

2. Material und Methodik

2.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Patienten, die zur Untersuchung in diese Studie eingeschlossen wurden, hatten sich alle in der Haarsprechstunde der dermatologischen Poliklinik des Universitätskrankenhaus Benjamin Franklin (Leitung Fr. PD Dr Blume-Peytavi) zur Alopezie-Abklärung vorgestellt. Die Diagnostik der Alopecia areata beruht auf Anamnese, klinischer Untersuchung und Laboruntersuchung. Die Anamnese, orientiert einem „Haarfragebogen“ (s. Anhang) zur Erhebung wissenschaftlicher Daten, beinhaltet:

- Anamnese (Beginn vor oder nach der Pubertät, Dauer, Verlauf, Rezidiv)
- Persönliche/ familiäre Belastung
- Atopieanamnese
- Aktuelle/ bereits erfolgte Therapien

Zusätzlich wird der Patient nach sonstigen Erkrankungen, z. B. Herz-Kreislauf, Stoffwechsel- und Magen-Darmerkrankungen befragt.

Die klinische Untersuchung des Patienten erfolgt ebenfalls nach bestimmten Gesichtspunkten:

- zirkumscripter oder diffuser Haarausfall
- Akuität der Erkrankung (ödematöse, teigige Schwellung, Zupftest positiv, Ausrufezeichenhaare)
- Anhalt für Vernarbungen (zum Ausschluss anderer Ursachen)
- Augenveränderungen (Katarakt, Retinaveränderungen, Keratitis), ophtalmologische Untersuchung
- seltene Varianten (Ophiasis-Typ, diffuse Aa, isolierter Wimpern oder Augenbrauenbefall)
- Nagelveränderungen (Tüpfel, Sandpapiernägel, dünne und brüchige Nägel, Längsrillen, Koilonychie)

Bei der Labordiagnostik wird in Abhängigkeit vom Typ der Alopecia areata und je nachdem, ob eine Erstmanifestation oder ein Rezidiv aufgetreten ist, eine gezielte Auswahl folgender Untersuchungen getroffen: Blutbild, Differential-Blutbild, Transaminasen, Kreatinin, Gesamteiweiß, quantitative Immunglobuline, IgE, Lues-Serologie, Candida-Komplement-Bindungsreaktion, Eisen, Zink, Magnesium, Calcium, VitaminB12, Folsäure, Entzündungsparameter: BSG, CRP, Proteinelektrophorese, Antistreptolysintiter; Hormon-/Autoimmun-Parameter: TSH, TAK, MAK, ANA, C3, C4. Zur Sicherung der Diagnose bei klinisch nicht eindeutigem Bild wird ein Trichogramm aus dem Herd und einem nicht befallenen Areal vorgenommen. Eine Hautbiopsie trägt bei schwerer Ausprägung der Alopecia areata zur Beurteilung der entzündlichen Aktivität und der Haarfollikeldichte ebenfalls zur Sicherung der Diagnose bei.

Eingeschlossen in die Experimentalgruppe wurden alle Patienten, bei denen sich entweder durch das klinische Bild oder das Trichogramm und/oder die Histologie die Diagnose Alopecia areata eindeutig stellen ließ. Ausgeschlossen wurden alle Patienten, bei denen dies nicht möglich war, oder bei denen andere mögliche Ursachen der Alopezie vorhanden waren.

2.2 Studiendesign

Untersucht werden hier eine Gruppe von 93 Alopezie areata-Patienten und eine Kontrollgruppe von 40 Patienten, die an einer anderen Form von Haarausfall leidet, der weder entzündlich noch toxisch bedingt ist.

Beide Gruppen werden mittels ELISA (Enzyme -Linked Immune Sorbent Assay) zum einen auf unspezifische H. pylori-Antikörper, zum anderen auf spezielle Antikörper gegen das Membranprotein CagA untersucht.

A) 93 Patienten, die die Haarsprechstunde im Universitätskrankenhaus Benjamin Franklin besuchen und an gesicherter Alopecia areata leiden, werden mittels ELISA auf unspezifische Antikörper gegen H. pylori untersucht (Helicobacter screen). Die Diagnosestellung erfolgte durch eindeutige Klinik, eine Probebiopsie der Haarfollikel und/oder ein Trichogramm. Es folgt eine weitere serologische Untersuchung auf spezifisches CagA-IgG. Des Weiteren werden die Akten dieser Patienten nach Anhalt für dyspeptische und gastrointestinale Beschwerden durchsucht.

B) Als Kontrollgruppe dient eine Gruppe von Patienten, die ebenfalls die Haarsprechstunde im Universitätskrankenhaus Benjamin Franklin besuchen und gesichert an einer anderen Form von weder entzündlicher noch toxisch bedingter Alopezie leiden. In den meisten Fällen lautet hier die Diagnose diffuse Alopezie und/oder androgenetischer Haarausfall. Das Geschlechterverhältnis war in dieser Gruppe jedoch ausgeglichen. Diese werden ebenfalls auf serologisch auf unspezifische Antikörper gegen *H. pylori* und spezifische CagA-Antikörper untersucht, die Akten werden auf Magenprobleme gesichtet.

2.3 *Material*

2.3.1. Patientenseren

Die verwendeten Patientenseren wurden im Rahmen der standardisierten Blutentnahme im Rahmen der Haarsprechstunde gesammelt. Der Zeitraum, in dem gesammelt wurde, erstreckt sich auf die Jahre 1994 und 1995 und 1997 bis 1999.

2.3.2. ELISA - Kit

Zum Nachweis der unspezifischen IgG Antikörper gegen *H. pylori* wurde der Helicobacter Screen ELISA der Firma Viva Diagnostika GmbH, 50345 Hürth verwendet. Dieser Test dient zum semiquantitativen Nachweis von spezifischen humanen IgG Antikörpern gegen *H. pylori* aus Serum, die *H. pylori* Antigenpräparation erfasst auch Antikörper gegen CagA. Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 80%, die Spezifität bei 94,2%. Zum Nachweis der IgG Antikörper gegen das Membranprotein CagA wurde der Helicobacter p120 (CagA) ELISA der gleichen Firma verwendet. Die Sensitivität beträgt hier 94%, die Spezifität 96,2%.

2.3.3 Geräte

Zum Ablesen des ELISA Tests wurde der im serologischen Labor der Mikrobiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Benjamin Franklin befindliche ELISA- Reader „Tecan Spectra „ verwendet.

2.4 Methoden

2.4.1 Prinzip des ELISA

Mikrotiterplatten sind mit hochgereinigten Antigenen beschichtet und werden mit verdünntem Patientenserum inkubiert. Sind in dem Serum spezifische Antikörper vorhanden, so werden sie an die Antigene auf der Mikrotiterplatte gebunden. Nicht gebundenen Serumbestandteile werden durch Waschschrte entfernt. An die gebundenen spezifischen Antikörper wird im nächsten Schritt anti-human-IgG gebunden. Nach einem weiteren Waschschrte wird die Reaktion über eine Farbentwicklung sichtbar gemacht. Die Extinktion wird unmittelbar nach Zugabe einer Stopplösung im ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

Zur Auswertung der vom erhaltenen Werte erfolgte nachstehender Rechenweg:

- 1) Abzug des Plattenleerwertes von allen Bestimmungen, Leerwert soll $< 0,100$ OD (optic density) liegen
- 2) Semiquantitative Auswertung mit Hilfe eines Kalibrators. Der Antikörpergehalt des Kalibrators war jeweils auf dem Etikett des Kalibratorfläschens in Einheiten angegeben. Der Kalibrator muss eine OD > 0.600 aufweisen. Die Berechnung der Probe erfolgte durch folgende Formel:

$\text{Einheiten der Probe} = (\text{OD der Probe} / \text{OD des Kalibrators}) \times \text{Einheiten des Kalibrators}$
--

Die Einordnung der erhaltenen Werte geschah mittels folgender Tabelle:

< 5 Einheiten	negativ
5 – 7.5 Einheiten	grenzwertig
7.5 – 25 Einheiten	positiv
> 25 Einheiten	stark positiv

Zur Qualitätskontrolle wurden in jedem Test eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt. Der OD-Wert der negativen Kontrolle muss $< 0,100$, der der positiven Kontrolle $> 0,800$ sein.

2.4.2 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurde als Software das Statistik-Programm „SPSS“, Version 9.0 verwendet. Zur Anwendung kamen folgende statistische Tests: *Crosstabulation*, *Kruskal-Wallis Test*, *Mann-Whitney Test*,