

## Köpeklerde Atopik Dermatitisin Tanısında İntradermal Deri Testi ve Alerjen Spesifik Ig E Düzeylerinin Karşılaştırılması

Ethem M. TEMİZEL\* Nilüfer AYTUG\*\*

Geliş Tarihi: 23.06.2010

Kabul Tarihi: 09.07.2010

**Özet:** Atopik dermatitis genetik olarak programlanmış inflamatuvar bir hastalıktır. Bu çalışmada, kliniklerimize kaşıntı şikâyeti ile getirilen köpeklerde İntradermal testi temelinde ELISA testinin sensitivitesi ve spesifitesinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmanın materyalini, değişik ırk ve yas, 26 erkek, 24 dişi olmak üzere toplam 50 köpek oluşturmuştur. Bu çalışmada kullanılmak üzere sekiz alerjen Bursa bölgesinde daha önce yapılan bir çalışma temelinde seçildi. Atopi şüpheli köpeklerin klinik muayenelerinin yapılması spesifik tanısız testler temelinde olası hastalıklar (piyoderma, uyuz, dermatomikoz ve gıda alerjisi v.b) elimine edildi Willemse'nin tanısız kriterleri temelinde seçilen atopi şüpheli köpekler üzerinde İDT yapıldı. Serum örneklerinden, ELISA testi ile alerjen spesifik Ig E tayinleri yapıldı

Çalışmada, ev tozu akarlarına karşı % 66 (n:33), Pireye karşı %48 (n:24) oranında, ELISA testinde ise ev tozu akarına % 72 (n:36), pire'ye karşı %6 (n:3) oranında pozitif reaksiyon saptandı. Serolojik monoklonal Ig E testinin sensitivite ve spesifitesinin %0-82 ve %50-100 arasında değiştiği belirlendi.

Sonuç olarak, ELISA testi sensitivite ve spesifitesinin ise ev tozu akarları açısından yüksek olduğu ancak genel olarak irdelendiğinde bu iki test arasındaki korelasyonun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** ELISA, deri testi, köpek, alerjen.

### Comparison of Intradermal Skin Test and Allergen Specific Ig E Levels in Diagnosis of Canine Atopy

**Abstract:** Canine atopic dermatitis is a genetically predisposed inflammatory disease. The aim of the study was to evaluate sensitivity and specificity of ELISA test results based on the intradermal skin test (IDT). A total of 50 dogs in different breeds, ages and sexes (26 male and 24 female) were used as material. Eight allergens which were selected based on a previous study were used in the study. After clinical examination and ruling out other disease based on diagnostic work-up, IDST were performed on the dogs suspected of atopy according to Willemse's criteris. ELISA analysis were performed from serum blood samples.

In IDT, positive reaction ratios were detected as for house dust mites, 66% (n: 33), 48% (n:24) for flea. In ELISA, were detected as 72% (n: 36) for house dust mite, 6 % (n: 3) for flea. Sensitivity and specificity of serologic monoclonal Ig E test were 0-82 % and 50-100 % based on the IDST results, respectively.

As a result, even though the sensitivity and the specificity of ELISA test were higher for house dust mite, in general, it was concluded that the correlation between these two tests were very low.

**Key Words:** ELISA, skin test, dog, allergen.

\* Dr. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü 16059 Nilüfer/Bursa – TÜRKİYE. ethem@uludag.edu.tr

\*\* Prof. Dr. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü 16059 Nilüfer/Bursa – TÜRKİYE.

## Giriş

Atopi (atopik hastalık, alerjik inhalant dermatit), karakteristik klinik bulguları olan yangısal, kasıtlı alerjik bir hastalığa genetik bir predispozisyon olarak tanımlanmaktadır<sup>13,24,25</sup>. Ev tozu akarları, polenler, küf sporları, insan ve hayvan epiteli gibi pek çok çevresel alerjene karşı oluşan Ig E antikorları ile ilişkili bir problem olduğu bilinmektedir<sup>4,6,7,17,18</sup>.

Kesin tanı, anamnez ve klinik bulguların eşliğinde, İDT ve alerjen spesifik Ig E sonuçları temelinde konabilir<sup>6,13,24</sup>. İntradermal test, Veteriner Hekimliği ve İnsan Hekimliğinde, Ig E ilişkili hipersensitiviteyi tespit etmek için kullanılan bir testtir<sup>6,25</sup>. Serumda alerjen spesifik Ig E'nin seviyesini reaktif olarak tespit etmek için Radioallergosorbent test (RAST), ELISA ve liquid – pahse immunoenzymatic assay testleri kullanılan testler arasında yer almaktadır<sup>4,6,7,17</sup>.

ELISA ve İDT arasında kısmi bir korelasyon bulunmaktadır. Bu korelasyonu belirleyen parametreler olan sensitivite ve spesifite, alerjen spesifik Ig E testi açısından oldukça önemlidir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda serolojik alerji testlerinin sensitivite ve spesifitelerinin % 100 olmadığı belirtilmiştir. Pozitif testler alerjinin klinik görünümü ile daima uyumlu değildir. Bununla birlikte bu testlerin sonuçları klinik tablo ile dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Sonuç olarak bahsedilen bu farklılıklar, genel bir standardizasyonun olmamasından kaynaklanan test yöntemlerindeki farklılıktan ve değişik çalışmaların sonuçları arasındaki değişkenliklerden kaynaklanmaktadır<sup>6</sup>. İntradermal testlerde olduğu gibi serolojik testlerde de çok geniş bir varyasyon söz konusudur<sup>25</sup>. İDT'yi negatif olan bazı köpeklerde serolojik olarak pozitif sonuçların elde edilmesi düşük spesifite nedeni olmakla birlikte bu fenomen, üretilen Ig E'nin mast hücrelerine ve diğer yangısal hücrelere bağlanabilirlikleri ve bu hücrelerin histamin ve benzeri substansları salgılayabilme kapasiteleri ile ilişkili olabilir. Yapılan çalışmalarda serolojik alerji testinin atopinin kesin tanısında kullanılmamasının gerektiği, klinik şüphenin teyidi ve muhtemel alerjenlerin belirlenmesi açısından kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır<sup>6,8,24</sup>.

Bu çalışma, kaşıntı şikayeti ile getirilen, klinik olarak atopi şüpheli olan köpeklerde intradermal test (İDT) ile antijen spesifik Ig E antikorlarının (ELISA) pozitiflik oranlarının belirlenmesi ve sonuçların karşılaştırılmasıyla, ELISA testinin sensitivite ve spesifitesinin de-

ğerlendirilmesi ve tanıda kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amacı ile yapıldı.

## Materials and Methods

### Patient selection

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kliniklerine, 2003-2005 yılları arası, kaşıntı ve deri lezyonu şikayetleri ile getirilen, değişik ırk ve yaşlardaki<sup>1-11</sup>, 26 erkek ve 24 dişi olmak üzere toplam 50 atopi şüpheli köpek kullanıldı. Olguların, % 46'sının mevsimsel bulgular gösterdikleri, % 54'ünde ise bulguların bütün bir yıla yayıldıkları belirlenmiştir. Olgular, atopi ile uyumlu anamnez verileri ve klinik tablo temelinde, kaşıntının diğer nedenleri (gıda alerjisi, demodeks, sarkoptes, fungal ve bakteriyel orijinli hastalıklar) elimine edildikten sonra Willemse'nin tanı kriterleri<sup>27</sup> temelinde irdelenerek belirlendi. Hazırlanan anamnez formu her köpek için dolduruldu ve tüm köpeklere genel klinik muayeneyi takiben dermatolojik muayene uygulandı. Rutin deri kazıntısı muayenesi, bakteriyolojik ve mikolojik kültür, *Microsporum canis* açısından ise WOOD's lambası muayenesi yapıldı<sup>24</sup>. Diğer nedenlerin eliminasyonunu takiben, Willemse'nin kriterleri temelinde<sup>27</sup> major bulgulardan en az iki, minor bulgulardan en az üç'üne sahip olan hastalar klinik olarak atopi şüpheli olarak değerlendirildi ve bu olgular çalışma kapsamına alındı.

### Alerjen Panelinin Oluşturulması

Alerjen paneli Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Alerji Polikliniği ile yapılan kişisel görüşmeler ve daha önce Bursa yöresinde köpekler üzerinde yapılan bir çalışmanın bulguları temelinde belirlendi<sup>11</sup>. Greer (Lenoir, USA) firmasından soğuk zincirde temin edilen alerjenler çalışma süresince + 4°C'de saklandı. Çalışmanın alerjen skalasını, ısırğan otu, söğüt, meşe, çınar, pire, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, ev tozu akarları (Dermatofagoides farinea) oluşturu.

### İDT Uygulanması

İDT öncesi köpekler 0,25-0,5 mg/kg dozda Xylazin ile kimyasal zapt-ı rapt altına alınarak, lateral pozisyonda yatırıldılar ve lateral toraks bölgeleri travma oluşturmayacak şekilde, hiçbir kimyasal madde kullanılmadan traş makinesi ile traş edildi. Çalışmada, İDT için insülin enjektörü kullanıldı. Negatif kontrol olarak 0.05 ml % 0.9'luk NaCl, pozitif kontrol

olarak da 1:100.000 oranında dilue edilen histamin fosfat uygulandı. İDT skalasında yer alan alerjenler 1000 PNU/ml dozda kullanıldılar<sup>22</sup>.

Testin yapılmasının ardından 15-20 dakika sonra oluşan reaksiyonlar (kabarıklık, kızarıklık) pozitif kontrol ile karşılaştırılarak subjektif olarak değerlendirildi ve + 1'den +4'e kadar derecelendirildiler. İDT, tüm köpeklere aynı araştırmacı tarafından uygulandı.

### Serolojik alerji testi

ELISA testi için, venöz kan örnekleri alınarak serumlar ayrıldı, -20°C'de bekletilen serumlar alerjen spesifik Ig E tayini için Imovet-biocehck ® firmasına gönderildi. ELISA test sonuçları üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki skala çerçevesinde derecelendirildi. <0,5 (-), 0,5-2 (+), 2-20 (++), 20-50 (+++), >50 (++++).

### ELISA testinin sensitivite ve spesifitelerinin belirlenmesi

ELISA testinin, pozitif olgular arasındaki pozitif reaksiyon yüzdesini ifade eden sensitivite ve negatif olgular arasındaki negatif reaksiyon yüzdesini ifade eden spesifite sonuçları İDT sonuçları temelinde hesaplandı. Alergen: İDT(+) ELISA (+): (a), İDT (-)ELISA (+):(b), İDT (+) ELISA (-): (c), İDT (-) ELISA (-):(d). İDT temelinde ELISA testi: Sensitivite: a/a+c, Spesifitesi: d/ b+ d formülleri ile tespit edildi.

### Results

Çalışmada, ev tozu akarlarına karşı % 66 (n:33), pireye karşı %48 (n:24), Penicillium notatum'a %24 (n:12), Aspergillus fumigatus'a %8 (n:4), çınar ağacına %6 (n:3), söğüt ağacına % 12 (n:6), ısırğan otuna %6 (n:3), meşeye % 14 (n:7) olarak saptandı.

ELISA test sonuçlarına göre; ev tozu akarına % 72 (n:36), meşe ağacına %8 (n:4), söğüt ağacına %6 (n:3), pireye % 6 (n:3), çınar ağacına %2 (n:1), ısırğan otuna % 2 (n: 1) oranlarında pozitif yanıt alınmıştır. *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* karşı ELISA test sonuçlarına göre negatif olarak saptandı.

ELISA testi sensitivite ve spesifite değerlendirmesi **Tablo-1**'de görülmektedir. Testin sensitivite ve spesifite değerleri İDT ve/veya ELISA'da ortak pozitif reaksiyon alınamayan, ısırğan otu, çınar, meşe, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus* alerjenlerinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenmemiştir. Bu çalışmada ELISA testinin genel

olarak sensitivite ve spesifite değerleri sırası ile % 0-82 ve % 50-100 olarak saptanmıştır.

**Tablo 1. ELISA testi allerjenler bazında sensitivite ve spesifite sonuçları**

Ev tozu akarı	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	28	8	82	50
ELISA (-)	6	8		
Pire	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	3	0	12	100
ELISA (-)	22	20		
<i>A. fumigatus</i>	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	0	0	0	100
ELISA (-)	5	45		
<i>P. notatum</i>	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	0	0	0	100
ELISA (-)	12	38		
Çınar	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	0	3	0	97
ELISA (-)	1	46		
Meşe	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	0	6	0	86
ELISA (-)	5	39		
Isırğan otu	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	0	1	0	97
ELISA (-)	3	46		
Söğüt	İDT (+)	İDT (-)	Sensitivite	Spesifite
ELISA (+)	2	1	33	97
ELISA (-)	4	43		

### Tartışma

İnsan hekimliğinde, İDT; maliyetli, anaflaktik reaksiyon riski olan, konforsuz bir test olarak değerlendirilmekte ancak, yeterli anamnez ve klinik bulguları olmasına rağmen negatif çıkan prik test sonuçlarından sonra tercih edilen bir test olarak kullanılmaktadır<sup>5</sup>. Bunlara karşın veteriner hekimliğinde intradermal test uygulamaları, veteriner pratisyenler arasında tercih edilen bir tanı yöntemidir. İDT'nin uygulanması ve yorumlanması gibi konularda halen daha araştırma ve uygulamadan uygulamaya farklılıklar bulunmakla birlikte<sup>10</sup>, birçok araştırmacı tarafından altın standart olarak nitelenmekte<sup>22,10,2,7</sup>, in vitro alerji testlerinin sensitivite ve spesifite değerlerinin belirlendiği çalışmalarda<sup>6,10,2</sup> "doğru sonuç" olarak kullanılmaktadır<sup>6</sup>. Sunulan çalışmada, İDT'in veteriner hekimliğinde, alerjen ekstraktlarının standardizasyonu, alerjenlerin dozlarının belirlenmesi ve uygulama tekniklerinin prik teste göre daha iyi tanımlanmış olması nedeniyle ELISA testinin değerlendirilmesinde doğru sonuç olarak kullanılması gerektiği kanısına varıldı.

Ev tozu akarları Amerika Birleşik Devletleri ve Asya'da atopiye neden olan en önemli

alerjen olarak değerlendirilmektedir<sup>24,14</sup>. Çeşitli çalışmalarda, ev tozu akarlarına karşı ELISA testinde % 10.7-90<sup>1,28,21,8,12,12</sup> arasında pozitif yanıt alındığı belirtilmektedir. Ev tozu akarlarına karşı serum alerjen spesifik Ig E ve İDT sonuçlarını karşılaştıran bir çalışmada<sup>7</sup>, intradermal testlerde % 82.2 oranında pozitif cevap alınırken, atopili köpeklerde serolojik testlerde % 86 oranında pozitif reaksiyon elde edildiği belirtilmektedir. Sunulan çalışmada ev tozu akarlarına İDT’de % 66, ELISA testinde ise % 72 oranında pozitif yanıt alınmış ve ELISA testinin sensitivite ve spesifitesinin % 82 ve % 50 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç diğer çalışmalara<sup>28,15,26</sup> ait sonuçlarına uyum göstermektedir. Bu sonuçlar ayrıca ülkemizde de ev tozu akarlarının atopik dermatitis’e neden olan önemli bir alerjen olduğunu desteklemektedir.

Sunulan çalışmada, İDT sonuçlarına göre pireye karşı % 48 oranında pozitif yanıt alınırken, serolojik testlerde %6 oranında pozitif yanıt alınmıştır. İki test arasındaki uyumsuzluk sonucu flea alerjenine karşı testin sensitivite değerinin çok düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda İDT ve serolojik testlerde elde edilen farklı pozitif cevap oranları, farklı coğrafik bölge ve testlerin farklı mevsimlerde yapılmasına bağlanabilmektedir. İDT ve ELISA testindeki uyumsuzluk ve farklılıkların, İDT’nde elde edilen sonuçların iritan reaksiyonun sonucu olarak şekillendiği ya da diğer insektlerle kros reaksiyonun bir sonucu olarak şekillenebileceği kanısına varılmıştır.

Küf etkenlerine karşı gelişen alerjik reaksiyonun hayvanların yaşam ortamları ile ilgili olabileceği belirtilmektedir<sup>9</sup>. Çeşitli çalışmalarda ELISA test sonuçlarına göre, *Aspergillus fumigatus* % 100, % 0, % 20, % 3.5, % 81<sup>1,14,21,12,19</sup> ve *Penicillium notatum*’ a karşı % 90, % 0, % 100, % 10.7 ve % 30<sup>19,18,21,22,26</sup> oranlarında pozitif yanıt saptandığı belirtilmektedir. Sunulan çalışmada İDT sonuçlarına göre, *Aspergillus fumigatus* ve *Penicillium notatum*’a alerji panelinde yer alan diğer alerjenlerden daha düşük oranda pozitif yanıt alınmış, ELISA testinde ise pozitif yanıt elde edilememiştir. Belirtilen alerjene karşı pozitiflik oranının insanlarda<sup>9</sup> ve hayvanlarda<sup>16,29</sup> geçmiş yıllarda saptanan oranlara göre daha düşük olmasının ısınma araçlarının ve temizlik anlayışının değişimi ile ilişkilendirilebileceği kanısına varılmıştır.

Sunulan çalışmada, İDT ve/ ve ya ELISA’da ortak pozitif reaksiyon alınamayan ısırgan otu, çınar, meşe, söğüt *Penicillium*

*notatum*, *Aspergillus fumigatus* alerjenlerinin sensitiviteyi belirlenememiştir. Bu alerjenlere İDT’inde düşük seviyede pozitif yanıt alınmasının serolojik testlerle uyumsuzluğunun nedeni olarak açıklanabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, atopi şüpheli olguların tanısında ELISA testinin sensitivitesinin ev tozu akarları açısından yüksek olduğu, ancak genel olarak irdelendiğinde bu iki test arasındaki korelasyonun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda<sup>1,8,21</sup> elde edilen sonuçlar ile çalışmada elde edilen sonuçların değişkenliği İDT ve ELISA testlerinde kullanılan antijenlerin farklı firmalara ait olmaları ile açıklanabilir. Bununla birlikte aynı firmaların antijenleri kullanıldığı halde çelişkili sonuçlar alındığını bildiren çalışmalar da mevcuttur<sup>8,28</sup>. Bu anlamda İDT ve ELISA testi sonuçlarının karşılaştırıldığı daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Testin kullanımı açısından kritik bir öneme sahip olan bu farklılıkların nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte gelecekte yapılacak olan çalışmalar için konu oluşturacaktır.

## Kaynaklar

1. Bond, R., Tohrogood, S.C., Lloyd, D.H. 1994. Evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of canine atopy. *Vet Rec.* 135: 130- 133.
2. Carlotti, D.N., Costargent, F. 1994. Analysis positive skin tests in 449 dogs with allergic dermatitis. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 4:42-59.
3. Codner, C.E., Griffin, E.C. 1996. Serologic allergy testing for dogs. *Comp Cont Educ Pract*, 18: 237-246.
4. Day, M.J., Corato, A., Shaw, S.E. 1996. Subclass profile of allergen-specific IgG antibodies in atopic dogs. *Res Vet Sci*, 61: 136-142.
5. Demoly P, Michel FB, Bousquet J. 1998. In vivo methods for study of allergy: skin tests, techniques and interpretation In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF et al Eds, *Allergy Principles and Practice*, 5th Edition Mosby Year Book, St Louis, 430-439.
6. Halliwell, R.E.W., De Boer, D.J. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis III: the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunop*, 81: 159-167.
7. Halliwell, R.E.W., Gilbert S.M., Lian, M.G. 1998. Induced and spontaneous IgE antibodies to *Dermatophagoides farinae* in dogs and cats: evidence of functional heterogeneity of IgE. *Vet Dermatol*, 9: 179-184.

8. Hämmerling, R., De Weck, A.L. 1998 Comparison of two diagnostic test for canine atopy using monoclonal anti-IgE antibodies. *Vet Dermatol*, 9: 191.
9. Helbling A. 2001 Animals and fungi as allergy inducers. *Ther Umsch*, 58: 297-303.
10. Hillier, A., De Boer, D.J. 2001 The ACVD task force on canine atopic dermatitis XVII: intradermal testing. *Vet Immunol Immunop*, 20: 289-304.
11. Kırkpınar, A. 1998 Köpeklerde atopinin klinik-hematolojik olarak değerlendirilmesi ve intradermal deri testlerinin uygulanması. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
12. Kleinbeck, M.L., Hites, M.J., Laker, J.L., Halliwell, R.E.W, Lee, K.W. 1989 Enzymelinked immunosorbent assay for measurement of allergen specific Ig E antibodies in canine serum. *Am J Vet Res*, 50: 1831-1839.
13. Mason, I. 1995 Problem-oriented approach to skin disease of dogs. Editörler: Moriello, K., Mason, I. *Handbook of Small Animal Dermatology*, 1th Edition. Elsevier Science Ltd., New York, page, 25-26, 33-37, 68-69.
14. Masuda, K., Sakaguchi, M., Fujiwara, S., Kurata, K., Yamashita, K., Odagri, T., Nakao, Y., Matsuki, N., Ono, K., Watari, T., Hasegawa, A., Tsujimoto, H. 2000 Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Veterinary Vet Immunol Immunop*, 25: 193-204.
15. Mueller, R.S., Burrows, A., Tsohalis, J. 1999 Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific Ig E using monoclonal Ig E antibodies in 84 atopic dogs. *Aust Vet J*, 77: 290-294.
16. Nesbitt, G.H. 1978 Canine allergic inhalant dermatitis: a review of 230 cases. *J Am Vet Med Assoc*, 1: 55-60.
17. Olivry, T., Moore, P.F., Affolter, V.K., Naydan, D. 1996 Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 28-10: 579 – 585.
18. Paller, A.S. 1993 Clinical features of atopic dermatitis. *Clin Rev Allerg Immu*, 11: 429-446.
19. Park, A.J., Ohya, F., Yamashita, K., Nishifuji, K., Iwasaki, T. 2000 Comparison of response to immunotherapy by intradermal skin test and antigen-specific Ig E in canine atopy. *J. Vet. Med. Sci.*, 62: 983-988.
20. Prélaud, P. 2005 Dermatite atopique canine. *Vétérinaire*, 2: 14-29.
21. Sævik, B.K., Ulstein, T.L., Larsen, H.J.S. 2003 Evaluation of commercially available enzyme linked immunosorbent assay for the detection of allergen specific Ig E antibodies in dogs. *Res Vet Sci* 74: 37-74.
22. Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Gioulekas, D., Leontidis, L. 1999 Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunop*, 1: 61-73.
23. Schwartzman, R.M. 1984 Immunologic studies of progeny of atopic dogs. *Am J Vet Res*, 45: 375-378.
24. Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E. 1995 *Small Animal Dermatology*, 5th Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, page 500-533.
25. Shaw, S.C., Wood, J.L.N., Freeman, J., Littlewood, J.D., Hannant, D. 2004 Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. *American Am J Vet Res*, 65:1014-1020.
26. Wassom, D.L., Grieve, R.B. 1998 In vitro measurement of canine and feline IgE: A review of FcεR1a-based assays for detection of allergen-reactive IgE. *Vet Dermatol*, 9: 173.
27. Willemse, T. 1986. Atopic skin disease: a review and reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract*, 27: 771-778.
28. Zunic, M. 1998 Comparison between IMMUNODOT tests and the intradermal skin test in atopic dogs. *Vet Dermatol*, 9: 201-205.
29. Zur, G., Ihrke, P.J., White, S.D., Kass, P.H. 2002 Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol*, 13: 89.

