente para avaliação da pápula: a) a comparação visual da área da pápula induzida por um antígeno com aquela induzida por histamina; b) a medida média do diâmetro mais longo e do diâmetro perpendicular a ele;<sup>3</sup> c) a determinação da área da pápula por transferência dos seus contornos desenhados em fita transparente para um sistema digital por *escâner*<sup>4</sup>.

O valor do teste cutâneo por puntura para avaliação do processo inflamatório, da eficiência da imunoterapia, de estudos farmacológicos ou de estudos em diferentes centros é determinado por sua reprodutibilidade e pela documentação do exame.<sup>5</sup> Apesar da simplicidade do procedimento, além da reprodutibilidade, há outros problemas relacionados ao teste, entre eles a imprecisão na avaliação do tamanho das pápulas de contorno não circular e a demanda de tempo e de recursos humanos para realizá-lo.<sup>6</sup> Existe, portanto, a necessidade de técnica mais precisa, prática e reprodutível para a determinação da resposta cutânea.

Para possibilitar essa melhoria na interpretação do teste cutâneo por puntura a partir da avaliação da área da pápula, recorreu-se a uma técnica semi-automatizada usando fotografias digitais, técnica essa vantajosa por sua rapidez, reprodutibilidade, análise objetiva, precisão e documentação icnográfica ou científica.

## **OBJETIVO**

Desenvolver, descrever e avaliar um novo método, mais prático e preciso, para determinar a área da pápula causada por antígenos ou por histamina no teste cutâneo por puntura em indivíduos alérgicos ou não.

## CASUÍSTICA E MÉTODO

Trata-se de estudo experimental e observacional, com coleta de dados da reação cutânea a partir da inoculação de um fármaco e de um antígeno. O estudo, aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Seres Humanos do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), foi realizado nesse hospital.

No período de maio a setembro de 2003 foram selecionados 80 voluntários que durante sete dias antes do teste não tinham feito uso de anti-histamínico ou de outras drogas que pudessem alterar o tamanho da pápula. As características clínicas de cada indivíduo foram determinadas após observação e questionamento pelo pesquisador principal, e a classificação por fototipo baseou-se na classificação de Fitzpatrick.<sup>7</sup>

Consentimento informado de todos os indivíduos ou de seus responsáveis foi obtido previamente ao teste.

## TESTES E FOTOGRAFIAS

Em todos os testes, uma gota de histamina (10 mg/ml, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil), uma gota de solução salina (IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) e uma gota de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (112.900 UBE mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) foram aplicadas na face anterior do antebraço esquerdo de cada voluntário, com distância mínima de 3cm entre elas, introduzidas na epiderme por puntura com agulha descartável 26-G em ângulo de 45° com a superfície da pele. As fotografias foram realizadas com câmera digital Olympus 650 C, sempre a mesma distância entre a lente e a pele e sob mesma iluminação. Usou-se um círculo como referência de área em local próximo ao teste. As fotografias digitais foram feitas aos 0, 3, 5, 10 e 15 e 20 minutos. A seguir, nos mesmos pontos, a medida do diâmetro da pápula foi determinada com régua milimetrada e transparente. Os contornos da pápula foram transferidos a uma fita adesiva transparente com auxílio de caneta para transparências.

## DETERMINAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA

Para avaliação da pápula por fotografia digital selecionou-se uma região ao redor da reação e determinou-se o contorno da pápula com filtros de transformação de imagem aplicados pelo programa de computador Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup> (figuras 1 e 2): Uma correlação matemática foi estabelecida comparando a quantidade de *pixels* da área da pápula com os da área conhecida. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

O diâmetro médio, em milímetros, foi obtido por meio da média dos valores medidos pela régua. A área do desenho na fita adesiva, em milímetros quadrados, foi calculada com o auxílio de um sistema computadorizado semelhante àquele usado para fotografia, a partir de transformação digital do desenho por *escâner*.

## TESTE DE REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi testada intra-observador e interobservadores, em trinta imagens escolhidas aleatoriamente. Na primeira avaliação, duas determinações foram realizadas pelo mesmo observador, com intervalo de três meses entre as leituras e sem conhecimento dos valores anteriores.

Na avaliação interobservadores, os resultados de um dos observadores foram comparados às determinações dos outros três: um deles médico, alergista, dermatologista e especialista em fotografia digital com experiência no uso do *software*; e dois não médicos – um com e outro sem experiência em programa de computador.

## TESTE DE ACURÁCIA

As análises da reação papular com auxílio da fotografia digital foram realizadas sempre pelo mesmo observador. Esses resultados foram comparados aos obtidos por meio da fita adesiva e pela medida do diâmetro médio. A determinação da área pela fita adesiva foi feita sempre pelo mesmo observador. A medição do diâmetro médio foi realizada por dois observadores no mesmo tempo do teste.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação da cinética evolutiva da área para cada estímulo, usou-se ANOVA para medidas repetidas. Para a avaliação das diferenças entre os tempos, o teste de acurácia e de reprodutibilidade empregou-se o teste t de *Student*, uma vez que os dados eram contínuos e apresentavam distribuição normal.

A comparação dos diferentes métodos de obtenção das medidas da pápula com o método da fotografia digital foi realizada por meio da correlação e regressão linear ou polinomial.

No processo de ajuste para os potenciais confundidores (sexo, idade, fototipo), testes de qui-quadrado e de regressão foram usados nos diferentes modelos. O valor de  $p < 0,05$  foi associado à significância estatística.

Os dados foram analisados com auxílio dos *softwares* Statistica (Statsoft, USA) e JMP (SAS Institute, USA).

## RESULTADOS

### CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Teste cutâneo por puntura foi analisado em 80 voluntários, 31 dos quais (38,8%) eram do sexo masculino e 49 (61,2%) do feminino. A média de idade foi de 25,2 anos, variando de 4 a 67 anos.

Entre os indivíduos com apenas histamina positiva, a média de idade foi de 25,2 anos; entre os 35 que apresentaram positividade ao extrato de *D. pteronyssinus* (DP) a média de idade foi de 19,5 anos.

A média de idade entre os sexos e os desafios está descrita na tabela 1. Cinquenta e oito indivíduos (72,5%) foram classificados como fototipo II ou III e 12 como fototipo IV ou V na classificação de Fitzpatrick.<sup>5</sup>

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

### TESTE DE REPRODUTIBILIDADE E ACURÁCIA

Não houve diferença estatisticamente significativa intra nem interobservadores, com correlação significativa entre eles ( $p<0,0001$ ,  $r^2$  *adjust* de até 0,94) (figura 3).

Verificou-se correlação estatisticamente significativa entre o método da fotografia digital e o da fita adesiva nos diferentes pontos de análise ( $p<0,0001$ ), e entre a fotografia digital e o diâmetro médio ( $p<0,0001$ ), exceto no 3.º minuto.

A melhor correlação obtida entre os métodos da fotografia digital e da fita adesiva ocorreu no 10.º minuto ( $r^2$  *adjust* de 0,61 e 0,46, respectivamente), assim como entre o método da fita adesiva e o do diâmetro médio.

Avaliando os fototipos entre os métodos experimentados, observou-se menor índice de correlação nos fototipos IV e V.

## ÁREA DA PÁPULA POR FOTOGRAFIA DIGITAL

Um aumento progressivo foi observado tanto na área da pápula induzida pelo extrato de *D. pteronyssinus* quanto na induzida pela histamina, sem diferença quanto ao seu desenvolvimento cinético ( $p=0,81$ ).

Não se verificou diferença na cinética da reação cutânea quando analisados separadamente os voluntários positivos e os negativos para *D. pteronyssinus*. Também não houve diferença significativa na cinética evolutiva ou na área das pápulas quando os voluntários foram estratificados por sexo, fototipo e idade. Entretanto verificou-se diferença da área da pápula com relação ao tempo em ambos os estímulos ( $p<0,001$ ) (gráfico 1).

## COMPARAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA ENTRE OS MÉTODOS

Notou-se semelhança das curvas nos diferentes métodos, com maior proximidade entre as curvas de histamina e *D. pteronyssinus* no 10.<sup>o</sup> minuto, após um rápido aumento do tamanho da pápula. Após esse período, houve um lento crescimento das pápulas até o 20.<sup>o</sup> minuto, visto pela fotografia digital, enquanto pelos demais métodos elas atingiram um platô a partir do 15.<sup>o</sup> minuto (gráficos 1, 2 e 3).

## DISCUSSÃO

O teste cutâneo por puntura é um procedimento diagnóstico efetivo nas doenças alérgicas, motivo pelo qual tem merecido nos últimos anos a atenção especial de muitos pesquisadores para a melhoria da técnica e dos materiais nele empregados.

Na busca de uma avaliação mais precisa do teste, vários métodos de leitura têm sido experimentados, entre os quais um mais objetivo, foi desenvolvido a partir da reação do teste cutâneo cuja área é desenhada em fita adesiva e transferida a um sistema computadorizado por *escâner* e então calculada em milímetros quadrados.<sup>4</sup> Estudo semelhante foi realizado também por outros pesquisadores.<sup>2</sup>

Outros experimentos para análise da pápula no teste cutâneo têm sido descritos, como a medida do fluxo sangüíneo no local da pápula<sup>8,9</sup> e a impedância elétrica<sup>10</sup>. A precisão do teste varia entre os métodos e depende de quem os realiza, pois não há ainda uma padronização para a leitura dos resultados.

Com auxílio da fotografia digital desenvolveu-se uma técnica objetiva, mais precisa e prática do que as empregadas habitualmente para leitura da pápula no teste cutâneo por puntura e facilmente reproduzível por pessoas não treinadas no método. Além do mais, essa técnica apresenta resultados semelhantes aos de outras rotineiramente usadas, independentemente do antígeno empregado. É fácil prever, portanto, a rápida substituição dos métodos convencionais, mais sujeitos a erros de interpretação, por este, mais acurado.

A reprodutibilidade dos métodos de leitura do teste cutâneo é parcialmente dependente do tamanho da pápula, uma vez que fica prejudicada no caso de reações pequenas,<sup>11</sup> como se verificou neste estudo, já que não houve correlação entre os métodos no 3.º minuto após a puntura, e a correlação observada foi menor aos 5 minutos, quando o tamanho da pápula é menor do que aos 10, 15 e 20 minutos. Essa não-correlação pode ser devida à dificuldade de leitura visual em pápulas de áreas menores, dificuldade que não se verificou quando essas pápulas puderam ser

delimitadas pelos filtros, da mesma forma que as encontradas nos outros tempos de análise.

A variação interobservadores foi bem menor quando o treinamento para realização do método foi feito pela mesma pessoa. Para pleno aproveitamento da fotografia digital na análise da área da pápula no teste cutâneo por puntura, algumas condições devem ser observadas: o local do teste deve ser desprovido de pêlos e ter luminosidade adequada e a remoção do extrato deve ser completa.

Em relação ao fototipo, é provável que a não-correlação estatisticamente significativa com os outros métodos de leitura nos fototipos IV e V se deva ao pequeno número, na amostra, de indivíduos assim classificados, o que se explica pela dificuldade em recrutá-los, visto que a população local é constituída basicamente de indivíduos de fototipo II ou III.

Estudos com fotografia digital estão em andamento para avaliação do eritema e de agentes farmacológicos que possam interferir no resultado do exame. Tais achados podem ter importante implicação na área da alergia e da imunologia clínica, pois permitirão rápida utilização do método, sem a interferência do observador, portanto, mais objetividade e reprodutibilidade na avaliação do teste cutâneo.

A análise da área da pápula por meio da fotografia digital é mais precisa do que o permitiam os métodos anteriormente usados, já que é realizada por um sistema computadorizado onde diferentes formas de pápulas são facilmente delimitadas por filtros presentes no *software*. Além de não necessitar de excessivo treinamento ou de conhecimento específico prévio, esse método permite uma fácil documentação icnográfica do teste cutâneo. O fato de já se encontrar semi-automatizada, a nova técnica permite prever para logo sua completa automatização, o que evidentemente resultará em maior praticidade, rapidez e difusão.

Apenas um estudo foi encontrado na literatura sobre o emprego da fotografia digital na determinação da positividade de teste intradérmico, e ainda assim realizado em cães.<sup>12</sup> Outros métodos ainda não aplicados no teste cutâneo por puntura vêm

demonstrando maior precisão na análise de lesões pigmentadas na pele quando comparados com métodos apenas visuais.<sup>13,14,15</sup>

Este estudo demonstra que a fotografia digital como técnica de leitura da área da pápula induzida por puntura com histamina e antígenos específicos é objetiva, reprodutível, prática e mais precisa que as técnicas rotineiramente empregadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DREBORG, S. Histamine reactivity of the skin. **Allergy**, v.56, n.5, p.359-364, 2001.
2. PIJNENBORG, H.; NILSSON, L.; DREBORG, S. Estimation of skin prick test reactions with a scanning program. **Allergy**, v.51, n.11, p.782-788, 1996.
3. AAS, K. Clinical and experimental aspects of standardization and purification of allergen. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v.49, n.1-2, p.44-54, 1975.
4. POULSEN, L. K.; LIISBERG, C.; BINDSLEV-JENSEN, C.; MALLING, H. J. Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. **Clin Exp Allergy**, v.23, n.161-168, 1993.
5. MALLING, H. J. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. **Allergy**, v.40, n.6, p.400-404, 1985.
6. 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**, v.42, n.2, p.117-125, 1987.
7. LU, H.; EDWARDS, C.; GASKELL, S.; PEARSE, A.; MARKS, R. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. **Br J Dermatol**, v.135, n.2, p.263-267, 1996.
8. 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**, v.82, n.2, p.291-296, 1988.
9. CLOUGH, G. F.; BENNETT, A. R.; CHURCH, M. K. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging. **Br J Dermatol**, v.138, n.5, p.806-814, 1998.
10. NYREN, M.; OLLMAR, S.; NICANDER, I.; EMTESTAM, L. An electrical impedance technique for assessment of wheals. **Allergy**, v.51, n.12, p.923-926, 1996.
11. TAUDORF, E.; MALLIG, H. J.; LAURSEN, L.C.; LANNER, A.; WEEKE, B. Reproducibility of histamine skin prick test. **Allergy**, v.40, p.344-349, 1985.
12. BOYSEN, L.; SORENSEN, P.; LARSEN, M.; SERUP, J.; KRISTENSEN, F. Evaluation of skin erythema by use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. **Am J Vet Res**, v.63, n.4, p.565-569, 2002.
13. FLEMING, M.G. Digital dermoscopy. **Dermatol Clin**, v.19, n.2, p.359-367, 2001.
14. CASCINELLI, N.; FERRARIO, M.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; GALIMBERTI, V.; MASCHERONI, L.; BARTOLI, C.; CLEMENTE, C. Results obtained by using a computerized image analysis system designed as an aid to diagnosis of cutaneous melanoma. **Melanoma Res**, v.2, n.3, p.163-170, 1992.
15. JAMORA, M. J.; WAINWRIGHT, B. D.; MEEHAN, S. A.; BYSTRYN, J. C. Improved identification of potentially dangerous pigmented skin lesions by computerized image analysis. **Arch Dermatol**, v.139, n.2, p.195-198, 2003.

FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURA 3

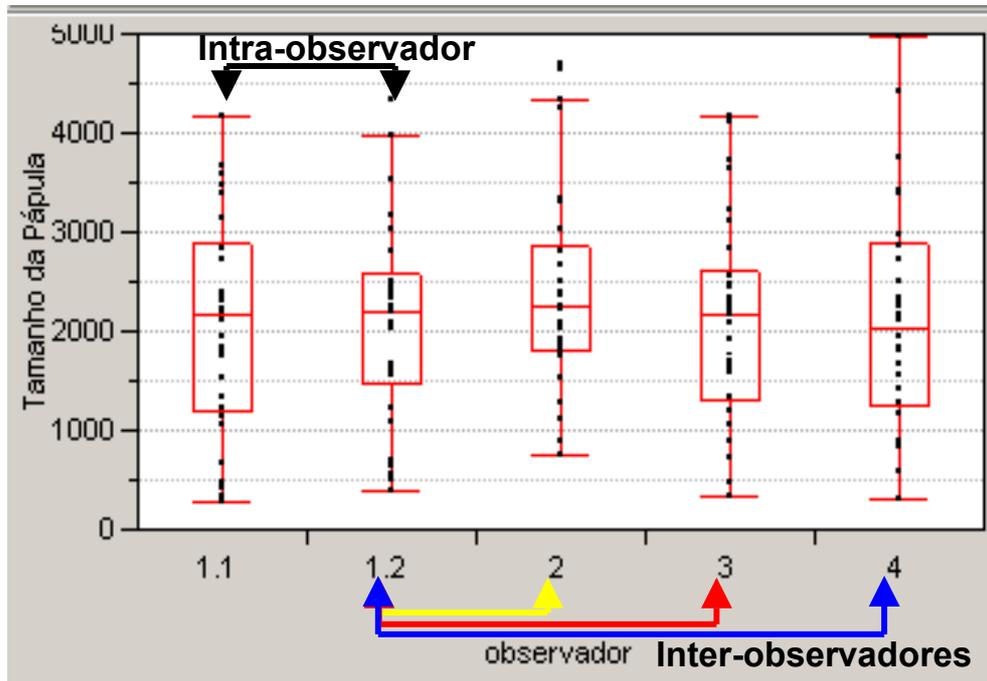


TABELA 1

<b>Sexo</b>	<b>Desafios</b>	<b>Média idade (anos)</b>	<b>Idade mínima (anos)</b>	<b>Idade máxima (anos)</b>
Feminino	DP	23,38	6	37
Masculino	DP	29,45	9	44
Feminino	Histamina	27,6	4	67
Masculino	Histamina	27,23	5	56

GRÁFICO 1

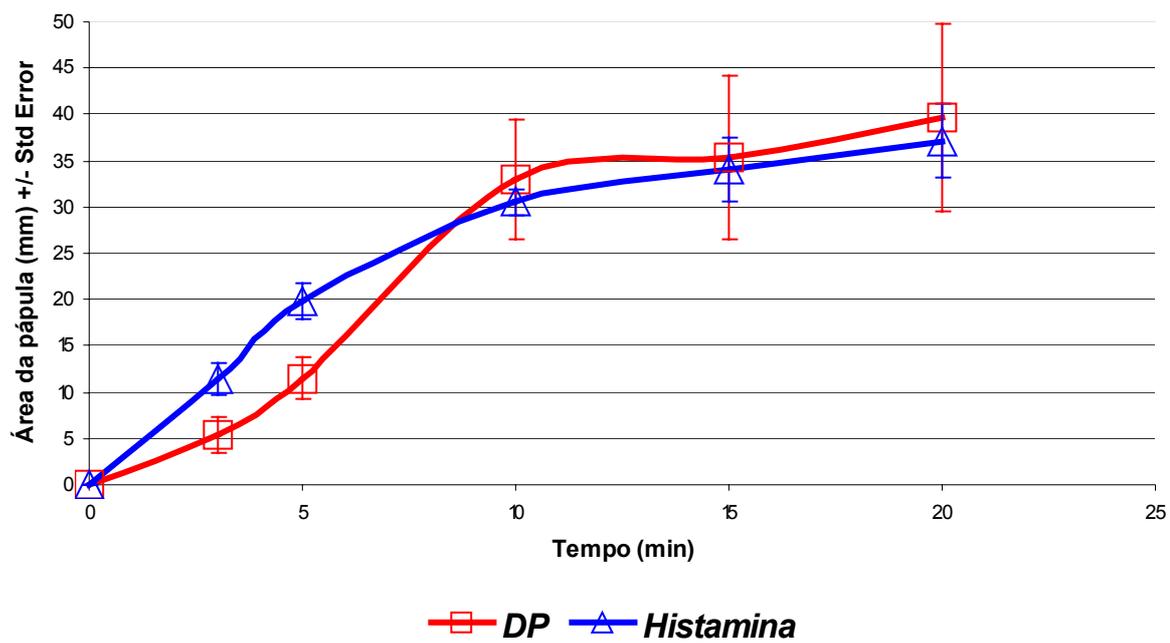


GRÁFICO 2

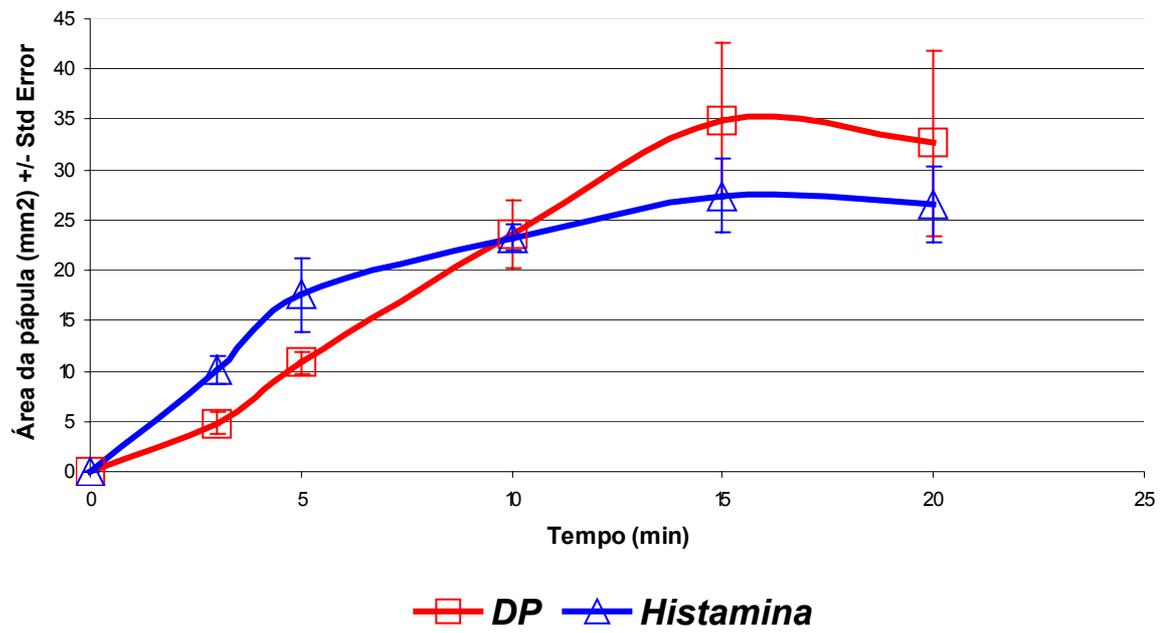
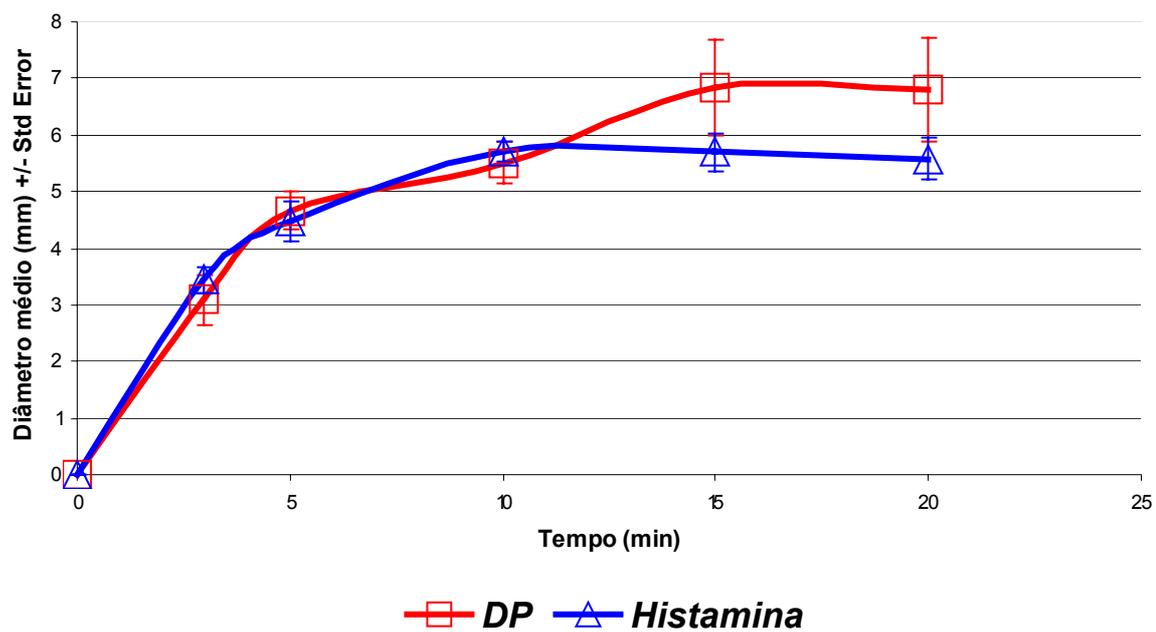


GRÁFICO 3



## LEGENDAS

FIGURA 1 - PRIMEIRO FILTRO UTILIZANDO ADOBE PHOTOSHOP®

FIGURA 2 - SEGUNDO FILTRO UTILIZANDO ADOBE PHOTOSHOP®

NOTA: Filtros para contorno da pápula

FIGURA 3 - TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO - TAMANHO DA PÁPULA EM PIXELS

NOTA: A avaliação da área da pápula por fotografia digital é significativamente reprodutível intra e interobservadores

TABELA 1 - IDADE MÉDIA ENTRE OS SEXOS E OS DESAFIOS

GRÁFICO 1 - CINÉTICA DAS PÁPULAS PELA FOTOGRAFIA DIGITAL EM mm<sup>2</sup>

NOTA: As curvas não apresentam diferença estaticamente significativa entre elas, apenas em relação ao tempo nos vários pontos de análise

GRÁFICO 2 - CINÉTICA DAS PÁPULAS PELA FITA ADESIVA EM mm<sup>2</sup>

GRÁFICO 3 - CINÉTICA DAS PÁPULAS PELO DIÂMETRO MÉDIO EM mm

## ARTIGO II

**Medida objetiva do tamanho e intensidade do eritema, no teste por puntura induzido por histamina e aeroalérgeno, pela fotografia digital, em indivíduos de diferentes fototipos cutâneos**

*Evaluation of erythema from prick test skin using digital photography among volunteers with different phototypes*

**Título abreviado: Eritema induzido por teste por puntura avaliado por fotografia digital**

Rosaly V. dos Santos<sup>1</sup>; Nelson A. Rosário<sup>2</sup>; Hermênio C. Lima<sup>3</sup>

1. Mestranda em Pediatria.
2. Professor Titular em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.
3. Professor Adjunto de Imunologia Clínica da Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

## RESUMO

**Objetivo:** Emprego da fotografia digital como método objetivo para a leitura do eritema induzido por teste cutâneo de puntura.

**Método:** Determinou-se a área e a intensidade do eritema induzido por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus* aplicados por puntura em voluntários com diferentes fototipos. Fotografias foram tomadas a mesma distância aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. Um círculo foi desenhado como referência de área. As fotografias foram analisadas com auxílio do *software* Adobe Photoshop®. Após transformar a imagem do eritema nas cores básicas, sua área foi calculada por comparação com a área conhecida e o resultado expresso em milímetros quadrados. Esse método foi comparado a outros usados na rotina clínica e sua acurácia e precisão também foram avaliadas. Mediu-se a intensidade do eritema comparando os valores da intensidade das cores básicas ajustadas pela luminosidade, com os da pele normal.

**Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa intra e interobservadores ( $p=0,84$ ). Observou-se aumento na área do eritema induzido por histamina e por *D. pteronyssinus*, sem diferença entre as curvas ( $p=0,6$ ), em cada um dos tempos programados. Foi positiva a correlação entre os achados nos três métodos testados, exceto naqueles relativos aos indivíduos com fototipo V. A intensidade da cor vermelha variou significativamente (4,25 a 8) quando comparada à da pele normal ( $p<0.001$ ).

**Conclusão:** A fotografia digital permite medição objetiva do tamanho e da intensidade do eritema no teste cutâneo induzido, independentemente do fototipo do indivíduo.

## ABSTRACT

**Objective:** The present study applied digital photography for objective evaluation of erythema from prick test among volunteers with different phototypes.

**Methods:** Histamine and *Dermatophagoides pteronyssinus* were used on volunteers skin with different phototypes. The camera was held at a fixed distance and digital photos were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min. All pictures were stored and data obtained from analysis at Adobe Photoshop®. Briefly, a circle with a known area was used for size reference. The erythema area was determined by adjust autolevels to isolate the red color from the others. From this transformation, the erythema area was determined. Basic colors intensity and brightness of the flare were compared to that of a normal skin area for erythema intensity evaluation.

**Results:** The computer analysis of the erythema size obtained showed the increase these values with maximum point at 10 min (455.5 mm<sup>2</sup>). Regarding color intensity, the red color varied significantly during the reaction. Intensity of red varied from 4.23 to 7.95 (p<0.001). However, the green color reduced over time. This method was carried out by four observers and we found significative correlation between intra and interobservers. The method was able to determine the flare reaction size and intensity overtime regardless skin color. Moreover, it was only method to demonstrate the presence of erythema among phototype V individuals.

**Conclusions:** The digital photography has allowed an objective method for evaluation of intensity and size of erythema. This method can be used for interpretation of the skin test even in dark skin patients for evaluation of cutaneous flare reaction.

**Palavras-chave:** Fotografia digital; histamina; *Dermatophagoides pteronyssinus*; hipersensibilidade tipo I, eritema, *prick test*; *computer, software*.

## INTRODUÇÃO

Os testes cutâneos são geralmente usados para diagnóstico das doenças alérgicas. Em indivíduos sensibilizados, determinam a presença de anticorpos IgE específicos para o antígeno testado, por meio da degranulação de mastócitos, o que resulta na liberação de histamina e de outros mediadores inflamatórios. Esses mediadores induzem um eritema inicial por vasodilatação capilar, seguido de um eritema periférico pela ação neural reflexa e, finalmente, de uma pápula formada por transudação de líquido intravascular. Essa seqüência é conhecida por resposta tríplice de Lewis.<sup>1</sup>

Na maioria dos estudos, o tamanho da pápula caracteriza a intensidade da reação. O eritema é geralmente avaliado por dois métodos: a) por seu diâmetro médio, calculado a partir da medição (mm) do diâmetro maior e do respectivo diâmetro perpendicular: o eritema será considerado positivo quando seu diâmetro médio for  $\geq 10$  mm de diâmetro; e b) por sua área ( $\text{mm}^2$ ), medida por computador a partir da transferência dos seus contornos, desenhados em fita adesiva, para um sistema digital com auxílio de *escâner*: o eritema será considerado positivo quando for  $\geq 78$   $\text{mm}^2$ .<sup>2</sup>

Poucas pesquisas têm avaliado o eritema pela reatividade cutânea, talvez por ser difícil sua detecção visual, principalmente em pessoas melanodérmicas.<sup>4</sup> Existe, portanto, a necessidade de nova técnica para avaliar o eritema induzido pelo teste cutâneo por puntura de modo que ele ganhe não só em objetividade e reprodutibilidade, como também em sensibilidade e especificidade.

Pelos motivos acima descritos, recorreu-se neste estudo à fotografia digital para avaliar o eritema induzido pelo teste cutâneo por puntura, tendo em vista que ela oferece rapidez, reprodutibilidade, resultados objetivos e documentação.

## **OBJETIVO**

Descrever e avaliar um método novo, reprodutível e prático para determinação do eritema, provocado por puntura, na pele de indivíduos de qualquer fototipo.

## CASUÍSTICA E MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental, observacional, com coleta de dados da reação cutânea a partir da inoculação de um fármaco e de um antígeno. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Seres Humanos do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e realizado nesse hospital.

No período de maio a setembro de 2003 foram selecionados 80 voluntários que durante sete dias antes do teste não tinham feito uso de anti-histamínico ou de outras drogas que pudessem alterar o tamanho da pápula.

As características clínicas de cada indivíduo foram determinadas após observação e questionamento pelo pesquisador principal, e a classificação por fototipo baseou-se na classificação de Fitzpatrick.<sup>7</sup> Consentimento informado de todos os indivíduos ou de seus responsáveis foi obtido previamente ao teste.

## TESTES E FOTOGRAFIAS

Em todos os testes, uma gota de histamina (10 mg/mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil), uma gota de solução salina (IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) e uma gota de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (112.900 UBE mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) foram aplicadas na face anterior do antebraço esquerdo de cada voluntário, com distância mínima de 3 cm entre elas, introduzidas na epiderme por puntura com agulha descartável 26-G em ângulo de 45° com a superfície da pele.

As fotografias foram realizadas com câmera digital Olympus 650 C, sempre a mesma distância entre a lente e a pele e sob mesma iluminação. Um círculo foi colocado como referência de área em local próximo ao teste. As fotografias digitais foram feitas aos 0, 3, 5, 10 e 15 e 20 minutos. A seguir, nos mesmos pontos, a medida do diâmetro da pápula foi determinada com régua milimetrada e transparente e o desenho de seus contornos foi transferido a uma fita adesiva transparente com auxílio de caneta para transparências.

## AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE E DA ÁREA DO ERITEMA

A intensidade do eritema foi determinada em 80 voluntários, com base na área da reação induzida pela histamina e pelo extrato de *D. pteronyssinus* (DP). O espectro de intensidade das cores vermelha, azul e verde varia de 0 a 255 pelo *software*. A média da intensidade das cores determina a luminosidade de cada *pixel*. Por exemplo, preto significa que as cores vermelha, azul e verde são iguais a zero, enquanto branco significa que as cores vermelha, azul e verde são iguais a 255.

Os achados foram comparados com os de 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  $\pm$  erro padrão.

Para avaliação da área do eritema pela fotografia digital, recorreu-se à área previamente conhecida colocada perto do local do teste. As fotos armazenadas foram analisadas com auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup>.

O local do eritema foi selecionado e nessa imagem foi feito o ajuste de níveis das cores básicas e da luminosidade. Uma área do eritema e todas as áreas similares foram selecionadas com *magic wand tool*, chegando-se ao histograma cuja quantidade de *pixels* foi comparada com a quantidade de *pixels* da área conhecida.

Assim obtida a área de cada eritema nos diferentes pontos de análise, seus dados foram colocados no programa Excel, analisados estatisticamente e expressos em média  $\pm$  erro padrão.

O diâmetro médio do eritema foi calculado a partir da medição do diâmetro maior e do seu perpendicular.

Para avaliar a área do eritema, colou-se num papel em branco a fita adesiva com o desenho da reação, ao lado de uma área previamente conhecida, transferindo ambos os desenhos para o computador por *escâner*.

Analisadas as imagens pelo Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup>, estabeleceu-se uma correlação matemática da quantidade de *pixels* da área do eritema com a quantidade de *pixels* da área conhecida; tais achados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

#### TESTE DE REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi testada intra-observador e interobservadores, em trinta imagens escolhidas aleatoriamente.

Na primeira avaliação, duas determinações foram realizadas pelo mesmo observador, com intervalo de três meses entre as leituras e sem conhecimento dos valores anteriores.

Na avaliação interobservadores, os achados de um dos observadores foram comparados aos dos outros três: um deles médico, alergista, dermatologista e especialista em fotografia digital com experiência no uso do *software*; e dois não médicos – um com e outro sem experiência em programa de computador.

#### TESTE DE ACURÁCIA

Os resultados obtidos pela fotografia digital foram comparados com os obtidos pelos métodos da fita adesiva e do diâmetro médio.

A determinação da área a partir do desenho na fita adesiva foi feita sempre pelo mesmo observador e de acordo com a metodologia descrita no artigo I, com pequenas modificações.<sup>3</sup>

A medição do diâmetro médio foi realizada por dois observadores no mesmo tempo do teste.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação da cinética evolutiva da área para cada estímulo, usou-se ANOVA para medidas repetidas.

Para a avaliação das diferenças entre os tempos, do teste de acurácia e da reprodutibilidade, empregou-se o teste t de *Student*, uma vez que os dados eram contínuos e apresentavam distribuição normal.

A comparação dos diferentes métodos de obtenção das medidas da pápula com o método da fotografia digital foi realizada por meio da correlação e regressão linear ou polinomial.

No processo de ajuste para os potenciais confundidores (sexo, idade, fototipo), testes de qui-quadrado e de regressão foram usados nos diferentes modelos.

O valor de  $p < 0,05$  foi associado à significância estatística. Os dados foram analisados com auxílio dos *softwares* Statistica (Statsoft, USA) e JMP (SAS Institute, USA).

## RESULTADOS

### CASUÍSTICA

Teste cutâneo por puntura foi realizado em 80 voluntários, 31 dos quais (38,8%) eram do sexo masculino e 49 (61,2%) do feminino.

Cinquenta e oito foram classificados como fototipo II ou III (72,5%) e 5 como fototipo V na classificação de cor de pele feita por Fitzpatrick.<sup>5</sup>

Na amostra – que teve a participação de 19 crianças – a média de idade foi de 25,2 anos. A análise do fototipo, por qui-quadrado, não demonstrou diferença significativa entre o grupo do alérgeno e o da histamina ( $p=0,2$ ).

### TESTE DE REPRODUTIBILIDADE E ACURÁCIA

Considerando que interpretação de dados tem forte componente subjetivo, quatro foram os encarregados de realizar as análises dos resultados dos testes, análises feitas intra e interobservadores. Pelo teste t de Student, não houve diferença estatisticamente significativa intra-observador nem interobservadores ( $p=0,84$ ) (figura 1).

Para avaliação da acurácia do método, comparando os dados da área do eritema obtidos por fotografia digital com os dados obtidos com o desenho na fita adesiva e com a medida do diâmetro médio, os achados mostraram haver correlação estatisticamente significativa entre si nos três métodos no 10.<sup>o</sup> minuto ( $p<0,0001$ ;  $r^2_{adjust}=0,54$ ;  $r^2_{adjust}=0,51$ , respectivamente).

A cinética das curvas do tamanho do eritema mostrou-se semelhante também nos três métodos.

## INTENSIDADE E ÁREA DO ERITEMA

A intensidade do eritema foi determinada em cada voluntário. Pela cinética das cores básicas – similares entre os sujeitos testados, independentemente do fototipo –, os dados foram agrupados, e realizada a média nos pontos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos.

Quando comparada à da pele normal, a cor vermelha variou significativamente em cada tempo de observação, com médias de 0;  $4,25 \pm 0,96$ ;  $5,10 \pm 1,04$ ;  $3,75 \pm 1,80$ ;  $7,35 \pm 0,6$  e  $8,05 \pm 0,69$ , respectivamente; a partir do 3.º minuto foi estatisticamente maior na área do teste cutâneo que na área controle ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, não apenas a cor vermelha foi diferente em relação à cor da área controle. A intensidade da cor verde também variou com o tempo, reduzindo-se a partir do 3.º minuto após a aplicação da histamina ( $p < 0,0001$ ). A intensidade da cor azul foi a única que não apresentou alteração com o tempo ( $p = 0,67$ ).

Não houve diferença significativa na intensidade do eritema induzido por histamina e por DP ( $p = 0,6$ ), nem nas cores básicas em relação aos fototipos (gráficos 4 e 5).

A área do eritema pelo método da fotografia digital apresentou correlação significativa com a encontrada pelos outros dois métodos no 10.º minuto; já no 15.º minuto houve correlação apenas com o diâmetro médio do eritema; nos outros tempos não houve correlação significativa.

O tamanho máximo do eritema pela fotografia digital e pela área calculada a partir da fita adesiva foi encontrado, em média, no 10º minuto, e pelo diâmetro médio no 15.º minuto (gráficos 1, 2, 3).

Não houve diferença significativa da área do eritema entre histamina e DP; tampouco houve diferença na cinética do eritema quando analisado separadamente entre os voluntários positivos e negativos para *D. pteronyssinus*.

Analisados os métodos quanto aos fototipos, não se verificou correlação significativa com o fototipo V em nenhum deles.

## DISCUSSÃO

Com base na imagem da reação do teste cutâneo por puntura obtida pela fotografia digital, determinou-se a área e a intensidade do eritema, independentemente do fototipo da paciente.

Os achados mostram que a metodologia favorece a observação, pois consegue fracionar as cores básicas e isolar a cor vermelha, componente mais importante do eritema. Essa afirmação deriva da análise dos voluntários recrutados de forma aleatória, portanto sem prévia seletividade, o que poderia incluir fatores que influenciassem a significância dos resultados.

Várias têm sido as tentativas de tornar possível uma avaliação precisa do teste cutâneo por puntura. Poulsen et al. criaram o método que consiste em escanear a imagem da área da pápula e do eritema desenhada em fita adesiva e calculá-la com auxílio de um sistema computadorizado.<sup>2</sup> Em estudo semelhante realizado por Pijnenborg et al.<sup>4</sup>, a delimitação da reação é feita visualmente, o que dificulta a avaliação do eritema em indivíduos melanodérmicos.

Também as alterações do fluxo sangüíneo no local do teste cutâneo têm sido mensuradas.<sup>5,6</sup>

Avaliando com auxílio da fotografia digital o grau do eritema induzido por histamina intradérmica, concluiu-se que a fotografia digital é mais sensível do que a percepção visual ou que a cromametria das diferenças de cores.<sup>7</sup> Na mesma linha de análise por imagens digitais, Flemming usou câmeras digitais para interpretar alterações de pele em certas dermatoses.<sup>8</sup> Também Cascinelli et al., em 1992, recorreram à fotografia para analisar melanoma em televisor com imagens coloridas digitalizando essas imagens para um sistema computadorizado.<sup>9</sup> Jamora et al., estudando o melanoma a partir da imagem computadorizada, concluíram que elas permitem avaliar lesões pigmentadas de pele sem suspeita clínica, as quais sem esse meio de pesquisa poderiam ser negligenciadas.<sup>10</sup>

Entretanto continua obscuro o real significado do eritema a partir de reação neural reflexa na positividade do teste cutâneo por puntura, uma vez que apenas a área marcada pela mancha tem sido considerada, desprezando-se a sua intensidade, pela extrema subjetividade a que está sujeita tal aferição. Entretanto, ambos os aspectos podem ser importantes não só para entender a fisiologia do desenvolvimento de doenças como a urticária, mas também para avaliar a eficácia de novos fármacos usados na terapêutica das alergias.

Este é o primeiro estudo que propõe a fotografia digital como instrumento de análise capaz de realizar uma avaliação objetiva do eritema induzido no teste cutâneo por puntura. Neste estudo, apesar do número pequeno de indivíduos com fototipos IV ou V na amostra, a dificuldade de visualização evidentemente se repetiu tanto na medição dos diâmetros quanto no desenho do eritema na fita adesiva. Já pela análise computadorizada da fotografia digital, o eritema destacou-se da pele normal, mostrando diferenças sutis na imagem, o que permitiu calcular sua área em todos os fototipos analisados. Esses resultados, portanto, abrem uma nova linha de observação do eritema, com potencial influência no entendimento da sua fisiopatologia.

Tal como ocorre na população local, na amostra objeto desta pesquisa houve predominância de indivíduos brancos sobre doze indivíduos melanodérmicos. Um estudo multicêntrico em locais onde prevalece indivíduos melanodérmicos está previsto para ser iniciado em breve.

Outro problema inerente aos testes cutâneos é o da interferência do observador, visto que ele não é imune ao subjetivismo em sua análise; pode ter, por exemplo, tendência para atribuir valores positivos aos testes (interesse de associação). Entretanto, neste estudo, por terem sido determinados longe da presença do observador e desvinculados de qualquer avaliação clínica, os achados foram os mais possíveis objetivos. A acurácia do teste e sua reprodutibilidade foram testadas e confirmadas, independentemente do observador. Outros fatores que pudessem interferir no eritema e em sua análise, como fármacos vasoativos, foram retirados.

Considerando também que os resultados dos testes poderiam sofrer interferência do método e do antígeno aplicado, optou-se por usar somente um método de inoculação e dois desafios, histamina e DP, bem como o controle negativo. Além do mais, o uso de um antígeno poderia informar se havia diferença em velocidade e intensidade no desenvolvimento da reação por ação direta de histamina e do antígeno. Em ambos os casos, todas as situações controladas mostraram que o desafio não interfere na interpretação dos resultados; e quando estes foram considerados em relação ao sexo e à idade, não se modificaram significativamente.

Embora fatores, como a presença de atopia (DP positivo), pudessem acentuar a área e a intensidade do eritema, não houve evidência de tal associação neste estudo. Poder-se ia considerar que os resultados tenham sido um artifício de tratamento de imagem. No entanto fatores como luminosidade do ambiente foram controlados com o mesmo recurso técnico de fotografia. As curvas de evolução do vermelho, do verde e do azul foram essencialmente as mesmas para os pacientes dos diferentes fototipos. Tendo o estudo sido controlado de tal modo que a interferência e a interpretação do observador fosse minimizada, pode-se desconsiderar essa hipótese de erro de artifício, uma vez que os achados foram reproduzidos de maneira similar em todas as situações.

Como se observou maior facilidade de obtenção de dados em indivíduos desprovidos de pêlos no local do teste, sugere-se que a tricotomia seja rotina antes da punção. Acrescente-se que o tamanho da amostra superou as necessidades do desenho do estudo previamente estabelecido, pois muitos resultados apresentaram significância estatística com  $p < 0,0001$ .

O estudo foi limitado a seus objetivos. Assim, aspectos como a interferência de fármacos no desenvolvimento do eritema, fazem parte de pesquisas em andamento.

Não foram estudadas, neste experimento, outras câmeras digitais, de maior ou menores resoluções ou de outros fabricantes. Nem se estudou outro *software* de tratamento de imagem e luminosidade. É possível que novos parâmetros sejam adicionados quando essas variáveis forem incorporadas.

Neste estudo não se verificou correlação da área da pápula com a do eritema pela fotografia digital ( $r^2=0,006$ ;  $p=0,88$ ). Já pelos outros dois métodos – do diâmetro médio e da fita adesiva – essa correlação foi baixa apesar de significativa ( $r^2=0,27$ ;  $p<0,0001$ ), o que pode ter ocorrido pela maior facilidade de reconhecer o tamanho do eritema por imagem digitalizada e computadorizada do que pela imagem captada somente pela visão.

Finalmente, a avaliação do eritema por fotografia digital é significativamente reprodutível intra-observador e interobservadores e se correlaciona com métodos empregados rotineiramente, independentemente de qual seja o aeroalérgeno, principalmente no eritema de fácil visualização. Demonstrou-se também a possibilidade de incorporar a intensidade do eritema aos componentes de avaliação do teste cutâneo, e também a área do eritema no caso de pacientes melanodérmicos.

Os resultados deste estudo mostram que o método da fotografia digital é indispensável na prática médica da alergia, pois adicionam simplicidade, reprodutibilidade, rapidez, documentação, baixo custo e geralmente baixo risco a um parâmetro pouco considerado na prática clínica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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**, v.42, n.2, p.117-125, 1987.
2. POULSEN, L. K.; LIISBERG, C.; BINDSLEV-JENSEN, C.; MALLING, H. J. Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. **Clin Exp Allergy**, v.23, n.1, p.61-68, 1993.
3. LU, H.; EDWARDS, C.; GASKELL, S.; PEARSE, A.; MARKS, R. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. **Br J Dermatol**, v.135, n.2, p.263-267, 1996.
4. PIJNENBORG, H.; NILSSON, L.; DREBORG, S. Estimation of skin prick test reactions with a scanning program. **Allergy**, v.51, n.11, p.782-788, 1996.
5. 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**, v.82, n.2, p.291-296, 1988.
6. CLOUGH, G. F.; BENNETT, A. R.; CHURCH, M. K. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging. **Br J Dermatol**, v.38, n.5, p.806-814, 1998.
7. BOYSEN, L.; LARSEN, M.; SERUP, J.; KRISTENSEN, F. Evaluation of skin erythema by use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. **Am J Vet Res**, v.63, n.4, p.565-569, 2002.
8. FLEMING, M. G. Digital dermoscopy. **Dermatol Clin**, v.19, n.2, p.359-367, 2001.
9. CASCINELLI, N.; FERRARIO, M.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; GALIMBERTI, V.; MASCHERON, I. L.; BARTOLI, C.; CLEMENTE, C. Results obtained by using a computerized image analysis system designed as an aid to diagnosis of cutaneous melanoma. **Melanoma Res**, v.2, n.3, p.163-170, 1992.
10. JAMORA, M. J.; WAINWRIGHT, B. D.; MEEHAN, S. A.; BYSTRYN, J. C. Improved identification of potentially dangerous pigmented skin lesions by computerized image analysis. **Arch Dermatol**, v.139, n.2, p.195-198, 2003.

FIGURA 1

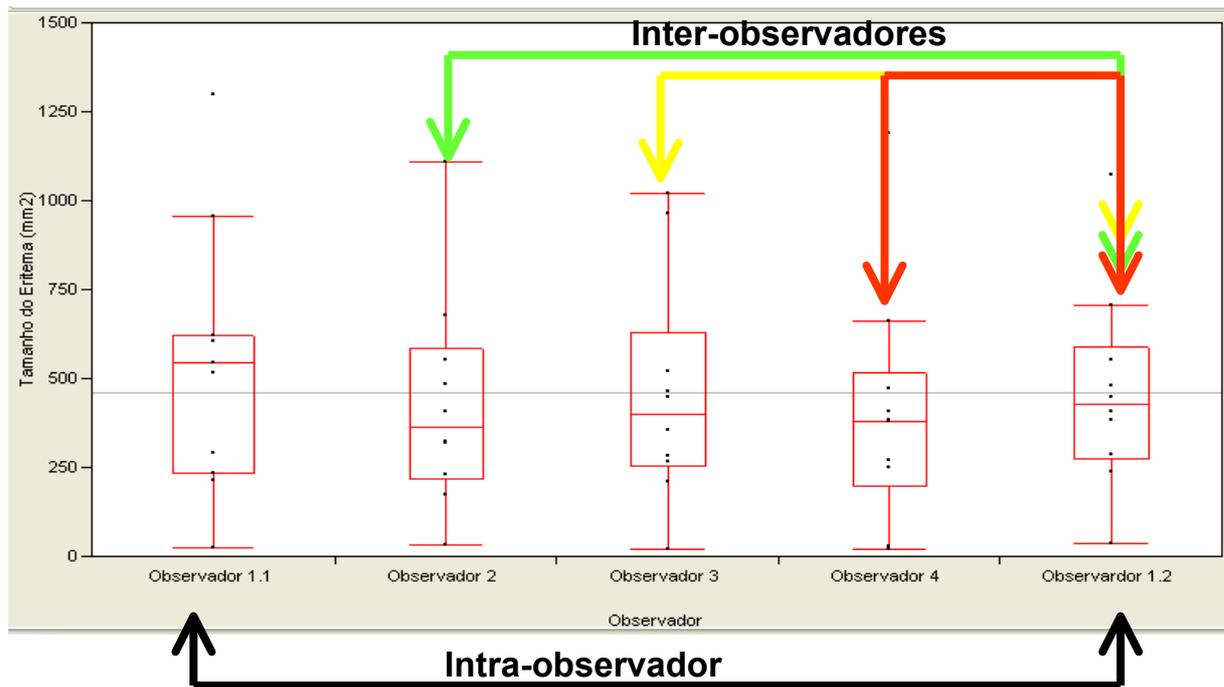


GRÁFICO 1

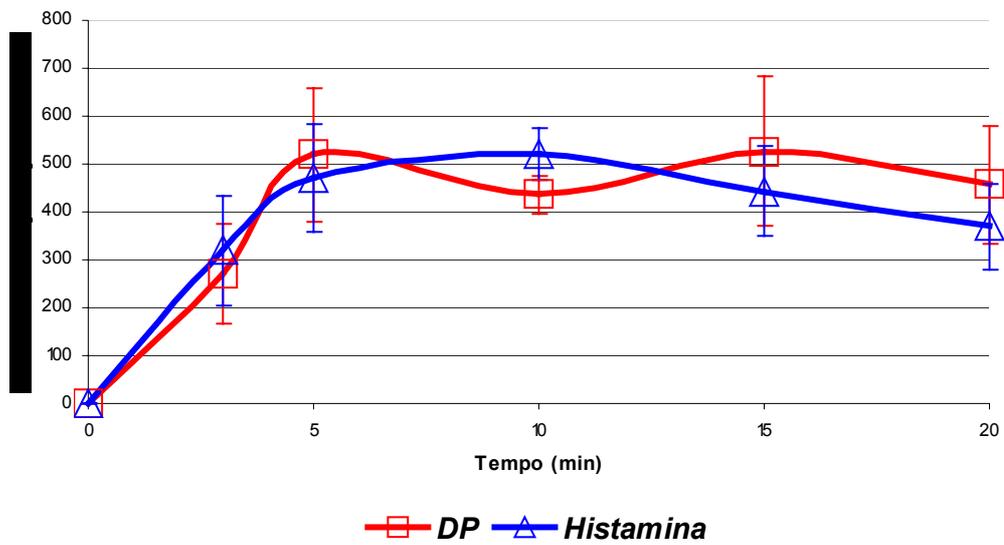


GRÁFICO 2

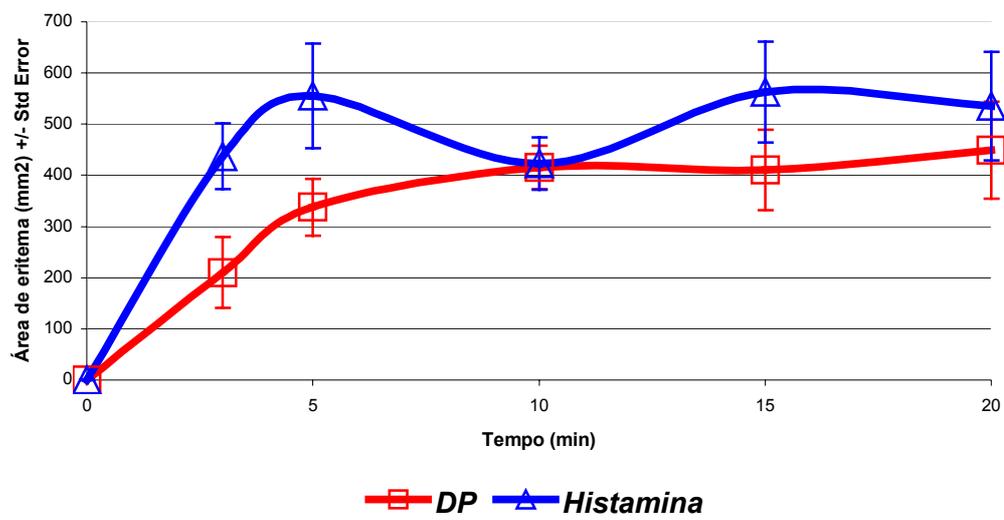


GRÁFICO 3

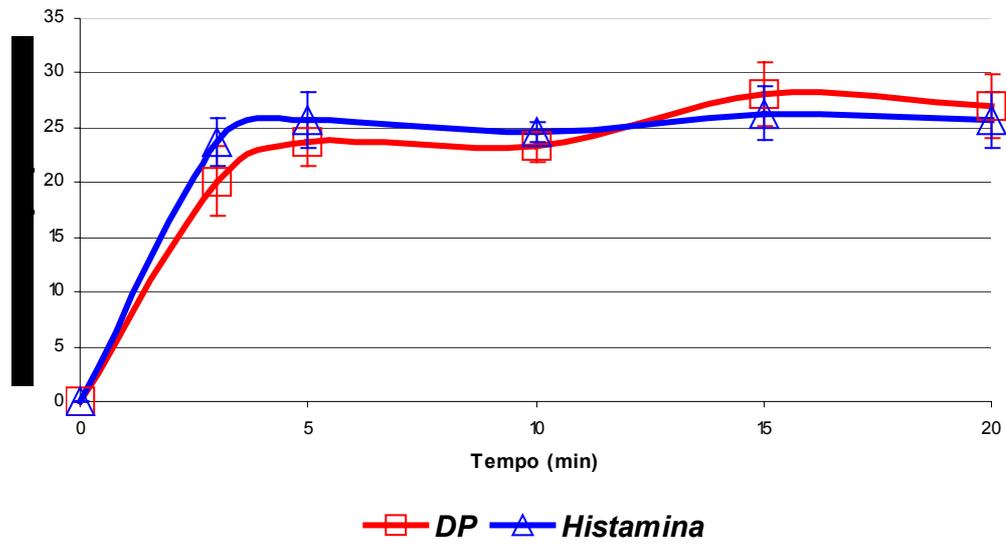


GRÁFICO 4

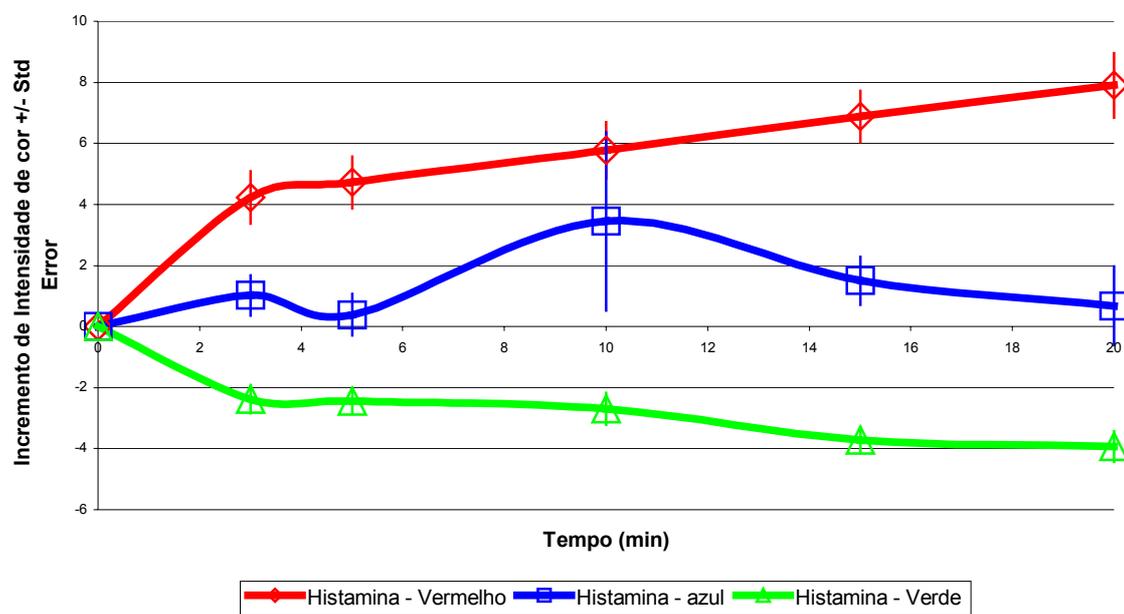


GRÁFICO 5

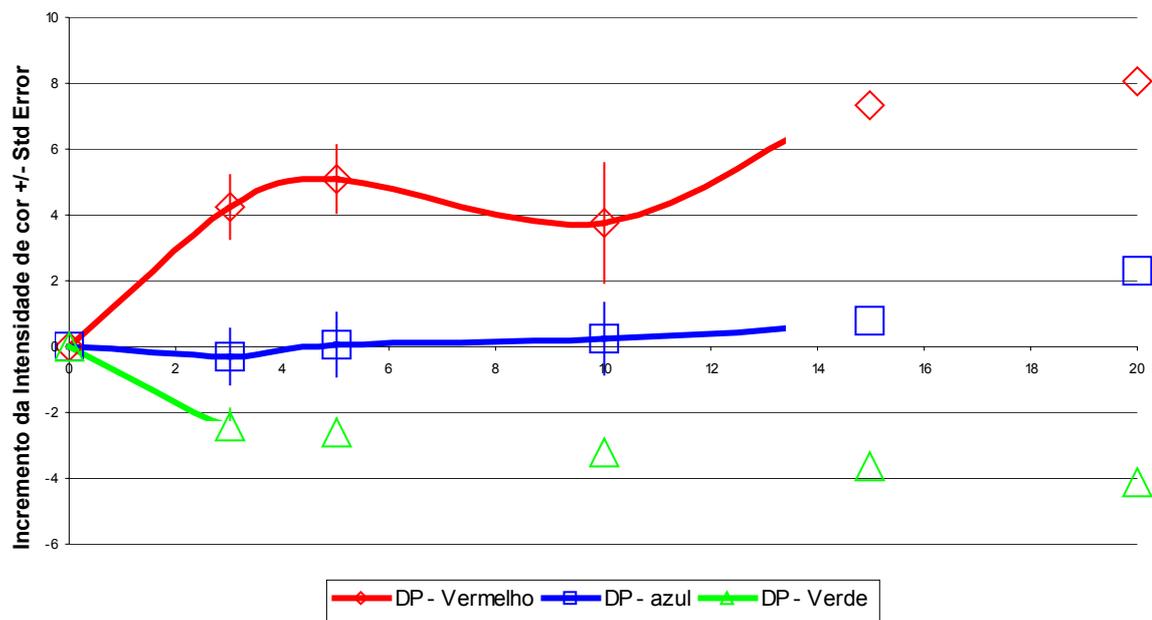


FIGURA 2

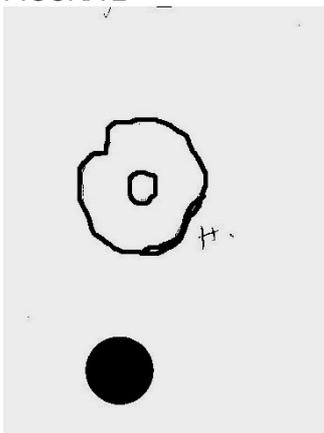


FIGURA 3



FIGURA 4



FIGURA 5

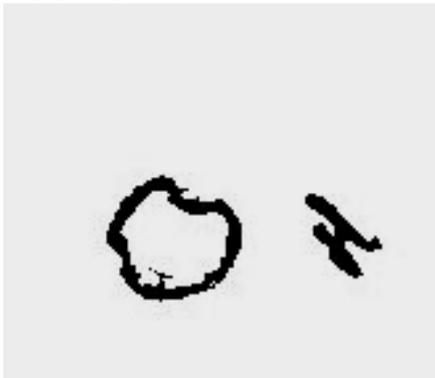


FIGURA 6



FIGURA 7



FIGURA 8

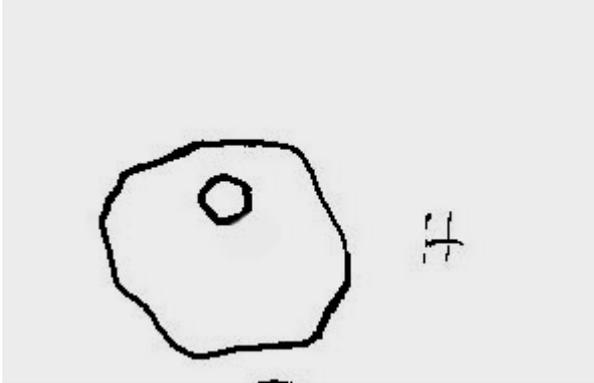
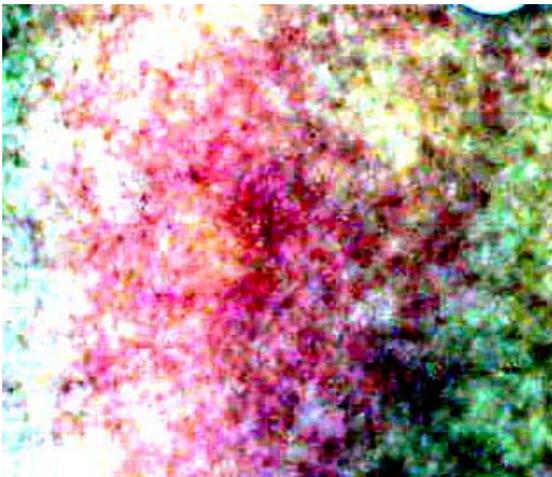


FIGURA 9



FIGURA 10



## LEGENDAS

### FIGURA 1 - TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO

NOTA: A avaliação da área do eritema por fotografia digital é significativamente reprodutível intra e interobservadores.

### GRÁFICO 1 - CINÉTICA DO TAMANHO DO ERITEMA POR FOTOGRAFIA DIGITAL

### GRÁFICO 2 - CINÉTICA DO TAMANHO DO ERITEMA POR FITA ADESIVA

### GRÁFICO 3 - CINÉTICA DO TAMANHO DO ERITEMA PELO DIÂMETRO MÉDIO

### GRÁFICO 4 - CINÉTICA DA INTENSIDADE DO ERITEMA INDUZIDO POR HISTAMINA

NOTA: 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, 15 e 20 minutos. As cores foram corrigidas pela intensidade da luminosidade.

### GRÁFICO 5 - CINÉTICA DA INTENSIDADE DO ERITEMA INDUZIDO POR EXTRATO DE *Dermatophagoides pteronyssinus*

NOTA: As curvas das cores não apresentam diferença estaticamente significativa entre elas, apenas em relação ao tempo nos vários pontos de análise.

### FIGURA 2 - DESENHO DO ERITEMA EM FITA ADESIVA

NOTA: Reação cutânea por puntura, induzida por histamina, desenhada em fita adesiva transparente ao décimo minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo III.

### FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DIGITAL: ÁREA SELECIONADA DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA INDUZIDO POR HISTAMINA

NOTA: Fotografia digital realizada ao décimo minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo III. Área selecionada do local da puntura utilizando a histamina.

### FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DIGITAL: ERITEMA ISOLADO POR FILTROS DO ADOBE PHOTOSHOP 6.0<sup>®</sup>

NOTA: Eritema, induzido por histamina no teste por puntura, isolado por filtros contidos no Adobe Photoshop<sup>®</sup>, com fotografia realizada ao décimo minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo III.

### FIGURA 5 - DESENHO DO ERITEMA EM FITA ADESIVA

NOTA: Reação cutânea por puntura, induzida por histamina, desenhada em fita adesiva transparente ao 15.º minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo II.

### FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DIGITAL: ÁREA SELECIONADA DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA INDUZIDO POR HISTAMINA

NOTA: Fotografia digital realizada ao 15.º minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo II. Área selecionada do local da puntura utilizando a histamina.

### FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DIGITAL: ERITEMA ISOLADO POR FILTROS DO ADOBE PHOTOSHOP 6.0

NOTA: Eritema, induzido por histamina no teste por puntura, isolado por filtros contidos no Adobe Photoshop<sup>®</sup>, com fotografia realizada ao 15º minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo II.

### FIGURA 8 - DESENHO DO ERITEMA EM FITA ADESIVA

NOTA: Reação cutânea por puntura, induzida por histamina, desenhada em fita adesiva transparente ao 20.º minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo V.

FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DIGITAL: ÁREA SELECIONADA DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA INDUZIDO POR HISTAMINA

NOTA: Fotografia digital realizada ao 20.º minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo V. Área selecionada do local da puntura utilizando a histamina.

FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DIGITAL: ERITEMA ISOLADO POR FILTROS DO ADOBE PHOTOSHOP 6.0®

NOTA: Eritema, induzido por histamina no teste por puntura, isolado por filtros contidos no Adobe Photoshop®, com fotografia realizada ao 20.º minuto pós-provocação em indivíduo de fototipo V.

### **ARTIGO III**

**Parâmetros inflamatórios no teste cutâneo induzido por puntura  
determinados por fotografia digital e termometria cutânea**

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

**Título abreviado: Teste cutâneo por puntura avaliado por fotografia  
digital**

Rosaly V. dos Santos<sup>1</sup>; Nelson A. Rosário<sup>2</sup>; Hermênio C. Lima<sup>3</sup>

1. Mestranda em Pediatria.
2. Professor Titular em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.
3. Professor Adjunto de Imunologia Clínica da Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

## RESUMO

**Objetivo:** Demonstrar e comparar a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea *in vivo*.

**Método:** Estudo experimental. Foi determinada a velocidade das variáveis da reação cutânea induzida por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus* na face volar do antebraço de voluntários, aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. Uso de anti-histamínico foi critério de exclusão. O tamanho da pápula e o tamanho e a intensidade do eritema foram determinados pela análise das imagens em fotografia digital, método no artigo I e II. Filmou-se o local do teste cutâneo durante 20 minutos com câmera infravermelha de alta sensibilidade, em ambiente a 19°C, sem corrente de ar. Os dados foram analisados em *software* específico. Todos os dados foram transformados por um fator de unidade no 10º minuto de cada grandeza. Determinou-se em cada ponto a tangente da curva de intensidade unitária e dividiu-se cada resultado pelo tempo entre cada ponto específico. Resultados da velocidade foram expressos em unidade  $\pm$  erro padrão.

**Resultados:** Não houve diferença na cinética da reação entre os desafios. Nos primeiros 3 minutos a intensidade do eritema atingiu velocidade máxima, com diferença significativa em relação à pápula e à temperatura. A pápula obteve velocidade maior entre o 5.º e o 10.º minuto em relação ao eritema.

**Conclusão:** Termometria cutânea e fotografia digital são métodos objetivos de leitura do teste cutâneo por puntura; incorporam novas variáveis nos testes cutâneos e no diagnóstico de doenças alérgicas mediadas por IgE e determinam a cinética do desenvolvimento da reação cutânea refletindo a reação tríplice de Lewis.

## ABSTRACT

**Objective:** The present study was to demonstrate the kinetic of skin prick test reaction *in vivo*.

**Methods:** Histamine and *D. pteronyssinus* extract was used in volunteers. The camera was held at a fixed distance and digital photos of skin reaction were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min. The wheal and erythema size and the intensity of the erythema were determined by Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup> by method described before. The infrared camera was used to film for 20 min in the place of prick test. The data were analyzed by TermaCam<sup>®</sup> 2000 software. All the data obtained were transformed in the same unity. The tangent was determinate in each point and divided by time to obtain the speed of each parameter development. The velocity is shown in unity / min  $\pm$  standartization error.

**Results:** There was not difference of kinetic reaction of each inflammatory parameter observed induced by histamine or *D. pteronyssinus* extract. As overall, the erythema size and intensity developed first followed by the increase in the temperature and wheal. These results are dependent the developmental speed of each inflammatory parameter. The erythema intensity and size presented the maximal velocity in the first 3 minutes. However, the wheal and temperature obtained the maximal between 5 and 10 minutes.

**Conclusion:** The skin infrared thermometry and digital photography are objective methods to evaluate the skin prick test. Moreover, they are able to determine the kinetic of this reaction induced by antigen or histamine representing graphically the Lewis' triple reaction. In addition, it was created the new parameter of skin reaction that may be important in future studies.

**Palavras-chave:** Teste cutâneo, histamina, termografia, inflamação, aeroalérgeno, fotografia digital, *prick test*, *computer*, *software*, *infrared thermometry skin*.

## INTRODUÇÃO

Os sinais inflamatórios caracterizam-se por dor, rubor, calor e tumor, já descritos por Celsius no primeiro século da era cristã. Na metade do século XIX, Virchow adicionou “perda de função” aos sinais da inflamação.<sup>1</sup>

A reação cutânea induzida pelo teste de puntura apresenta características de inflamação. Observa-se inicialmente uma reatividade vascular (eritema) após a introdução de histamina ou antígeno na pele, seguida de vasodilatação reflexa ao redor do local da inoculação, e da formação de edema por extravasamento de líquido. Essa seqüência caracteriza a reação tríplice de Lewis, que, no final do processo, resulta no aumento da temperatura e do edema local (pápula), no eritema reflexo ao redor da pápula e no prurido. Tudo isso, em conjunto, forma os sinais cardinais da inflamação.<sup>2</sup>

Estudos sobre teste cutâneo geralmente não contemplam todas as variáveis nas análises da reação induzida. Embora o tamanho da pápula seja o principal indicador da intensidade da reação, variações individuais são observadas, entre as quais a presença de eritema sem pápula e vice-versa, cujo significado é pouco compreendido. Além disso, a temperatura é um parâmetro pouco estudado, talvez pela dificuldade técnica para realização de estudos precisos. Finalmente, a intensidade do prurido é dependente da subjetividade do paciente. A interpretação dessas características em um único desenvolvimento cinético não foi ainda evidenciada, embora a relação cinética entre elas já seja conhecida na reação tríplice de Lewis.

## OBJETIVO

Demonstrar e comparar a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea relacionados entre si *in vivo*. Assim, análises comparativas por metodologias digitais são capazes de representar esses fatores sem a interferência de análise subjetiva.

Para cumprir tais objetivos, métodos de fotografia digital e termometria infravermelha combinados num só sistema permitiram nova avaliação da reação inflamatória induzida por histamina e aeroalérgeno no teste cutâneo por puntura.

## CASUÍSTICA E MÉTODO

Este é um estudo experimental, observacional, com coleta de dados da reação cutânea a partir da inoculação de um fármaco e de um antígeno.

Foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Seres Humanos do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e realizado nesse hospital.

Voluntários que durante sete dias antes não tinham feito uso de anti-histamínico ou de outras drogas que pudessem alterar o tamanho da pápula foram selecionados para avaliação do teste cutâneo: 32 por fotografia digital e outros 15 por termometria cutânea; estes não haviam praticado nenhum tipo de esporte nas quatro horas imediatamente anteriores ao teste.

As características clínicas de cada indivíduo foram determinadas após observação e questionamento pelo pesquisador principal. Consentimento informado de todos os indivíduos ou de seus responsáveis foi obtido previamente ao teste.

## TESTES E FOTOGRAFIAS

Em todos os testes, uma gota de histamina (10 mg/mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil), uma gota de solução salina e uma gota de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (112.900 UBE mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) foram aplicadas na face anterior do antebraço esquerdo dos voluntários, com distância mínima de 3 cm entre elas, introduzidas na epiderme por puntura com agulha 26-G em ângulo de 45° com a superfície da pele.

As fotografias foram realizadas com câmera digital Olympus 650C, sempre a mesma distância entre a lente e a pele.

Usou-se um círculo como referência de área em local próximo ao teste. Fotografias digitais foram feitas aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos.

## DETERMINAÇÃO DA ÁREA DA PÁPULA

Para avaliação da pápula por fotografia digital, selecionou-se uma região ao redor do teste. O contorno da pápula foi determinado por filtros de transformação de imagem com auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup>. Estabeleceu-se uma correlação matemática comparando a quantidade de *pixels* da área da pápula com os da área conhecida. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Para avaliação da área do eritema por fotografia digital, recorreu-se à área previamente conhecida colocada perto do local do teste. As fotos armazenadas foram analisadas com auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0<sup>®</sup>. O local do eritema foi selecionado e nessa imagem foi feito o ajuste de níveis das cores básicas e da luminosidade. Uma área do eritema e todas as áreas similares foram selecionadas com *magic wand tool*, chegando-se ao histograma cuja quantidade de *pixels* foi comparada com a quantidade de *pixels* da área conhecida. Assim obtida a área de cada eritema nos diferentes pontos de análise, seus dados foram colocados no programa Excel, analisados estatisticamente e expressos em média  $\pm$  erro padrão.

## DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DO ERITEMA

Considerou-se a área da reação induzida pela histamina e pelo extrato de *D. pteronyssinus* (DP).

O espectro de intensidade do vermelho foi determinado pelo *software* e 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  $\pm$  erro padrão.

## DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA

Voluntários foram colocados no local do teste 20 minutos antes da sua realização. A filmagem na região do teste foi realizada durante 20 minutos em ambiente controlado, sem corrente de ar, em temperatura ambiente de 19°C, com câmera infravermelha de alta sensibilidade.

A gravação da imagem digital foi feita em 14 *bits* em tempo real. Os dados foram acumulados em *software* específico e a diferença da intensidade de temperatura em cada ponto foi determinada em relação aos valores basais usando o *software* TermaCam® 2000.

## TRANSFORMAÇÃO POR UNIDADE E DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE

Para comparar os achados com diferentes grandezas em relação ao tempo, todos os dados foram transformados por um fator de unidade no 10<sup>o</sup> minuto de cada grandeza. Dessa forma, a redução ou ampliação se deu na mesma proporção para todos os dados, e cada variável apresentava uma unidade no 10<sup>o</sup> de avaliação. Os valores foram expressos em unidades  $\pm$  erro padrão x tempo (min).

Em cada ponto, determinou-se a velocidade traçando a tangente da curva de intensidade unitária. Cada resultado foi dividido pelo tempo entre cada ponto específico. Os resultados da velocidade foram expressos em unidade  $\pm$  erro padrão.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar a cinética evolutiva da área para cada estímulo, as análises foram realizadas com ANOVA para medidas repetidas.

Para análise das diferenças entre as velocidades usou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon, uma vez que os dados não apresentavam distribuição normal e resultavam de transformação.

Em todas as análises o valor de  $p < 0,05$  foi associado à significância estatística. Os dados foram analisados pelo *software* JMP (SAS Institute, USA).

## RESULTADOS

### CASUÍSTICA

Teste cutâneo por puntura foi analisado em 31 voluntários, 58% dos quais do sexo masculino. A média de idade foi de 29,27 anos. Nove voluntários apresentaram positividade ao *D. pteronyssinus*.

#### Cinética da área do eritema

Não houve diferença significativa da área do eritema entre histamina e DP ( $p=0,61$ ). O tamanho máximo do eritema causado pela histamina ocorreu no 10.<sup>o</sup> minuto (440,21 mm<sup>2</sup>), e pelo DP no 15.<sup>o</sup> minuto (536,79 mm<sup>2</sup>) (gráfico 1).

#### CINÉTICA DA ÁREA DA PÁPULA

Observou-se um aumento progressivo na área da pápula induzida tanto pelo DP quanto pela histamina, com pico máximo no 15.<sup>o</sup> minuto (23,7 mm<sup>2</sup>) pela histamina e no 20.<sup>o</sup> minuto pelo DP (26,89), sem diferença quanto ao desenvolvimento cinético ( $p=0,81$ ) (gráfico 2).

#### CINÉTICA DA INTENSIDADE DO ERITEMA

Quando comparada à cor da pele normal, a cor vermelha variou significativamente em relação ao tempo de observação, com médias de 0; 4,25±0,96; 5,10±1,04; 3,75±1,80; 7,35±0,6 e 8,05±0,69 nos tempos predeterminados; a partir do 3.<sup>o</sup> minuto foi estatisticamente maior na área do *prick test* que na área controle ( $p<0,0001$ ).

A intensidade da cor verde também variou com o tempo, reduzindo-se a partir do 3.<sup>o</sup> minuto após aplicação da histamina ( $p<0,0001$ ). A intensidade da cor azul não apresentou alteração com o tempo ( $p=0,67$ ).

Não houve diferença significativa da intensidade do eritema entre histamina e DP ( $p=0,6$ ) (gráficos 3 e 4).

#### CINÉTICA DA TEMPERATURA NO LOCAL DO TESTE CUTÂNEO

A temperatura manteve-se quase constante nos níveis basais nos primeiros dois minutos. Após esse tempo iniciou-se um aumento progressivo da intensidade da temperatura cutânea, com elevação linear de 2°C até o 20.º minuto. Não houve diferença significativa da cinética entre os desafios (gráfico 5).

#### CINÉTICA DA VELOCIDADE DA REAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR HISTAMINA E POR AEROALÉRGENO

Nos primeiros três minutos após a puntura, a velocidade da intensidade do eritema foi significativamente maior que a velocidade da pápula e da temperatura ( $p=0,05$ ;  $p=0,016$ , respectivamente). Já entre o 5.º e o 10.º minuto a velocidade da pápula foi estatisticamente maior que a do tamanho do eritema ( $p=0,05$ ). Nos últimos cinco minutos houve uma queda significativa da velocidade do tamanho do eritema em relação à sua intensidade.

A cinética das reações cutâneas induzidas pela histamina e pelo *D. pteronyssinus* foi similar, porém com diferença na velocidade das suas variáveis em determinados tempos de análise.

A velocidade máxima na formação da pápula por histamina foi atingida nos primeiros cinco minutos ( $3,80\pm 0,73$ ), com maior rapidez da temperatura no 3.º minuto, enquanto naquela induzida pelo aeroalérgeno ocorreu entre o 5.º e o 10.º minuto ( $2,42\pm 0,37$ ), com velocidade máxima da temperatura no 15.º minuto.

A temperatura correlacionou-se significativamente em todos os pontos de análise com o tamanho da pápula (gráficos 6 e 7).

## DISCUSSÃO

A combinação de termometria cutânea e de fotografia digital mede a cinética do desenvolvimento da reação cutânea induzida por puntura, independentemente do sexo, do desafio e do fototipo do indivíduo. Esses são meios objetivos que incorporam novas variáveis a serem avaliadas nos testes cutâneos e no diagnóstico das doenças alérgicas mediadas por IgE.

Os resultados do estudo mostram ser possível avaliação objetiva, dinâmica e fisiológica da reação induzida por puntura, com base em parâmetros como a resposta neural, a vasodilatação e a permeabilidade vascular, os quais podem ser estudados isoladamente sob a influência de anti-histamínicos, antileucotrienos, bloqueadores de canais de cálcio, entre outros. Também permitem entender variações individuais, tais como a ausência de eritema na presença de pápula e vice-versa.

Estes resultados baseiam-se em conclusões obtidas de maneira independente. Outros dados consagrados na história da reação mediada por IgE confirmam as observações deste estudo.<sup>2</sup> Este parece ser o primeiro estudo realizado com seres humanos, *in vivo*, usando técnica não invasiva que deriva parâmetros inflamatórios para inclusão de variáveis determinantes da reação cutânea.

A análise dos dados mostra diferenças significativas entre alguns parâmetros ajustados para unidade única, forma essa com que se afastou a possibilidade de que tais diferenças se devessem apenas ao acaso. A presença da reação cutânea à histamina e ao extrato de *D. pteronyssinus*, com ausência de diferença de cinética entre esses indutores, confirmou a inexistência de problemas com a coleta da amostra.

O aumento mais precoce da intensidade e do tamanho do eritema sugere que esses eventos são mediados pelo reflexo neural, que é o mais rápido após o início do desafio. Após esse reflexo, sabe-se que há aumento da permeabilidade vascular, evidenciado pela progressão seqüencial do tamanho da pápula. Ao mesmo tempo, como resultante do edema formado, há aumento da temperatura, que atinge um platô do limite da temperatura central.

Os achados aqui reportados são consistentes com os de outros estudos. Bagnato et al. correlacionaram o desenvolvimento da pápula com o aumento da temperatura local por imagem infravermelha;<sup>3</sup> nesse estudo, entretanto, nada havia sobre o tamanho ou a intensidade do eritema.

Estudo feito com *laser Doppler flowmetry* verificou um rápido aumento do fluxo sanguíneo tanto no eritema como na pápula; aumento esse maior no eritema entre 6,5 a 13 minutos após a puntura. O aumento do fluxo no local do aeroalérgeno só foi observado após 2,5 minutos<sup>4</sup>. Embora esses dados apresentem alguma semelhança com os obtidos no presente estudo, não foram caracterizados nessas investigações os aspectos da intensidade e do tamanho da reação.

A fotografia digital como recurso para análise mais objetiva de lesões cutâneas tem sido objeto de vários estudos,<sup>5,6,7</sup> porém um único foi realizado para avaliação da reação cutânea.<sup>8</sup> Usando nove cães, nos quais a reação foi induzida intradermicamente com histamina, a pesquisa demonstrou que o eritema é mais bem avaliado por fotografia do que a olho nu ou cromametria.

Algumas questões devem ainda ser consideradas neste relato.

O objetivo inicial desta pesquisa – de fazer estudo comparativo da termometria cutânea e da fotografia digital como recursos de análise objetiva da reação cutânea – mostrou-se impossível de realizar, por ser a termometria mais susceptível às interferências do meio.

Outro ponto refere-se à interpretação dos dados, que se baseou em dogmas aceitos na literatura e não confirmados direta ou indiretamente.

Aspecto importante também a ser relevado foi o custo tecnológico. A câmera para captação de imagem infravermelha e o *software* para determinação da temperatura usados neste estudo custam bem mais do que o material similar encontrado no mercado. Entretanto, a máquina fotográfica digital e sua tecnologia apresentam baixo custo relativo e encontram-se popularizadas mesmo em regiões de menor poder aquisitivo do País e no exterior.

Diferente dos estudos encontrados na literatura, este enfatiza o valor da inclusão de variáveis outras na determinação do resultado do teste cutâneo, como a intensidade do eritema. Além disso, apresenta técnica que permite melhor documentação da reação e facilita o estudo de novos extratos antigênicos e drogas. Assim, este trabalho pretendeu demonstrar que é possível avaliar a cinética da reação pela velocidade de desenvolvimento e comparar as variáveis reduzindo-as a uma unidade única.

Independentemente da necessidade de mais estudos para a compreensão destes achados na prática clínica, é importante destacar que eles confirmam e dão acesso, de maneira objetiva, a dados ainda não considerados na avaliação do teste cutâneo.

Estudos com o uso de anti-histamínicos estão sendo iniciados com o intuito de avaliar essas variáveis em indivíduos sintomáticos ou não a um determinado antígeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PLYTYCZ, B.; SELJELID, R. From inflammation to sickness: historical perspective. **Arch Immunol Ther Exp**, v.51, n.2, p.105-109, 2003.
2. SERAFIN, W. E.; AUSREN, K. F. Current concepts: mediation of immediate hypersensitivity reactions. **N Engl J Med**, v.317, p.30, 1987.
3. BAGNATO, G. F.; GULLI, S.; DENUZZO, G.; DI CESARE, E.; SANSOTTA, C.; D'AMBROSIO, F. P.; VERMIGLIO, G. Measurement of allergen-induced skin reactions by computerized dynamic telethermography (CDTT). **J Investig Allergol Clin Immunol**, v.7, n.4, p.238-241, 1997.
4. 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**, v.82, n.2, p.291-296, 1988.
5. FLEMING, M. G. Digital dermoscopy. **Dermatol Clin**, v.19, n.2, p.359-367, 2001.
6. CASCINELLI, N.; FERRARIO, M.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; GALIMBERTI, V.; MASCHERONI, L.; BARTOLI, C.; CLEMENTE, C. Results obtained by using a computerized image analysis system designed as an aid to diagnosis of cutaneous melanoma. **Melanoma Res**, v.2, n.3, p.163-170, 1992.
7. JAMORA, M. J.; WAINWRIGHT, B. D.; MEEHAN, S. A.; BYSTRYN, J. C. Improved identification of potentially dangerous pigmented skin lesions by computerized image analysis. **Arch Dermatol**, v.139, n.2, p.195-198, 2003.
8. BOYSEN, L.; SORENSEN, P.; LARSEN, M.; SERUP, J.; KRISTENSEN, F. Evaluation of skin erythema bu use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. **Am J Vet Res**, v.63, n.4, p.565-569, 2002.

GRÁFICO 1

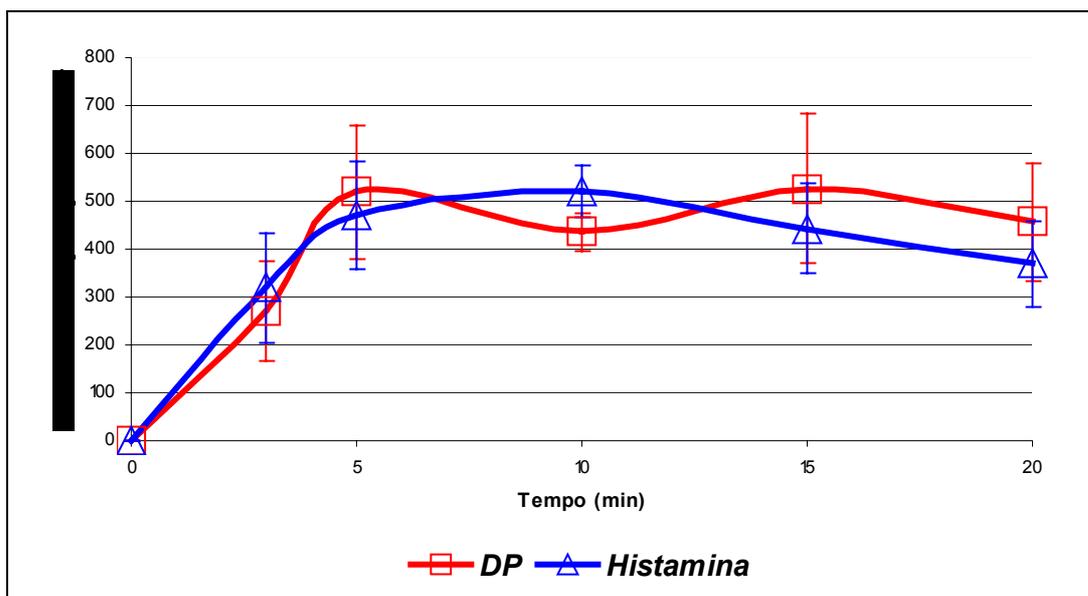


GRÁFICO 2

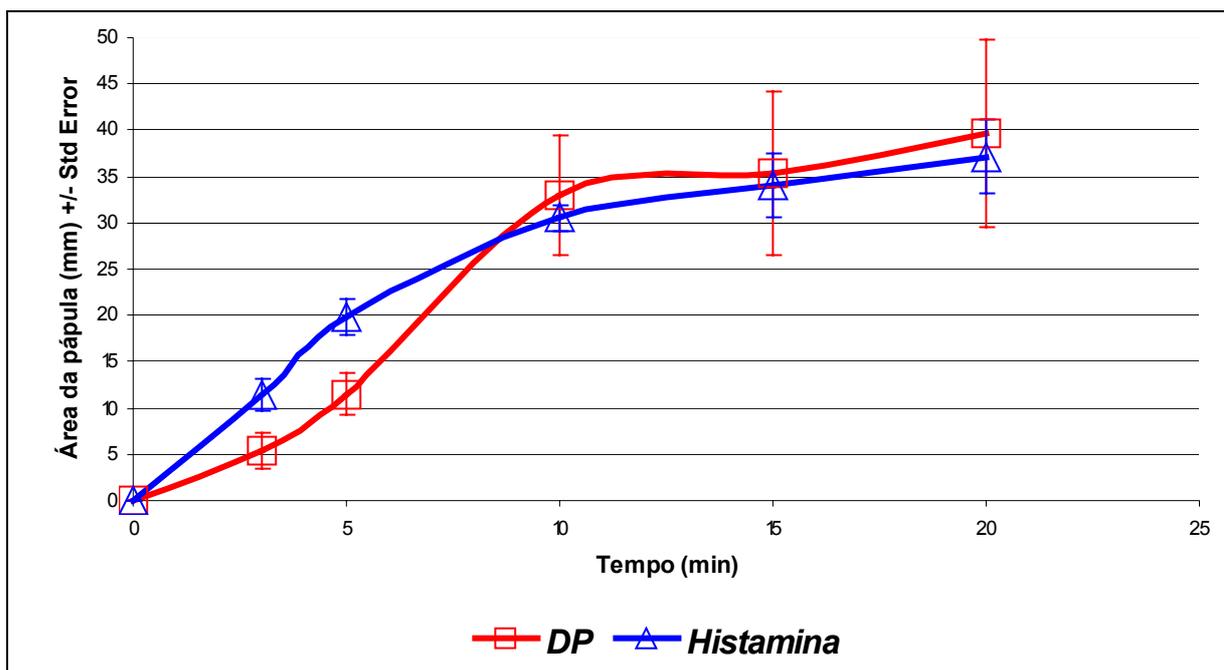


GRÁFICO 3

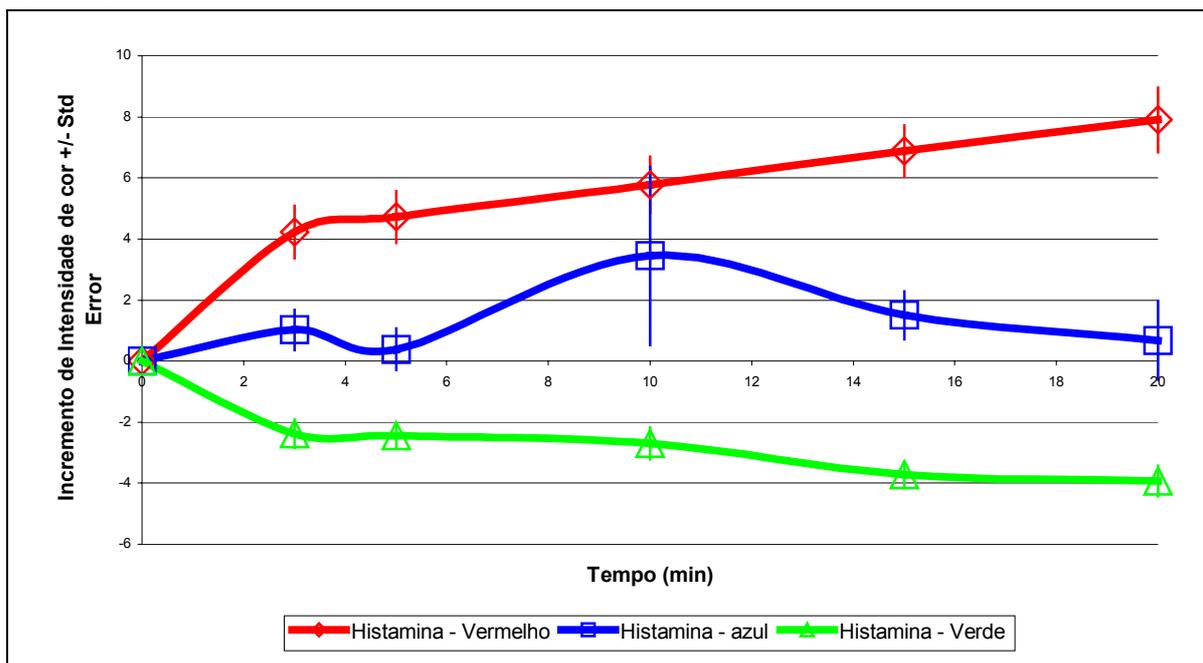


GRÁFICO 4

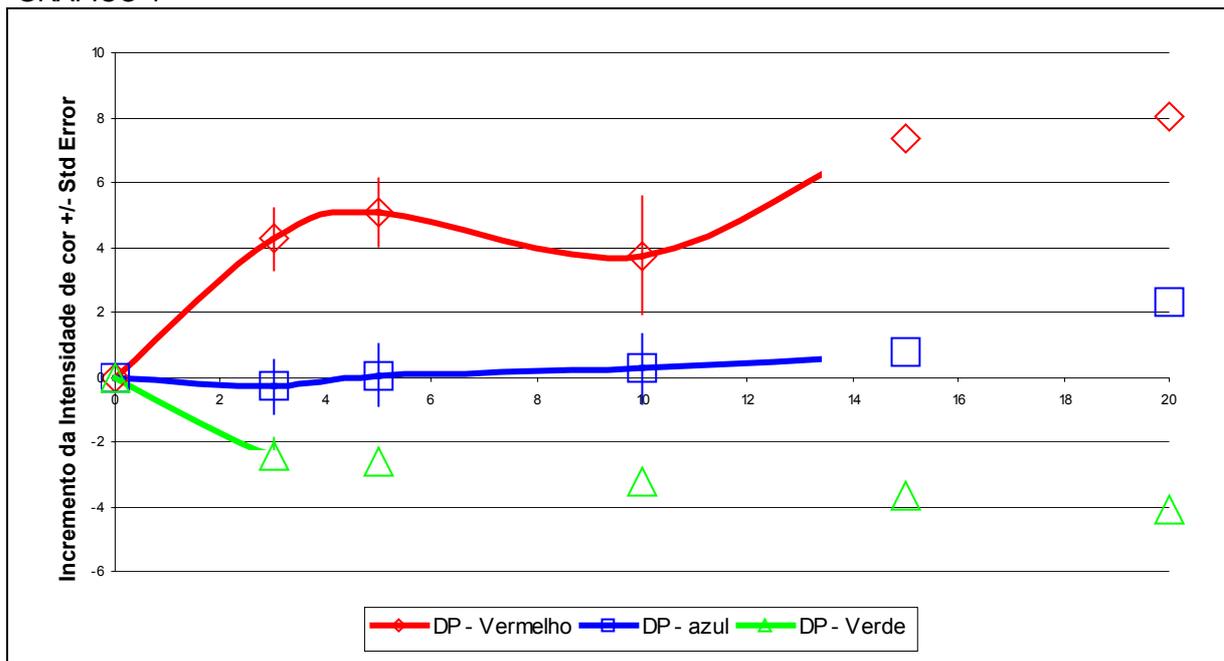


GRÁFICO 5

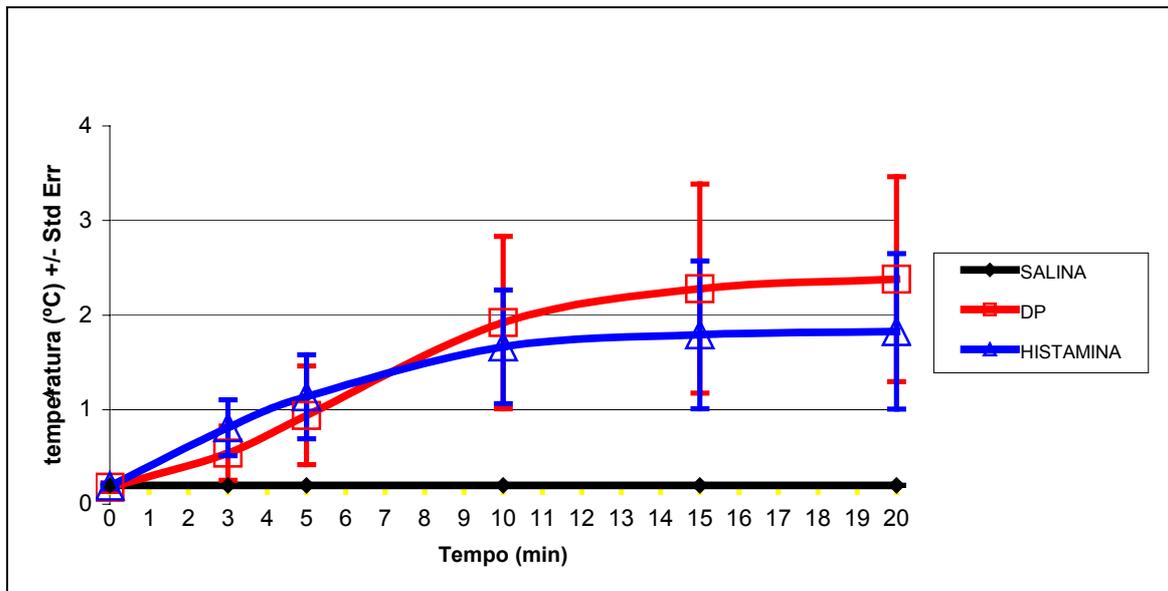


GRÁFICO 6

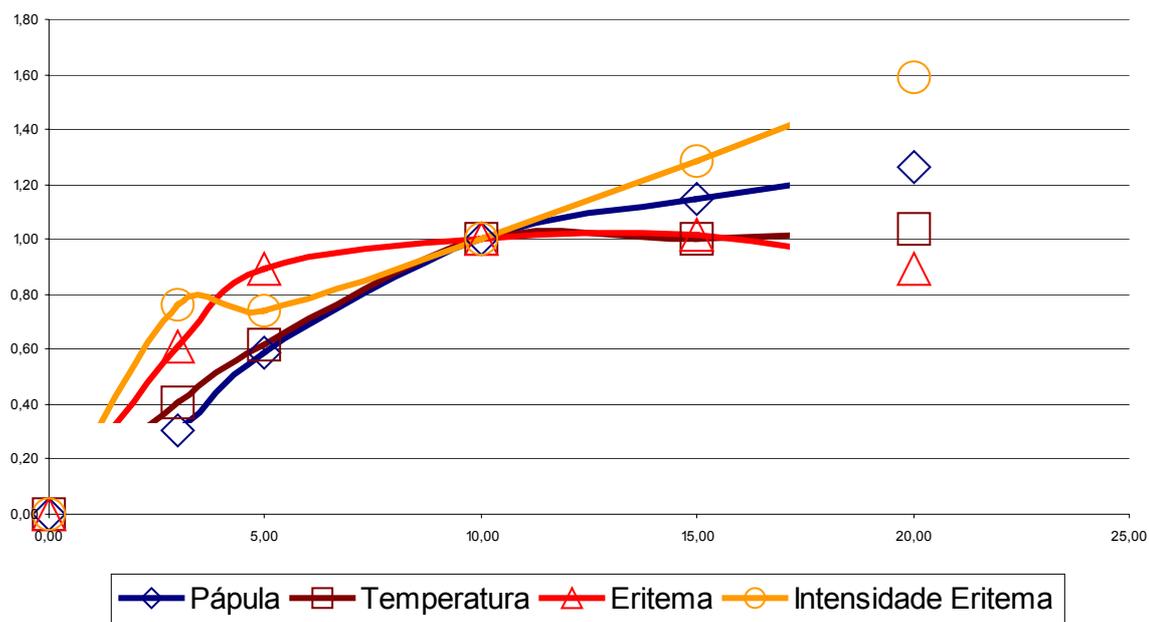
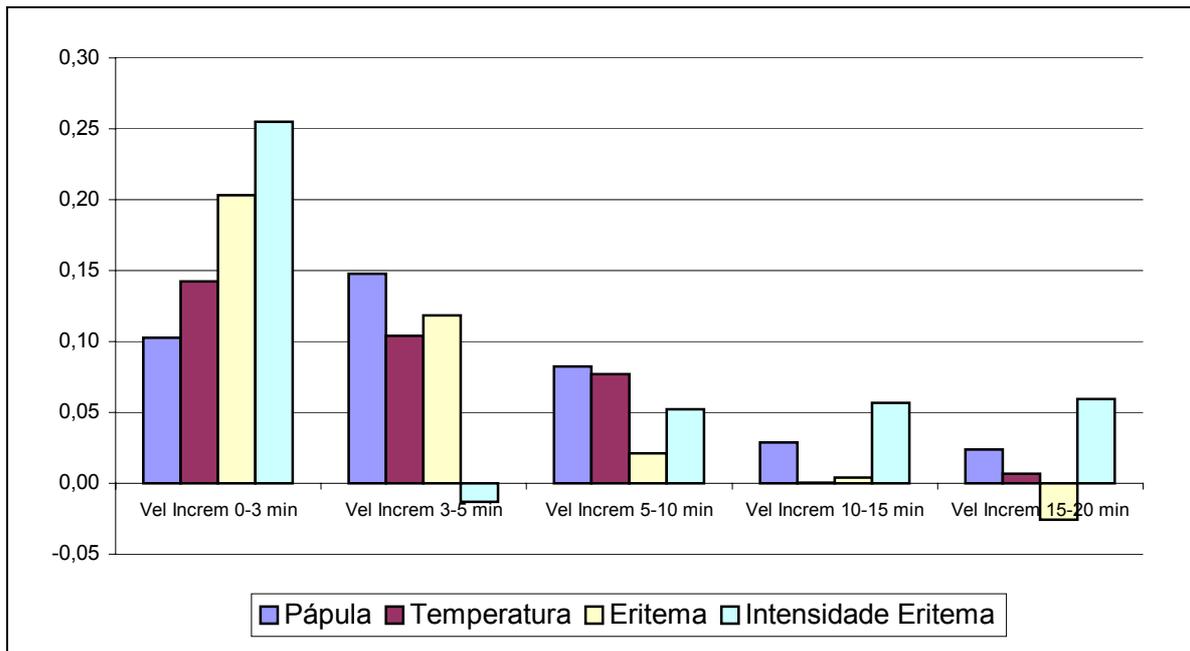


GRÁFICO 7



## LEGENDAS

GRÁFICO 1 - CINÉTICA DO TAMANHO DO ERITEMA POR FOTOGRAFIA DIGITAL

GRÁFICO 2 - CINÉTICA DAS PÁPULAS PELA FOTOGRAFIA DIGITAL EM MM<sup>2</sup>

GRÁFICO 3 - CINÉTICA DA INTENSIDADE DO ERITEMA INDUZIDO POR HISTAMINA

GRÁFICO 4 - CINÉTICA DA INTENSIDADE DO ERITEMA INDUZIDO POR EXTRATO DE *Dermatophagoides pteronyssinus*

GRÁFICO 5 - CINÉTICA DA TEMPERATURA CUTÂNEA NO LOCAL DO TESTE

GRÁFICO 6 - CINÉTICA, DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS, PELA FOTOGRAFIA DIGITAL E TERMOMETRIA CUTÂNEA

GRÁFICO 7 - VELOCIDADE DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS POR FOTOGRAFIA DIGITAL E TERMOMETRIA CUTÂNEA EM MINUTOS

## CONCLUSÃO

A fotografia digital e a termometria cutânea enfatizam o valor da introdução de novos métodos de avaliação da reação cutânea.

Os métodos propostos neste estudo validaram novos parâmetros para análise do teste cutâneo por puntura e acrescentaram precisão e mais objetividade aos parâmetros tradicionais.

A composição dos dados tornou possível a mensuração da reação tríplice de Lewis pela intensidade e cinética de desenvolvimento; além disso, adicionou variáveis que podem ser medidas em conjunto sob outras condições experimentais.

Estudos para determinar novos avanços ensejados por esses métodos estão em andamento, principalmente no que toca à avaliação de extratos alergênicos e fármacos e suas possíveis implicações na análise comparativa de novas drogas e em outros testes cutâneos que possam ser analisados visual e/ou iconograficamente.

**ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À DISSERTAÇÃO**

# Objective evaluation of skin prick test reactions using digital photography

Rosaly Vieira dos Santos<sup>1</sup>, Richard G. Titus<sup>2</sup> and Hermênio Cavalcante Lima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Immunodermatology and Clinical Immunology Research Center at Federal University of Paraná, Paraná, Brazil, <sup>2</sup>Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, and <sup>3</sup>Medical Pathology Department, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil

**Background:** The skin prick test has been used worldwide to determine IgE-mediated hypersensitivity. However, the most current method to record this reaction has problems with accuracy and precision.

**Objective:** To demonstrate a new approach to measure the skin prick reaction and its kinetics with precision.

**Methods:** The skin prick test was induced using histamine or *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen in 80 volunteers aged 4 and 67 years who had different skin colors. Digital photographs were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min. The mean wheal and erythema area as well as the erythema intensity were determined using Adobe Photoshop<sup>®</sup> software. The accuracy and precision of this approach were also evaluated.

**Results:** The digital photographic analysis measured the wheal and erythema sizes independent of the anti-

gen or skin color with precision. In addition, a new variable of this test, the skin erythema intensity, could be determined objectively using the chromaticity of reflected light.

**Conclusions:** Digital photographic analysis is a precise and objective method to evaluate the skin prick test reaction, which can be used independent of the patient's skin color in clinical or research settings.

**Key words:** skin prick test – color – computer-assisted – image processing – digital photography

© Blackwell Munksgaard, 2007

Accepted for publication 3 January 2006

THE SKIN prick test can identify patients who have immediate hypersensitivity to a determined antigen based on the presence of specific IgE antibody on mast cells and histamine release. It is usually performed on the volar surface of the forearm after allergen and/or histamine challenge. Moreover, the technical aspects of this test are simple and can be easily learned by health workers (1).

In the majority of clinical settings, the wheal and erythema sizes are measured with a transparent ruler to determine the longest diameter and the average of the mid-point orthogonal diameter (2). Another system of determination of those parameters is based on a '+' signal when the antigen wheal or erythema is compared with that obtained with histamine (3). Unfortunately, these measurement methods have several limitations. Among these are their reproducibility, the difficulty in determining the size of irregular wheals and the fact that results are often based on wheal size only. The latter may be because of

the difficulty in analyzing erythema size or its intensity on dark skin. Moreover, there is some subjectivity in all of these procedures.

Therefore, a more accurate method for assessing the skin prick test is needed for both clinical as well as research settings. This new technique should be simple, objective, quantitative and reproducible so as to measure accurately allergen sensitivity and the success of immunotherapy or pharmacotherapy (4, 5). The procedure should also be easily transferable to medical/research centers worldwide.

The aims of this study were to describe a new objective method for measuring the skin prick test with all skin phototypes, and to determine its accuracy and reproducibility.

## Methods

### Study design

This research was performed as an experimental and descriptive study of the skin prick test

kinetics based on digital photograph. The study protocol was approved by the local Research Ethics Committee, and all volunteers or parents gave their signed informed consent. This report was designed to determine the accuracy and reproducibility of the digital photographic system when compared with other evaluation procedures for a wheal and erythema response.

### Subjects

Eighty volunteers, 31 men and 49 women, aged 4–67 years, were randomly selected among patients and staff members over an 8-month period in the University Hospital, Curitiba, Brazil. The subjects had not taken antihistamines, mast cell stabilizers, corticosteroids or other drugs that might interfere with the procedure in the last 10 days. None of them were in an immunotherapy program or had dermatological disease in the tested area. All of them had their phototype determined by the Fitzpatrick classification system before the tests were performed (6).

### Skin prick tests

For all skin prick tests, a drop of histamine (10 mg/mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brazil), *Dermaphagoides pteromyssinus* extract (112,900 UBE/mL, IPI-ASAC) or saline solution (IPI-ASAC) was applied at different points on the anterior portion of the left forearm. The skin was then punctured using a 26-gauge needle.

A self-adhesive white circle of a known size was placed next to the test area for dimension reference. Markers with red, green, blue and black colors were positioned nearby for color reference.

### Digital photography

An Olympus 650C LCD camera was held fixed at 400 mm from the subject's forearm. The pictures of the test areas contained  $1280 \times 1024$  effective picture elements (pixels) of resolution, and were taken in a closed room, with illumination provided by two photoflood lamps (BCA no 1 115–120 V – General Electric Co., Schenectady, NY, USA) positioned on each side of the subject's forearm. Photographs were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min after the test was initiated, and these were transferred to a computer for analysis using Adobe Photoshop® 6.0 software.

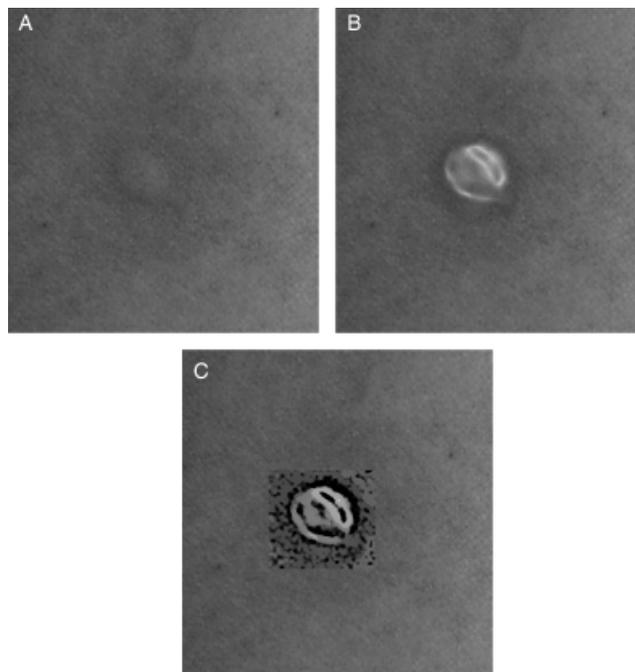


Fig. 1. Wheal size delimitation by digital photography analysis. (A) Wheal induced by histamine at 10 min. (B) After the first filter from Adobe Photoshop®. (C) After the second filter from Adobe Photoshop®.

### Wheal area by digital photography

The wheal area was selected and ascertained using two Adobe Photoshop® filters: a plastic wrap and poster edges (Fig. 1). The number of pixels inside the selected area and the reference circle were determined. The wheal area in  $\text{mm}^2$  was established by a simple mathematical correlation between the two areas. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error.

### Erythema area by digital photography

The region of the erythema reaction was selected. The colors and luminosity levels of this area were adjusted to accent the reaction (Fig. 2). The erythematous area was selected and the pixels were quantified. The area in  $\text{mm}^2$  was assessed as described above for wheal size, and the results were expressed as mean  $\pm$  standard error.

### Erythema intensity by digital photography

The Adobe Photoshop® software can also measure the chromaticity and the luminosity of reflected light. Therefore, we measured the chromaticity and intensity of light reflected from the skin in the tested area compared with an adjacent untested area. The erythema intensity analysis was based on the RGB (Red, Green, and Blue) model. Briefly, the red, blue and green

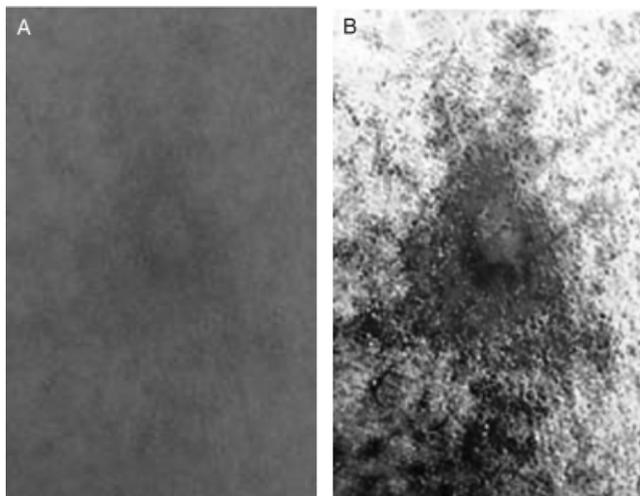


Fig. 2. Erythema digital enhancement by digital image transformation for size determination. (A) An erythema induced by histamine at 10 min. (B) Erythema after color adjustments using Adobe Photoshop®.

colors were converted into an intensity scale ranging from 0 to 255. The mean brightness values of the RGB channels were obtained for the tested area compared with an adjacent non-tested area of the same size. For each determined parameter, control values were subtracted from the histogram median of the tested area. The color intensity differences were expressed as the mean  $\pm$  standard error.

#### Accuracy and precision tests

The digital photography method was compared with other reading systems. For one comparison, a transparent ruler was used to measure the longest and the mid-point orthogonal diameter. The mean diameter ( $(D_1+D_2)/2$ ) was calculated. For another comparison, known as planimetry, a transparent adhesive tape was placed on the patient's arm and the borders of the wheal and flare were drawn. The wheal and erythema drawing was placed on a white record sheet with a circle of a known area. The drawing was digitized using an image scanner and the drawing areas were determined using the methods described above to measure the wheal area by digital photography. These methods were used at the time of digital photography and at the same time points, and were expressed as mean  $\pm$  standard error.

We also evaluated within-observer and between-observer reproducibility. To accomplish this task, 36 digital pictures were analyzed by a single observer or by seven observers on two

separate occasions. All observers were blinded regarding the picture identification and measurement results throughout the analysis.

#### Statistics

All results were expressed in graphs as the mean standard error of the mean (SEM). We used the  $\chi^2$ -test to examine the distribution of a categorical response variable as conditioned by the values of another categorical variable. The kinetics of the response were compared by ANOVA for repeated measurements. We compared means using Student's *t*-tests. To compare the different methods, correlation was applied. ROC curve and  $\kappa$  were also used to study the accuracy of this new method. The results of intra- and inter-observers were determined by the coefficient of variation (CV). All statistical analyses were performed using the JMP 5.0 (SAS Institute, USA) statistical program. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant for all analyses.

## Results

#### Population characteristics

The skin prick test was performed on eighty volunteers, 49 (61.2%) of whom were females. The mean age was 25.2 years  $\pm$  13.4. Thirty-five of them presented with a positive skin reaction for *D. pteronyssinus*. Fifty-eight of 80 volunteers were classified as phototype II or III and 22 of them as phototype IV or V. Considering the fact that the distribution of positive results among the different skin phototypes might interfere with the analysis, we performed a  $\chi^2$  statistical analysis to determine whether they were independent variables. This analysis did not demonstrate a difference between the *D. pteronyssinus* and histamine results and skin phototype, which means that the test positivity and skin phototype were independent variables.

#### Wheal and erythema areas

The development of the mean wheal area induced by histamine and *D. pteronyssinus* was obtained at each timepoint, which revealed a progressive increase in this parameter over time. The mean peak size occurred at 20 min ( $37.11 \pm 4.0 \text{ mm}^2$ ) when induced by histamine and at 20 min by *D. pteronyssinus* ( $39.61 \pm 10.17 \text{ mm}^2$ ). There was no statistically significant difference between their kinetics ( $P = 0.81$ ) (Fig. 3).

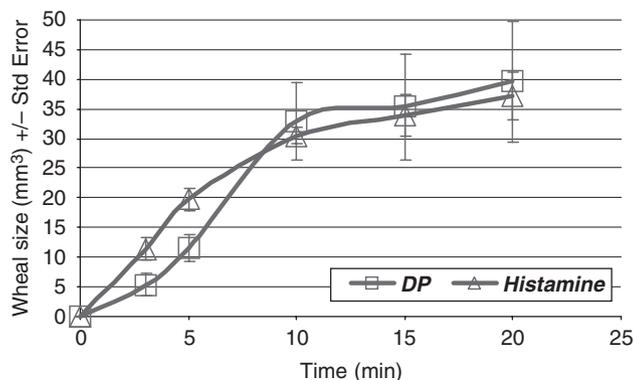


Fig. 3. Wheal kinetic by digital photography analysis. The lines indicate the wheal area of the histamine (triangle), and *Dermatophagoides pteronyssinus* (square) determined by digital photography analysis. The area ( $\text{mm}^2$ ) was evaluated at several points until 20 min after antigen or histamine challenge. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of all volunteers.

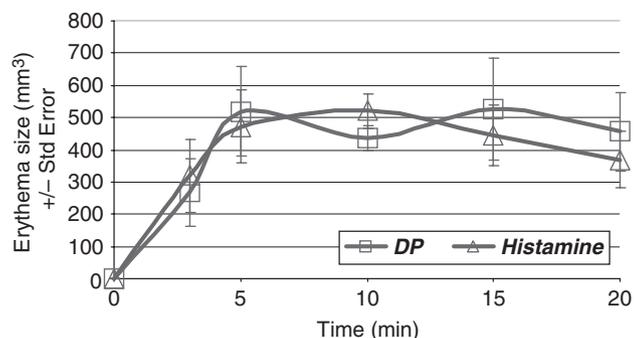


Fig. 4. Erythema size kinetic by digital photography analysis. The erythema area was determined after digital picture color adjustment by Adobe Photoshop<sup>®</sup> over time. The results are reported as the mean in  $\text{mm}^2 \pm$  S.E.M. The histamine (triangle) erythema was compared with *Dermatophagoides pteronyssinus*.

The erythema size reached a plateau at 5 min and maintained this plateau ( $500 \text{ mm}^2$ ) through 15 min. These results were observed in patients of all phototypes. There was no difference between erythema kinetics induced by histamine or *D. pteronyssinus* extract ( $P = 0.60$ ) (Fig. 4).

#### Erythema intensity

The kinetics of the development of erythema intensity in response to histamine or *D. pteronyssinus* challenge was similar in all patients, independent of skin phototype. Therefore, the data were grouped, and the mean for all points was determined and analyzed. The red color varied significantly during the time of observation when compared with normal skin. The red intensity at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min was  $0, 4.25 \pm 0.96, 5.10 \pm 1.04, 3.75 \pm 1.80, 7.35 \pm 0.85$  and  $8.05 \pm 0.69$ , respectively. The intensity of this color was

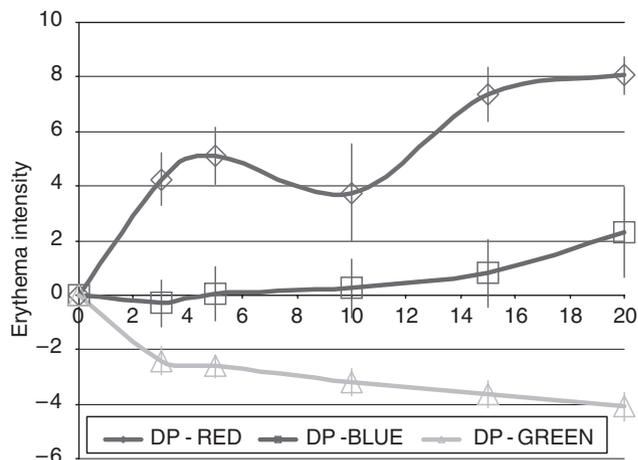


Fig. 5. Erythema intensity kinetic induced by histamine by digital photography analysis. The red, blue and green color intensities from normal and histamine challenged skin were determined by Adobe Photoshop<sup>®</sup> over time. The results are reported as the mean difference between the areas for each basic color  $\pm$  SEM.

statistically higher in the prick test area at 5, 10, 15 and 20 min than in the control area ( $P < 0.001$ ). The green color intensity was reduced at 3, 5, 10, 15 and 20 min ( $P < 0.001$ ). The blue intensity was the only basic color that did not change with time ( $P = 0.67$ ) (Fig. 5). There was no statistically significant difference between *D. pteronyssinus* and histamine erythema intensity ( $P = 0.723$ ).

#### Accuracy test

When the three approaches (digital photography, ruler and adhesive tape methods) were compared, they gave similar results regarding wheal size. Moreover, the degree of agreement among the three methods was greater when the wheal size was larger. The kinetics for wheal size development was also similar among the tested methods. Using digital photography, wheal size reached a plateau at 20 min after challenge and this plateau was reached with the other methods by 15 min post-challenge. There was a correlation between the digital photography, ruler and tape adhesive methods at 10 min post-challenge ( $P < 0.0001$ ;  $r^2$  adjust = 0.54;  $r^2$  adjust = 0.71, respectively).

When this same analysis was applied to the development of erythema, there was only a weak association among the different methods.

The ruler method is the most widely used and accepted technique for measuring skin prick test results and is considered positive if the mean diameter of the wheal is 3 mm or greater. An ROC analysis revealed that a wheal size of  $12.48 \text{ mm}^2$  was considered positive for skin prick reactions

analyzed by digital photography ( $P = 0.05$ ;  $1 - \alpha = 0.95$ ), which was higher than the one based on circle area ( $\pi \times r^2$ ), which was estimated as  $7.08 \text{ mm}^2$ . The value of  $\kappa$  for these numbers was  $0.82 \pm 0.03$  (SE). Given an area of  $12.48 \text{ mm}^2$ , the sensitivity of a positive prick test detected by digital photography was 87.2% and 100% specific.

#### *Reproducibility test*

To determine the reproducibility of the wheal and erythema sizes determined by digital photography, precision profiles based on the CV for 36 pictures at different times and from different phototypes were determined. The intraobserver variability was established by two measurements from the same operator one week apart. Seven different operators determined the interobserver variability on two different occasions.

The mean interobserver CV was 5.95% (median = 1.87% CI 4.58–9.13) for wheal size. The mean intraobserver CV was 0.53% (median = 0.15% CI 0.71–1.39) for the same parameter. For erythema size, the mean interobserver CV was 7.58% (median = 3.52% CI 5.95–11.72), and the mean intraobserver CV was 3.69% (median = 3.99% CI 0.31–7.69).

## Discussion

No standardized system exists for recording and interpreting skin prick tests, although various methods and devices have been developed. Moreover, most of these methods for skin prick test evaluation are not practical for use in a busy clinical practice (1). In this study, we present an objective, precise and practical method for skin prick test analysis by digital photography, which can be used in any modern office or laboratory setting for patients with any skin color.

The majority of the methods for skin prick test analysis are based on the wheal size after antigen extract challenge. The most common procedure for recording the reaction is the ruler method (2). However, its precision varies considerably between centers, and this variability may be because the wheal reaction is frequently irregular in shape and thus the diameter of the reaction is not an accurate reflection of the size of the response. As a result, for example, in most centers involved in trials in Europe, the coefficient of variation was between 15% and 30% using the wheal size

diameter (7, 8). Other methods have been examined in an attempt to increase the reproducibility and precision of skin prick test evaluation, but these methods are frequently too technically demanding to be used in routine practice (9–14). Therefore, a simple and precise method for skin prick test evaluation is still needed. Such a method may allow different research centers and physicians to compare their results.

To this end, we developed a method to evaluate skin prick tests by digital photography. In our study, the wheal areas were determined by digital image analysis, which eliminates the variability that is inherent in any method that requires a human component in the data-collection phase. We investigated the precision of this method by inter- and intraobserver variation, and the accuracy by comparing this new method with two other methods. By digital photography, the intraobserver and interobserver CV for wheal areas were 0.53% and 5.95%, respectively. The digital photography method was equivalent or superior to the other two methods and was clearly the most objective of the three approaches. Moreover, while the most widely accepted threshold for a positive wheal reaction measured by conventional techniques is  $3 \text{ mm}^2$  or greater, the increased sensitivity of the digital photography method had an enhanced threshold of  $12.49 \text{ mm}^2$  (2).

While the erythema associated with the skin prick reaction has been considered as another parameter of the response that could be measured, it has not been extensively used because of the difficulty of assessing it in dark-skinned individuals. However, using sensitive color digital cameras, it is possible to measure this erythema response accurately, even in dark-skinned people. Therefore, it is perhaps not too surprising that the results obtained using digital photography were different from those obtained using the ruler or adhesive tape method, probably because of the difficulty and subjectivity in measuring erythema by eye, especially on dark-skinned individuals.

Erythema intensity has never been assessed before in skin prick reactions and represents a new inflammatory parameter of the reaction. By measuring the combination of the RGB intensities, we were able to observe the development of the flare reaction intensity over time. Our findings are consistent with those of Setaro and Sparavigna (15) for other dermatological conditions. They found a significant reduction in the

green color channel and an increase in red color values. Moreover, Boysen et al. (16) evaluated skin erythema by digital photography in dogs. Comparable with our data, these authors were able to differentiate various degrees of erythema by digital photography that was not possible by visual observation or chromametry.

One possible limitation of this digital photographic system is the need for special lighting sources. However, simpler lighting sources may also be sufficient, especially when this is combined with the use of different filters and other processing techniques. Moreover, the digital photographs used in this study were of 1280 × 1024 pixels. It is possible that higher resolution photographs may obviate any limitation of this digital photographic approach.

Finally, this process has other advantages. Digital photography produces legal documentation of the skin reaction and allows access to these records at a variety of different locations. It also allows for the seamless integration of all patient images (e.g. radiographic, pathologic) into the medical record. The images can be either printed or stored in image databases.

In summary, we demonstrate an objective, precise and simple method for analyzing skin prick tests by digital photography. This method is appropriate for routine use or for research trials, which require high-quality and consistent results. In addition, this method allows us to determine the kinetics of the wheal and erythema size even in volunteers with a type IV or V skin phototype. Moreover, a new parameter, erythema intensity, can be studied. Compared with other methods for assessing the skin prick reaction, this procedure is more objective and is able to capture all manifestations of the skin prick reaction simultaneously.

## References

- 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: 117–125.
- Aas K. Clinical and experimental aspects of standardization and purification of allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975; 49: 44–54.
- Doan T, Zeiss CR. Skin testing in allergy. *Allergy Proc* 1993; 14: 110–111.
- Malling HJ. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. *Allergy* 1985; 40: 400–404.
- Olson R, Karpink MH, Shelanski S, Atkins PC, Zweiman B. Skin reactivity to codeine and histamine during prolonged corticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 153–159.
- Pathak M, Nghiem P, Fitzpatrick T. Acute and chronic effects of the sun. In: Freedberg I, Eisen A, Wolff K, Austen K, Goldsmith L, Katz S, et al: eds. *Dermatology in general medicine*, 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 1598–1607.
- Björkstén F, Haahtela T, Backman A, Suoniemi I. Assay of the biologic activity of allergen skin test preparations. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 324–331.
- Dreborg S, Belin L, Eriksson NE et al. Results of biological standardization with standardized allergen preparations. *Allergy* 1987; 42: 109–116.
- Poulsen LK, Liisberg C, Bindslev 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: 61–68.
- Poulsen LK, Bindslev Jensen C, Rihoux JP. Quantitative determination of skin reactivity by two semiautomatic devices for skin prick test area measurements. *Agents Actions* 1994; 41: C134–C135.
- Pijnenborg H, Nilsson L, Dreborg S. Estimation of skin prick test reactions with a scanning program. *Allergy* 1996; 51: 782–788.
- Serup J, Staberg B. Quantification of weal reactions with laser Doppler flowmetry. Comparative blood flow measurements of the oedematous centre and the perilesional flare of skin-prick histamine weals. *Allergy* 1985; 40: 233–237.
- 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: 291–296.
- Nyren M, Ollmar S, Nicander I, Emtestam L. An electrical impedance technique for assessment of wheals. *Allergy* 1996; 51: 923–926.
- Setaro M, Sparavigna A. Quantification of erythema using digital camera and computer-based colour image analysis: a multicentre study. *Skin Res Technol* 2002; 8 (2): 84–88.
- Boysen L, Larsen M, Serup J, Kristensen F. Evaluation of skin erythema by use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63: 565–569.

### Address:

*Prof. Dr Hermênio C. Lima*  
 Rua XV de Novembro  
 1206 Apto  
 2501 – Curitiba  
 PR 80060-000  
 Brazil

Tel: +55 41 3362 3526  
 Fax: +55 41 3322 1411  
 e-mail: hclima@ufpr.br

## Cinética da reação cutânea induzida por puntura através de fotografia digital e termometria cutânea

*Kinetic of skin prick test reaction using digital photography and skin infrared thermography.*

Rosaly Vieira dos Santos<sup>1</sup>, Hermênio C. Lima<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Demonstrar e comparar a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea *in vivo*: eritema, pápula e temperatura.

**Métodos:** Estudo experimental. Foi determinada a velocidade das variáveis da reação cutânea induzida por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus* na face anterior do antebraço de voluntários, aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. Uso de anti-histamínico foi critério de exclusão. O tamanho da pápula, e o tamanho e a intensidade do eritema foram determinados pela análise das imagens em fotografia digital. Filmou-se o local do teste cutâneo durante 20 minutos com câmera infravermelha de alta sensibilidade, em ambiente a 19°C, sem corrente de ar. Os dados foram analisados em *software* específico. Todos os dados foram transformados por um fator de unidade no 10º minuto de cada grandeza. Determinou-se em cada ponto a tangente da curva de intensidade unitária e dividiu-se cada resultado pelo tempo entre cada ponto específico. Resultados da velocidade foram expressos em unidade  $\pm$  erro padrão.

**Resultados:** Não houve diferença na cinética da reação entre os desafios. Nos primeiros três minutos a intensidade do eritema atingiu velocidade máxima, com diferença significativa em relação à pápula e à temperatura. A pápula obteve velocidade maior entre o 5º e o 10º minuto em relação ao eritema.

**Conclusões:** Termometria cutânea e fotografia digital são métodos objetivos de leitura do teste cutâneo por puntura; incorporam novas variáveis nos testes cutâneos e no diagnóstico de doenças alérgicas mediadas por IgE e determinam a cinética do desenvolvimento da reação cutânea refletindo a reação tríplice de Lewis.

*Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(3):87-93* termometria, teste cutâneo, puntura, histamina, *Dermatophagoides pteronyssinus*

### Abstract

**Objective:** To demonstrate the kinetic of skin prick test reaction *in vivo*: erythema, wheal, and temperature.

**Methods:** Histamine and *D. pteronyssinus* extract was used in volunteers. The camera was held at a fixed distance and digital photos of skin reaction were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min. The wheal, erythema size and the intensity of the erythema were determined by Adobe Photoshop 6.0®. The infrared camera was used to film for 20 min in the place of prick test. The data were analyzed by TermaCam® 2000 software. All the data obtained were transformed in the same unity. The tangent was determinate in each point and divided by time to obtain the speed of each parameter development. The velocity is shown in unity / min  $\pm$  standardized error.

**Results:** There was not difference of kinetic reaction of each inflammatory parameter observed induced by histamine or *D. pteronyssinus* extract. As overall, the erythema size and intensity developed first followed by the increase in the temperature and wheal. The erythema intensity and size presented the maximal velocity in the first 3 minutes. However, the wheal and temperature obtained the maximal between 5 and 10 minutes.

**Conclusions:** The skin infrared thermometry and digital photography are objective methods to evaluate the skin prick test. They are able to determine the kinetic of this reaction induced by antigen or histamine representing graphically the Lewis' triple reaction. It was created the new parameter of skin reaction that may be important in future studies.

*Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(3):87-93* termography, skin test, prick test, histamine, *Dermatophagoides pteronyssinus*

1. Médica Alergista, Mestre e Doutoranda em Ciências Médicas pela Universidade Federal do Paraná;
2. Médico Alergista, Imunologista Clínico e Dermatologista, Professor Adjunto do Departamento de Patologia Médica, Chefe da Disciplina de Imunologia Clínica da Universidade Federal do Paraná, Coordenador do Núcleo de Pesquisas em Imunodermatologia e Imunologia Clínica da UFPR.

Artigo submetido em 06.02.2007, aceito em 24.04.2007.

### Introdução

Os sinais inflamatórios caracterizam-se por dor, rubor, calor e tumor, já descritos por Celsius no primeiro século da era cristã. Na metade do século XIX, Virchow adicionou "perda de função" aos sinais da inflamação<sup>1</sup>.

A reação cutânea induzida pelo teste de puntura apresenta características de inflamação. Observa-se inicialmente a reatividade vascular (eritema) após a introdução de histamina ou antígeno na pele, seguida de vasodilatação reflexa ao redor do local da inoculação, e da formação de

edema por extravasamento de líquido. Essa seqüência caracteriza a reação tríplice de Lewis, que no final do processo, resulta no aumento da temperatura e do edema local (pápula), no eritema reflexo ao redor da pápula e no prurido. Tudo isso, em conjunto, forma os sinais cardinais da inflamação<sup>2</sup>.

Estudos sobre teste cutâneo geralmente não contemplam todas as variáveis nas análises da reação induzida. Embora o tamanho da pápula seja o principal indicador da intensidade da reação, variações individuais são observadas, entre as quais a presença de eritema sem pápula e vice-versa, cujo significado é pouco compreendido. Além disso, a temperatura é um parâmetro pouco estudado, talvez pela dificuldade técnica para realização de estudos precisos. Finalmente, a intensidade do prurido é dependente da subjetividade do paciente. A interpretação dessas características em um único desenvolvimento cinético não foi ainda evidenciada, embora a relação cinética entre elas já seja conhecida na reação tríplice de Lewis.

## Objetivo

Demonstrar e comparar a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea, induzida por puntura, relacionada entre si *in vivo*, pela análise de fotografia digital e termometria cutânea.

## Métodos

Estudo experimental, observacional, com coleta de dados da reação cutânea a partir da inoculação de um fármaco e de um antígeno.

Foi aprovado pelo comitê de Ética de pesquisas em seres humanos do hospital onde a pesquisa foi realizada.

Voluntários que durante sete dias antes não tinham feito uso de anti-histamínico ou de outras drogas que pudessem alterar o tamanho da pápula foram selecionados para realização do teste cutâneo: 32 por fotografia digital e outros 15 por termometria cutânea; estes não haviam praticado nenhum tipo de esporte nas quatro horas imediatamente anteriores ao teste.

As características clínicas de cada indivíduo foram determinadas após observação e questionamento pelo pesquisador principal. Consentimento pós-informado de todos os indivíduos ou de seus responsáveis foi obtido previamente ao teste.

### Testes e Fotografias

Em todos os testes, uma gota de histamina (10 mg/mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil), uma gota de solução salina e uma gota de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (112.900 UBE mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) foram aplicadas na face anterior do antebraço esquerdo dos voluntários, com distância mínima de 3 cm entre elas, introduzidas na epiderme por puntura com agulha 26-G em ângulo de 45° com a superfície da pele.

As fotografias (1040 X 1040 pixels) foram realizadas com câmera digital Olympus 650C, sempre à mesma distância entre a lente e a pele.

Usou-se um círculo como referência de área em local próximo ao teste. Fotografias digitais foram feitas aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos.

### Determinação da área da pápula

Para avaliação da pápula por fotografia digital, selecionou-se uma região ao redor do teste. O contorno da pápula foi determinado por filtros de transformação de imagem com auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0®. Estabeleceu-se uma correlação matemática comparando a quantidade de *pixels* da área da pápula com os da área conhecida. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Para avaliação da área do eritema por fotografia digital, recorreu-se à área previamente conhecida colocada perto do local do teste. As fotos armazenadas foram analisadas com auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0®. O local do eritema foi selecionado e nessa imagem foi feito o ajuste de níveis das cores básicas e da luminosidade. Uma área do eritema e todas as áreas similares foram selecionadas com *magic wand tool*, chegando-se ao histograma cuja quantidade de *pixels* foi comparada com a quantidade de *pixels* da área conhecida. Assim obtida a área de cada eritema nos diferentes pontos de análise, seus dados foram colocados no programa Excel, analisados estatisticamente e expressos em média  $\pm$  erro padrão.

### Determinação da intensidade do eritema

Considerou-se a área da reação induzida pela histamina e pelo extrato de *D. pteronyssinus* (Dp).

O espectro de intensidade do vermelho foi determinado pelo *software* e 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  $\pm$  erro padrão.

### Determinação da temperatura

Voluntários foram colocados no local do teste vinte minutos antes da sua realização. A filmagem na região do teste foi realizada durante vinte minutos em ambiente controlado, sem corrente de ar, em temperatura ambiente de 19°C, com câmera infravermelha de alta sensibilidade.

A gravação da imagem digital foi feita em 14 *bits* em tempo real. Os dados foram acumulados em *software* específico e a diferença da intensidade de temperatura em cada ponto foi determinada em relação aos valores basais usando o *software* TermaCam® 2000.

### Transformação por unidade e determinação da velocidade

Para comparar os achados com diferentes grandezas em relação ao tempo, todos os dados foram transformados por um fator de unidade no 10° minuto de cada grandeza. Dessa forma, a redução ou ampliação se deu na mesma proporção para todos os dados, e cada variável apresentava uma unidade no 10° minuto de avaliação. Os valores foram expressos em unidades  $\pm$  erro padrão x tempo (min).

Em cada ponto, determinou-se a velocidade traçando a tangente da curva de intensidade unitária. Cada resultado foi dividido pelo tempo entre cada ponto específico. Os resultados da velocidade foram expressos em unidade  $\pm$  erro padrão.

### Análise estatística

Para comparar a cinética evolutiva da área para cada estímulo, as análises foram realizadas com ANOVA para medidas repetidas.

Para análise das diferenças entre as velocidades usou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon, uma vez que os dados não apresentavam distribuição normal e resultavam de transformação.

Em todas as análises o valor de  $p < 0,05$  foi associado à significância estatística. Os dados foram analisados pelo *software* JMP (SAS Institute, USA).

## Resultados

### Casuística

Teste cutâneo por puntura foi analisado em 31 voluntários, 58% dos quais do sexo masculino. A média de idade foi de 29,3 anos. Nove voluntários apresentaram positividade ao *D. pteronyssinus*.

### Cinética da área do eritema

Não houve diferença significativa da área do eritema entre histamina e Dp ( $p = 0,61$ ). O tamanho máximo do eritema causado pela histamina ocorreu no 10° minuto (440,2 mm<sup>2</sup>), e pelo Dp no 15° minuto (536,8 mm<sup>2</sup>) (gráfico 1).

### Cinética da área da pápula

Observou-se aumento progressivo na área da pápula induzida tanto pelo Dp quanto pela histamina, com pico máximo no 15° minuto (23,7 mm<sup>2</sup>) pela histamina e no 20° minuto pelo Dp (26,9 mm<sup>2</sup>), sem diferença quanto ao desenvolvimento cinético ( $p = 0,81$ ) (gráfico 2).

Gráfico 1 – Cinética do tamanho do eritema por fotografia digital.

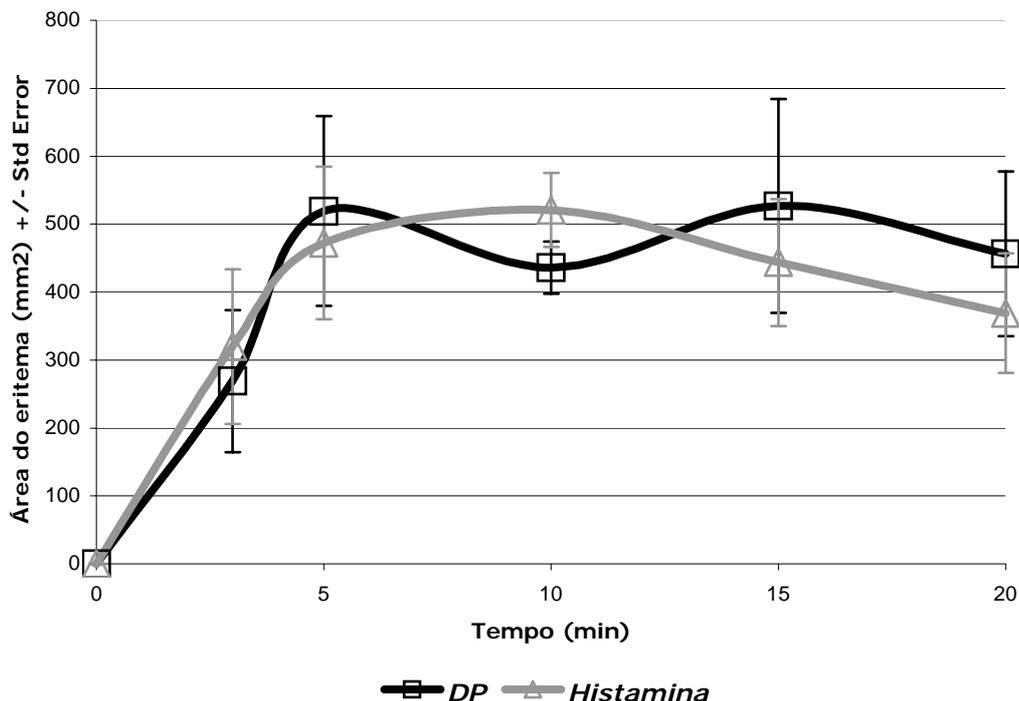
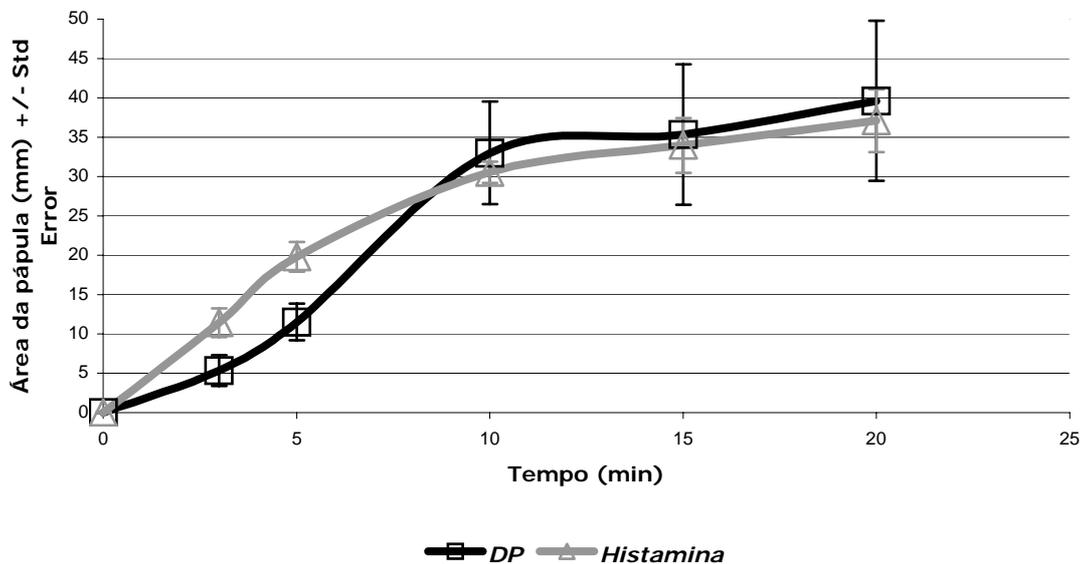


Gráfico 2 – Cinética da pápula pela fotografia digital em mm².



**Cinética da intensidade do eritema**

Quando comparada à cor da pele normal, a cor vermelha variou significativamente em relação ao tempo de observação, com médias de 0; 4,25±0,96; 5,10±1,04; 3,75±1,80; 7,35±0,6 e 8,05±0,69 nos tempos pré-determinados; a partir do 3º minuto foi estatisticamente maior na área do teste que na área controle (p<0,0001).

A intensidade da cor verde também variou com o tempo, reduzindo-se a partir do 3º minuto após aplicação da histamina (p<0,0001). A intensidade da cor azul não apresentou alteração com o tempo (p=0,67).

Não houve diferença significativa da intensidade do eritema entre histamina e Dp (p=0,6) (gráfico 3 e gráfico 4).

Gráfico 3 – Cinética da intensidade do eritema induzido por histamina.

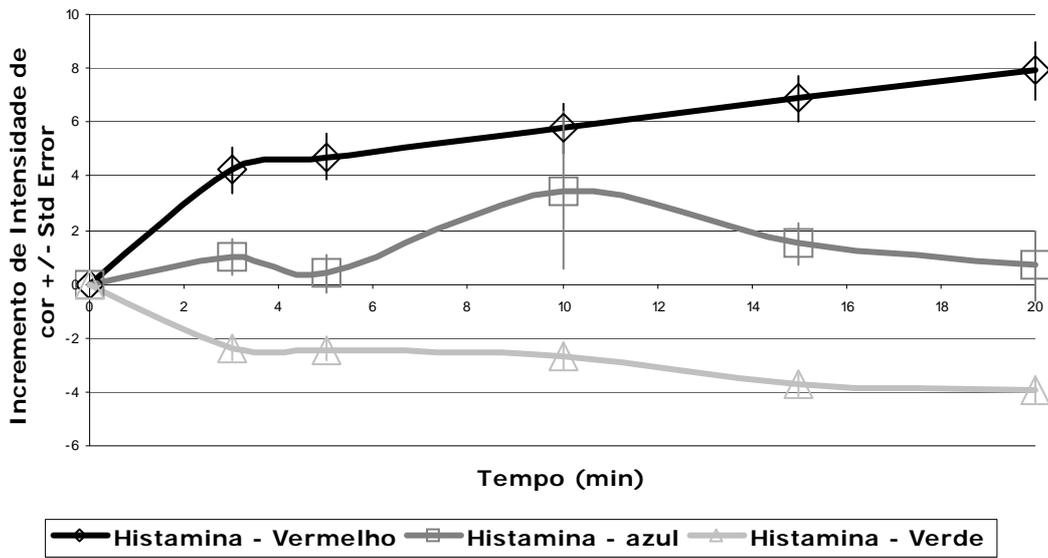
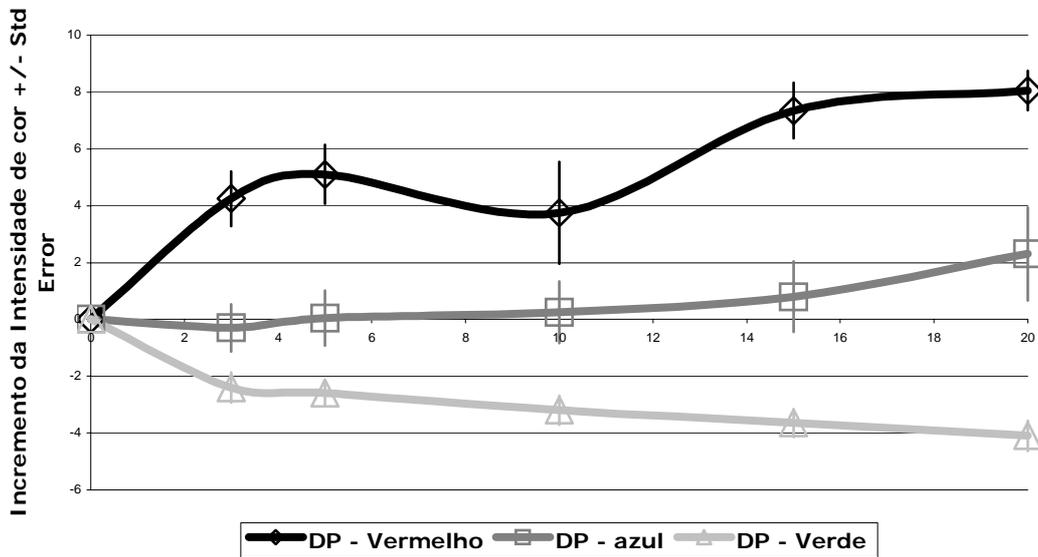


Gráfico 4 - Cinética da intensidade do eritema induzido por extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

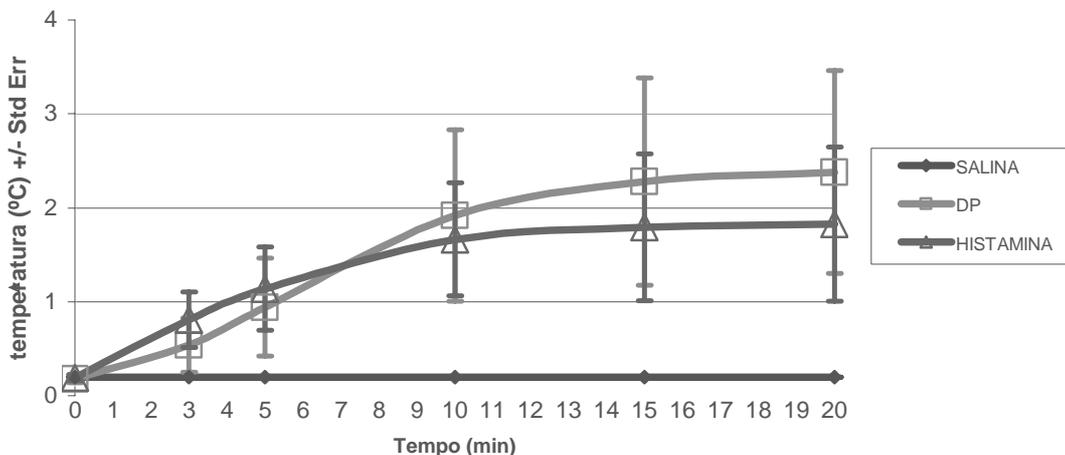


**Cinética da temperatura no local do teste cutâneo**

A temperatura manteve-se quase constante nos níveis basais nos primeiros dois minutos. Após esse tempo iniciou-se aumento progressivo da intensidade da

temperatura cutânea, com elevação linear de 2°C até o 20º minuto. Não houve diferença significativa da cinética entre os desafios (gráfico 5).

Gráfico 5 - Cinética da temperatura cutânea no local do teste



**Cinética da velocidade da reação cutânea induzida por histamina e por aeroalérgeno**

Nos primeiros três minutos após a punção, a velocidade da intensidade do eritema foi significativamente maior que a velocidade da pápula e da temperatura ( $p=0,05$ ;  $p=0,016$ , respectivamente). Já entre o 5º e o 10º minuto a velocidade da pápula foi estatisticamente maior que a do tamanho do eritema ( $p=0,05$ ). Nos últimos cinco minutos houve uma queda significativa da velocidade do tamanho do eritema em relação à sua intensidade.

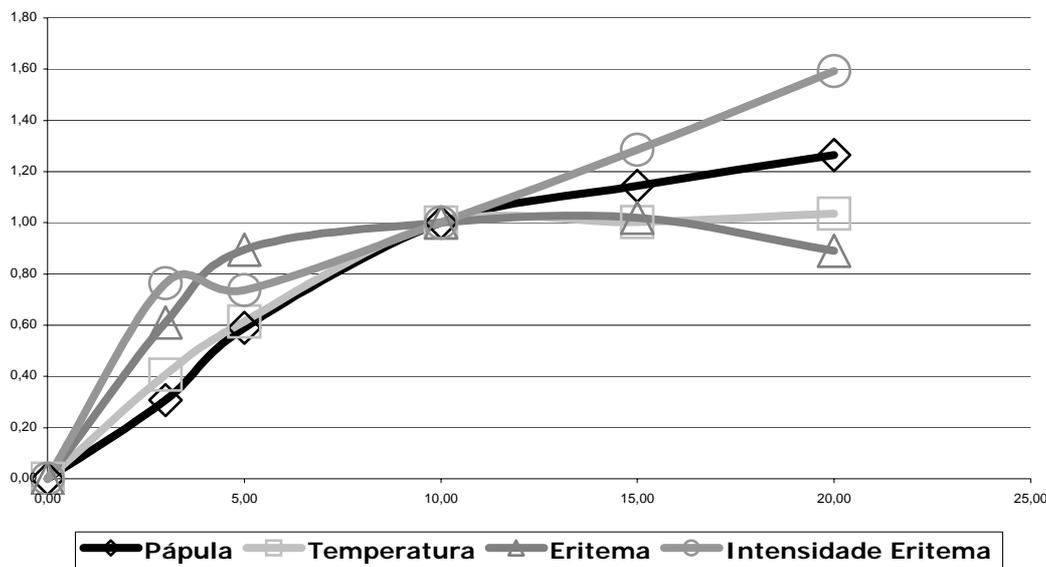
A cinética das reações cutâneas induzidas pela histamina e pelo *D. pteronyssinus* foi similar, porém com diferença

na velocidade das suas variáveis em determinados tempos de análise.

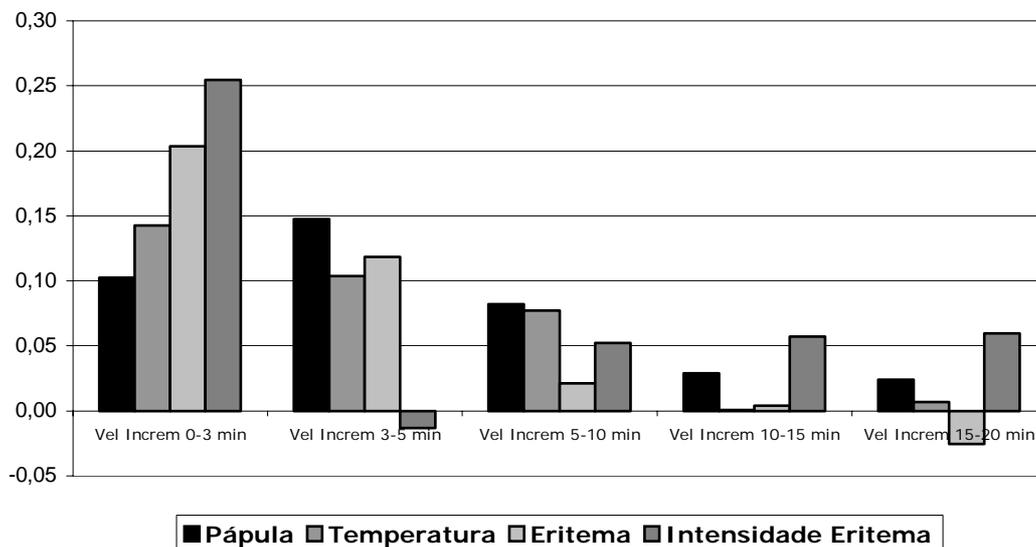
A velocidade máxima na formação da pápula por histamina foi atingida nos primeiros cinco minutos ( $3,80 \pm 0,73$ ), com maior rapidez da temperatura no 3º minuto, enquanto naquela induzida pelo aeroalérgeno ocorreu entre o 5º e o 10º minuto ( $2,42 \pm 0,37$ ), com velocidade máxima da temperatura no 15º minuto.

A temperatura correlacionou-se significativamente em todos os pontos de análise com o tamanho da pápula (gráfico 6 e gráfico 7).

Gráfico 6 – Cinética dos parâmetros inflamatórios pela fotografia digital e termometria cutânea.



**Gráfico 7** – Velocidade dos parâmetros inflamatórios por fotografia digital e termometria cutânea em minutos. Em cada intervalo de tempo as colunas seguem a seguinte ordem: pápula, temperatura, eritema e intensidade do eritema. Vel Incrém 0-3 min = Velocidade de Incremento entre 0 e 3 minutos



## Discussão

A combinação de termometria cutânea e de fotografia digital mede a cinética do desenvolvimento da reação cutânea induzida por puntura, independentemente do sexo, do desafio e do fototipo do indivíduo. Esses são meios objetivos que incorporam novas variáveis a serem avaliadas nos testes cutâneos e no diagnóstico das doenças alérgicas mediadas por IgE.

Os resultados do estudo mostram ser possível a avaliação objetiva, dinâmica e fisiológica da reação induzida por puntura, com base em parâmetros como a resposta neural, a vasodilatação e a permeabilidade vascular, os quais podem ser estudados isoladamente sob a influência de anti-histamínicos, antileucotriênicos, bloqueadores de canais de cálcio, entre outros. Também permitem entender variações individuais, tais como a ausência de eritema na presença de pápula e vice-versa.

Estes resultados baseiam-se em conclusões obtidas de maneira independente. Outros dados consagrados na história da reação mediada por IgE confirmam as observações deste estudo.<sup>2</sup> Este é o primeiro estudo realizado com seres humanos, *in vivo*, usando técnica não invasiva que deriva parâmetros inflamatórios para inclusão de variáveis determinantes da reação cutânea.

A análise dos dados mostra diferenças significativas entre alguns parâmetros ajustados para unidade única, forma essa com que se afastou a possibilidade de que tais diferenças se devessem apenas ao acaso. A presença da reação cutânea à histamina e ao extrato de *D. pteronyssinus*, com ausência de diferença de cinética entre esses indutores, confirmou a inexistência de problemas com a coleta da amostra.

O aumento mais precoce da intensidade e do tamanho do eritema sugere que esses eventos são mediados pelo reflexo neural, que é o mais rápido após o início do desafio. Após esse reflexo, sabe-se que há aumento da permeabilidade vascular, evidenciado pela progressão seqüencial do tamanho da pápula. Ao mesmo tempo, como resultante do edema formado, há aumento da temperatura, que atinge um platô do limite da temperatura central.

Os achados aqui relatados são consistentes com os de outros estudos. Bagnato et al. correlacionaram o desenvolvimento da pápula com o aumento da temperatura local por imagem infravermelha<sup>3</sup>; nesse estudo, entretanto, nada havia sobre o tamanho ou a intensidade do eritema.

Estudo feito com *laser Doppler flowmetry* verificou rápido aumento do fluxo sanguíneo tanto no eritema como na pápula; aumento esse maior no eritema entre 6,5 a 13 minutos após a puntura. O aumento do fluxo no local do aeroalérgeno só foi observado após 2,5 minutos<sup>4</sup>. Embora esses dados apresentem alguma semelhança com os obtidos no presente estudo, não foram caracterizados nessas investigações os aspectos da intensidade e do tamanho da reação.

A fotografia digital como recurso para análise mais objetiva de lesões cutâneas tem sido objeto de vários estudos<sup>5,6,7</sup>, porém um único foi realizado para avaliação da reação cutânea<sup>8</sup>. Usando nove cães, nos quais a reação foi induzida intradermicamente com histamina, a pesquisa demonstrou que o eritema é mais bem avaliado por fotografia do que a olho nu ou cromometria.

Algumas questões devem ainda ser consideradas neste relato.

O objetivo inicial desta pesquisa — de fazer estudo comparativo da termometria cutânea e da fotografia digital como recursos de análise objetiva da reação cutânea — mostrou-se impossível de realizar, por ser a termometria mais susceptível às interferências do meio.

Outro ponto refere-se à interpretação dos dados, que se baseou em dogmas aceitos na literatura e não confirmados direta ou indiretamente.

Aspecto importante também a ser relevado foi o custo tecnológico. A câmera para captação de imagem infravermelha e o *software* para determinação da temperatura usados neste estudo custam bem mais do que o material similar encontrado no mercado. Entretanto, a máquina fotográfica digital e sua tecnologia apresentam baixo custo relativo e encontram-se popularizadas mesmo em regiões de menor poder aquisitivo do país e no exterior.

Diferente dos estudos encontrados na literatura, este enfatiza o valor da inclusão de variáveis outras na determi-

nação do resultado do teste cutâneo, como a intensidade do eritema, além disso, apresenta técnica que permite melhor documentação da reação e facilita o estudo de novos extratos antigênicos e drogas. Assim, este trabalho pretende demonstrar que é possível avaliar a cinética da reação pela velocidade de desenvolvimento e comparar as variáveis reduzindo-as a uma unidade única.

Independentemente da necessidade de mais estudos para a compreensão destes achados na prática clínica, é importante destacar que eles confirmam e dão acesso, de maneira objetiva, a dados ainda não considerados na avaliação do teste cutâneo.

Estudos com o uso de anti-histamínicos estão sendo iniciados com o intuito de avaliar essas variáveis em indivíduos sintomáticos ou não a um determinado antígeno.

Pelas análises de fotografias digitais e termometria cutânea, obtidas da reação cutânea induzida por punção, foi possível a mensuração da reação triplice de Lewis pela intensidade e cinética de desenvolvimento; além disso, adicionou variáveis que podem ser medidas em conjunto sob outras condições experimentais.

### Referências

1. Plytycz B, Seljelid R. From inflammation to sickness: historical perspective. *Arch Immunol Ther Exp* 2003;51:105-9.
2. Serafin WE, Ausren KF. Current concepts: mediation of immediate hypersensitivity reactions. *N Engl J Med* 1987;317:30.
3. 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.
4. 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;82:291-96.
5. Fleming MG. Digital dermoscopy. *Dermatol Clin* 2001;19:359-67.
6. Cascinelli N, Ferrario M, Bufalino R, Zurrida 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.
7. Jamora MJ, Wainwright BD, Meehan SA, Bystryk JC. Improved identification of potentially dangerous pigmented skin lesions by computerized image analysis. *Arch Dermatol* 2003;139:195-98.
8. Boysen L, Sorensen P, Larsen M, Serup J, Kristensen F. Evaluation of skin erythema by use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:565-69.

### Agradecimento

Ao engenheiro Mário Cimbalista Jr que gentilmente cedeu os equipamentos, e realizou a filmagem, de termometria em infravermelho.

### Correspondência:

Prof. Dr. Hermênio C. Lima  
Núcleo de Pesquisas em Imunodermatologia Clínica e Imunologia Clínica  
Rua XV de Novembro, 1206 – Centro  
80060-950 – Curitiba – PR  
E-mail: hclima@ufpr.br  
hclima@uol.com.br  
rosalyvs@hotmail.com

## 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*

Rosaly V. dos Santos<sup>1</sup>, Nelson A. Rosário Filho<sup>2</sup>, Hermênio C. Lima<sup>3</sup>

#### 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 27,47mm<sup>2</sup> e 30,7mm<sup>2</sup>, 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  $\pm 2$  C ao 20 min de observação, com curvas semelhantes às daquelas 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 termography 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 mm<sup>2</sup>). 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 cutânea<sup>1</sup>. 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 eritema<sup>2</sup> e a transferência dos contornos da pápula e eritema através de fita transparente e cálculo da área por planimetria<sup>3</sup>.

Apesar da simplicidade do procedimento, há alguns problemas relacionados ao teste, entre eles a reprodutibilidade, imprecisão na avaliação do tamanho das pápulas de contorno circular<sup>4</sup>, 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 modificações<sup>3</sup>. 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

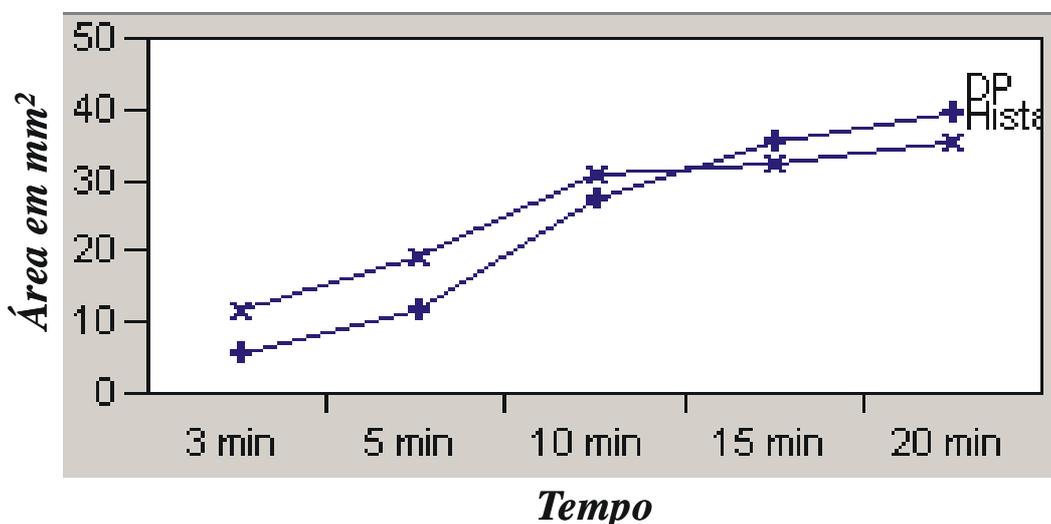
Teste cutâneo por puntura foi analisado em noventa e três voluntários. Setenta e seis deles (76/93) foram classificados como fototipo II ou III e cinco deles eram fototipo V na classificação de cor de pele feita por Fitzpatrick<sup>5</sup>. A média de idade foi de 20,2 anos. Trinta voluntários apresentaram 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  $\text{mm}^2$  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

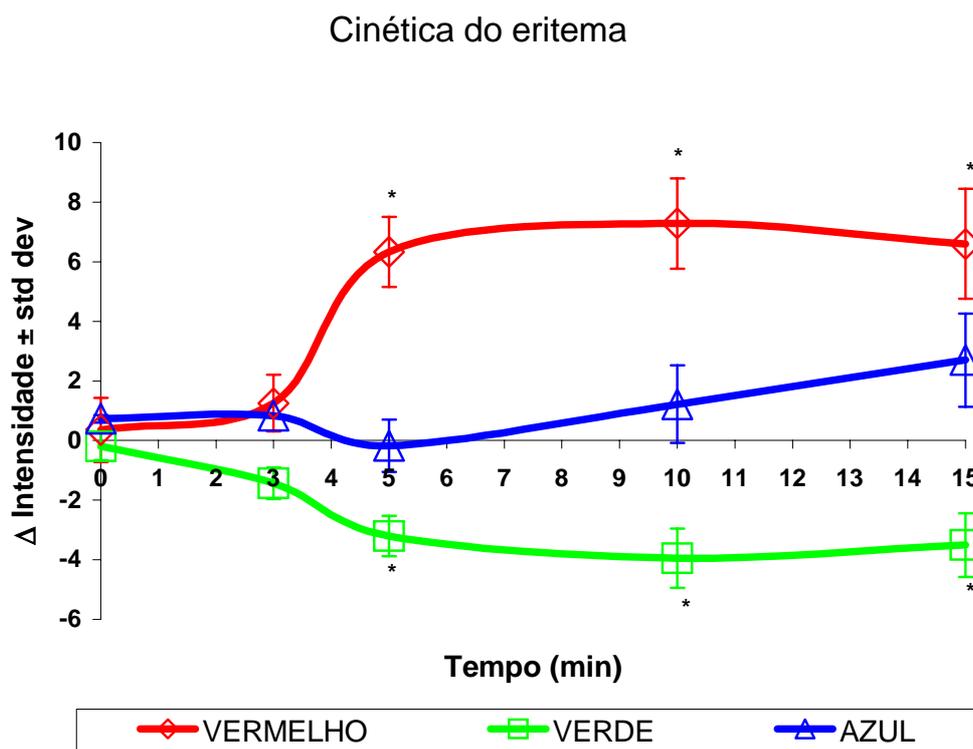
obtida por fotografia digital foi comparada com dados obtidos com leituras feitas por régua (diâmetro médio) e por fita adesiva (área escaneada). Houve correlação estatisticamente significativa entre os métodos de fotografia digital e fita adesiva no diferentes pontos de análise ( $p<0,0001$ ), e entre 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  $p<0,05$ .

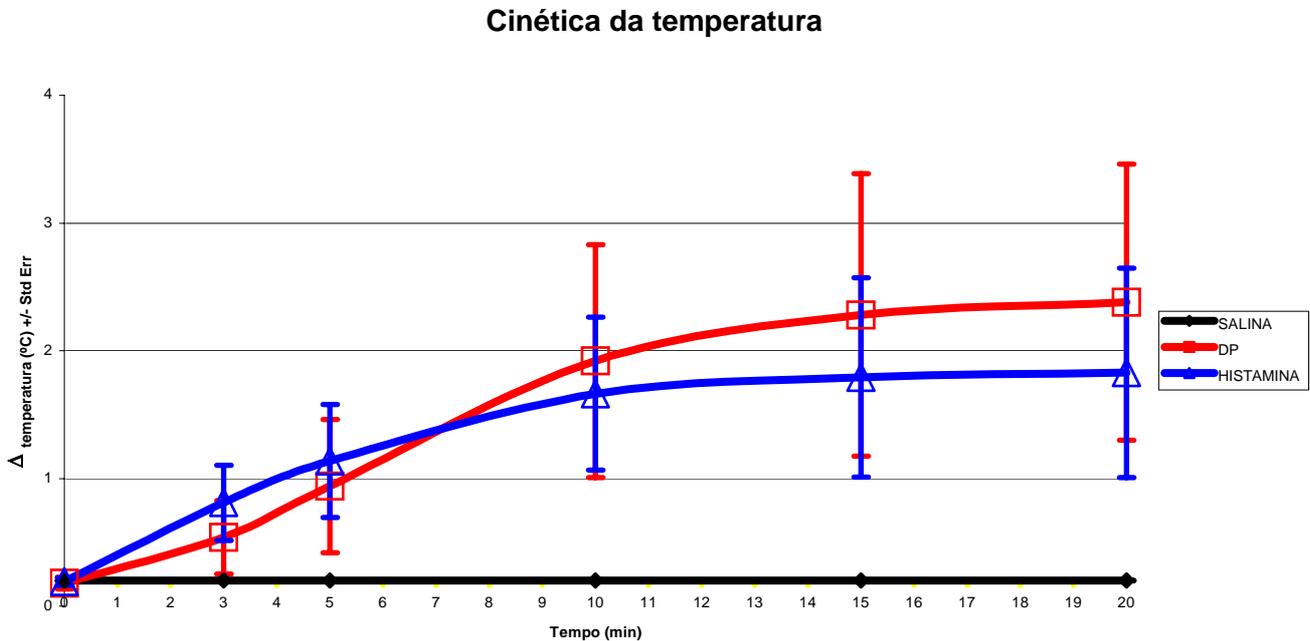


### Temperatura por termometria

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 tardia<sup>6</sup>. 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 anos<sup>7</sup>, 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 teste<sup>8</sup>.

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 computadorizado<sup>3</sup>. Estudo semelhante foi realizado também por Pijnenborg *et al*<sup>1</sup>. 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 descritos<sup>9-10</sup>. 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 planimetria<sup>10</sup>. Estes métodos não quantificam a intensidade do eritema. Impedância elétrica foi realizada para caracterizar objetivamente e quantificar a pápula, mas não o eritema<sup>11</sup>.

Não há estudo na literatura que avalie a reação 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 dermatoses<sup>12</sup>. 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 computação<sup>13</sup>. 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 digital<sup>14</sup>.

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 métodos<sup>15</sup>.

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, Bindslev-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