

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen  
Abteilung Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie  
Leiter: Professor Dr. F. Fend

**Morphologische und molekularpathologische Befunde  
bei Parvovirus B19- und Humanem Herpesvirus vom  
Typ 6-assoziiertes Myokarditis.  
Eine Follow-up-Studie**

INAUGURAL – DISSERTATION  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Andrea Barbara Schwarzmaier  
aus  
Böblingen

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Bültmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Haasis

Meine Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Meinem Ehemann für die große Hilfe.

---

1	Einleitung .....	3
1.1	Parvovirus B19.....	5
1.1.1	Taxonomie und Biologie .....	5
1.1.2	Epidemiologie und Immunologie .....	9
1.1.3	Klinische Manifestationen .....	10
1.1.4	Myokarditis.....	14
1.2	Humanes Herpesvirus 6.....	16
1.2.1	Taxonomie und Biochemie .....	16
1.2.2	Epidemiologie und Immunologie .....	20
1.2.3	Klinische Manifestationen von HHV6 .....	21
1.3	Ziele der vorliegenden Arbeit .....	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Patientenkollektiv und Kontrollgruppe .....	27
2.2	Klinische Daten .....	29
2.3	Histologie und Immunhistologie .....	30
2.3.1	Konventionelle Standardfärbungen.....	31
2.3.2	Immunhistochemische Färbungen .....	32
2.4	Histologische und immunhistologische Klassifikation der Myokarditiden nach Dallas und ISFC.....	35
2.5	Molekularbiologische Techniken .....	36
2.5.1	Die Polymerasekettenreaktion .....	36
2.5.2	DNA-Sequenzierung .....	38
2.5.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	41
2.6	Datenerfassung.....	44
2.7	Klassifikation der Myokarditis nach Baughman.....	49
2.8	Typisierung der PVB19-Virusinfektion.....	49
2.9	Statistik .....	50
3	Ergebnisse: allgemeiner Teil.....	51
3.1	Charakterisierung des Patientengutes .....	51
3.2	Gruppeneinteilung.....	52
3.3	Altersverteilung .....	52
3.4	Geschlechterverteilung .....	53
4	Ergebnisse der Erstbiopsie .....	55
4.1	Molekularpathologische Daten bei der Erstbiopsie .....	55
4.1.1	Prävalenz von PVB19 und HHV6 bei Erstbiopsie .....	55
4.1.2	Die Sequenzierung der viralen Genome bei Erstbiopsie.....	56
4.1.3	Ergebnisse der quantitativen PCR.....	56
4.1.4	Ergebnisse der Blutuntersuchungen .....	57
4.2	Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bei der Erstbiopsie.....	57
4.2.1	Häufigkeit der morphologischen Diagnosen (Dallas-Kriterien und WHO/ISFC-Klassifikation) bei der Erstbiopsie: .....	58
4.2.2	Zuordnung der molekularpathologischen Befunde zu den morphologischen Diagnosen.....	61
4.2.3	Tabellen Erstbiopsie .....	63

4.2.4	Zuordnung weiterer molekularpathologischer und klinischer Befunde zu den einzelnen Gruppen: klinisch-pathologische Klassifizierung der Myokarditis.....	67
	Basierend auf den Ergebnissen der histologischen und PCR-Befunde wurden zusätzliche klinische und molekularpathologische Informationen den Gruppen einzeln zugeordnet. Folgende Parameter wurden berücksichtigt: .....	67
4.2.5	Gruppe 1 (PVB19+, HHV6-) Erstbiopsie n=28.....	68
4.2.6	Gruppe 2 (PVB19+, HHV6+): n=7.....	73
4.2.7	Gruppe 3 (PVB19-, HHV6+) n=6.....	76
4.2.8	Gruppe 4 (PVB19-, HHV6-) n=8 .....	79
5	Ergebnisse der konsekutiven Biopsien .....	82
	Die Ergebnisse aus den molekularpathologischen, histologischen und immunhistologischen Daten sind patienten- und gruppenorientiert in den Tabellen 10-13 zusammengefasst. ....	82
5.1	Molekularpathologische Daten bei den konsekutiven Biopsien.....	82
5.1.1	Prävalenz von PVB19 und HHV6 bei den konsekutiven Biopsien im Vergleich zur Erstbiopsie.....	82
5.1.2	Die Sequenzierung bei konsekutiven Biopsien .....	84
5.1.3	Tabellen konsekutive Biopsien.....	85
5.2	Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bei der konsekutiven Biopsie .....	89
5.2.1	Zuordnung der molekularpathologischen Befunde zu den morphologischen Diagnosen und klinischen Befunden der Konsekutivbiopsie .....	90
5.2.2	Gruppe 1 (PVB19+, HHV6-) n=28.....	92
5.2.3	Gruppe 2 (PVB19+, HHV6+) n=7.....	99
5.2.4	Gruppe 3 (PVB19-, HHV6+) n=6.....	103
5.2.5	Gruppe 4 (PVB19-, HHV6-) n=8 .....	106
6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	109
7	Diskussion.....	118
8	Schlussfolgerungen.....	124
9	Zusammenfassung.....	126
10	Literaturverzeichnis.....	129

# 1 Einleitung

Die Myokarditis ist nach der bisher gültigen Dallas-Klassifikation morphologisch definiert als ein entzündliches Infiltrat im Myokardium mit Nekrose und/oder Degeneration der angrenzenden Myozyten bei Ausschluss eines ischämischen Schadens durch eine koronararterielle Erkrankung (119). Diese histologische Einteilung der Myokarditiden unterscheidet in den Erstbiopsien zwischen aktiver und borderline Myokarditis, bei den konsekutiven Biopsien zwischen chronischer (ongoing), abheilender und abgeheilter Myokarditis.

Die Dallas-Klassifikation richtet sich ausschliesslich nach der Routinehistologie. Daher gab es zunehmend Kritik, weil in der Dallas-Klassifikation klinische, molekularbiologische und immunologische Parameter nicht betrachtet werden. Die Berücksichtigung der Immunhistologie, Molekulardiagnostik, quantitativen PCR (Bestimmung der Viruslast im Gewebe) und klinischen Präsentation lassen eine bessere Charakterisierung des entzündlichen Infiltrates und der Erkrankung zu.

Nach der bisher gültigen Klassifikation der World Health Organization und International Society and Federation of Cardiology (WHO/ISFC) von 1995 gehört eine Myokarditis zu den sekundären Kardiomyopathien. Ein neuer Vorschlag für die Einteilung der Kardiomyopathien wurde kürzlich erarbeitet, da in den letzten 10 Jahren viele genetische Untersuchungen durchgeführt wurden, die zu einer anderen Betrachtung der Pathogenese dieser Erkrankungen führte. Nach dieser erst kürzlich veröffentlichten Definition und Klassifikation der Kardiomyopathien der American Heart Association von 2006 gehört die Myokarditis jetzt zu den primär erworbenen Kardiomyopathien (73).

Um die Myokarditis auch klinisch besser charakterisieren zu können, wurde kürzlich von Baughman (8) eine neue klinisch-pathologische Klassifikation der Myokarditiden vorgeschlagen, bei der unter Berücksichtigung

immunhistologischer und molekularpathologischer Befunde die klinische Präsentation im Vordergrund steht. Er unterscheidet zwischen einer fulminanten, akuten und chronisch aktiven Myokarditis.

Die Mehrzahl aller Myokarditiden verläuft klinisch inapparent. Dies gilt besonders für virusinduzierte Myokarditiden, die nach dem Rückgang bakteriell verursachter Infektionskrankheiten den Hauptanteil aller Myokarditiden ausmachen (102). Einige Quellen sprechen davon, dass kardiotope Viren in über 50% der Patienten mit einer Myokarditis gefunden werden (15, 74). Die Virusätiologie war lange Zeit umstritten, da es mit Hilfe der üblichen virologischen Methoden selbst bei histologisch gesicherter Myokarditis nur in Einzelfällen gelang, einen positiven Virusnachweis zu führen. Erst durch die Einführung sensitiver und spezifischer molekularbiologischer Techniken ist es gelungen, geringe Mengen genomischer viraler RNA bzw. DNA im Myokard nachzuweisen (15, 102). Eine sichere und frühzeitige Diagnose der Myokarditis kann zweifelsfrei nur durch eine Endomyokardbiopsie (EMB) erfolgen, bei welcher die Möglichkeit besteht nach entzündlichen Infiltraten innerhalb des Myokards zu suchen (70, 119). Durch die kombinierte Anwendung molekularbiologischer, immunhistochemischer und routinehistologischer Untersuchungsmethoden, der sogenannten Trippeldiagnostik, wird heutzutage eine genaue Typisierung der Entzündungsreaktion und eine hohe Sensivität und Spezifität für den Erregernachweis erreicht. Somit ist es aus kardiopathologischer Sicht möglich geworden, in Zusammenarbeit mit der Klinik eine pathogenetisch bedeutsame Virusinfektion mit Entzündung von einer harmlosen myokardialen Viruspersistenz ohne Entzündung zu unterscheiden (44).

Obwohl zahlreiche kardiotope Viren als Erreger prinzipiell in Betracht kommen, stehen aufgrund epidemiologischer Untersuchungen Coxsackieviren der Gruppe B (RNA-Viren), Adenoviren und Herpesviren als auslösende Erreger an erster Stelle (15, 94, 102).

In den letzten Jahren gab es eine Vielzahl an Veröffentlichungen, die vor allem das Humane Parvovirus B19 (PVB19), aber auch das Humane Herpesvirus 6

(HHV6) als Auslöser einer Myokarditis beschreiben. Bekannt ist mittlerweile, dass PVB19 eine Myokarditis auslösen kann. HHV6 wurde in der Literatur bisher seltener als Kofaktor oder Hauptvirus von Myokarditiden erwähnt (19, 28, 44, 55, 61, 64, 97). Mahrholdt et al. zeigten in einer Arbeit 2006, dass bisher die Bedeutung von PVB19 und HHV6 unterschätzt wurde und sie die Hauptverursacher viraler Myokarditiden in Deutschland sind (69). PVB19 und HHV6 sind ubiquitäre Viren, die im Normalfall leichte Kinderkrankheiten hervorrufen können (2, 10, 18, 43). Im Folgenden werden beide Viren hinsichtlich ihrer Taxonomie, Epidemiologie, Pathogenität und klinischen Bedeutung vorgestellt.

## 1.1 Parvovirus B19

### 1.1.1 Taxonomie und Biologie

Parvovirus B19 wurde 1975 zufällig bei einem Hepatitis B -Screening von Yvonne Cossart et al. in Spenderblut entdeckt (10, 80)

Es ist das einzige bekannte humanpathogene Parvovirus. Das Virus ist unbehüllt und besteht aus linearer Einzelstrang-DNA mit einer Basenlänge von etwa 5600 und ist damit sehr klein (90, 4, 46, 80, 104). Es besitzt ein ikosaedrisches Kapsid von 18-26nm Durchmesser, bestehend aus zwei Strukturproteinen, VP1 und VP2, und einem nichtstrukturierten Protein NS1. VP1 ist 83 kDa<sup>a</sup> schwer und bildet etwa 5% des Kapsids. VP1 besitzt wichtige immunologische Funktionen und bindet neutralisierende Antikörper (82). VP2 hat ein Molekulargewicht von 53 kDa und bildet die restlichen 95% des Kapsids (90, 4, 46, 104). Es konnte nachgewiesen werden, dass VP2 inhibierend auf die Hämatopoese wirkt (87). NS1 hat ein Molekulargewicht von 77kDa. Es wirkt bei der Replikation des Virus mit und kann die Apoptose der Wirtszelle induzieren (58, 104).

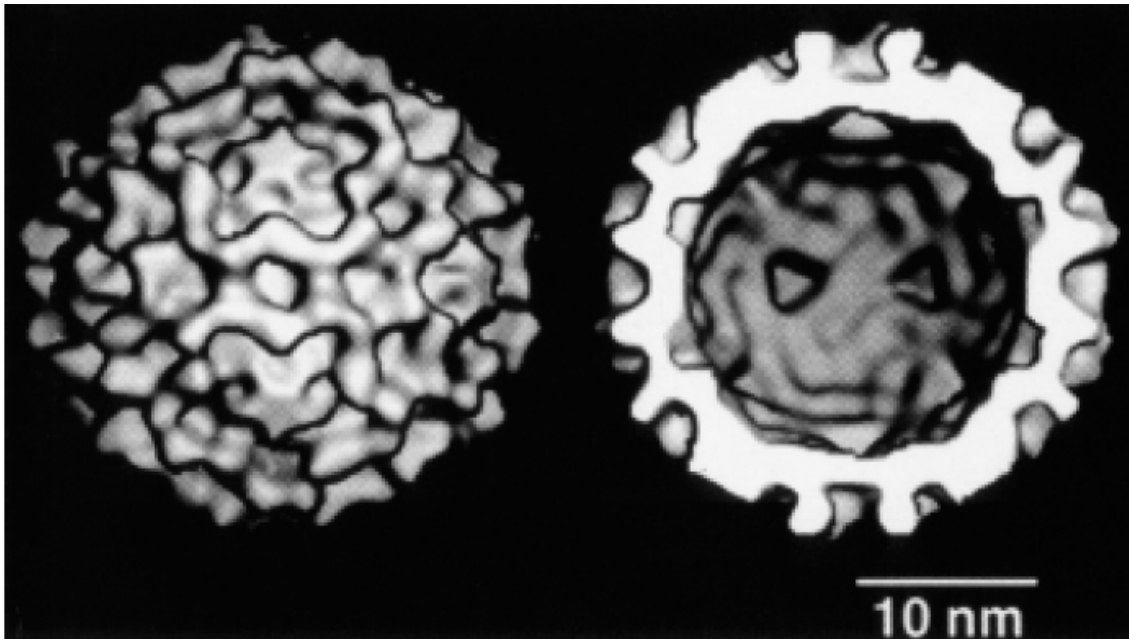
---

<sup>a</sup> Kilodalton



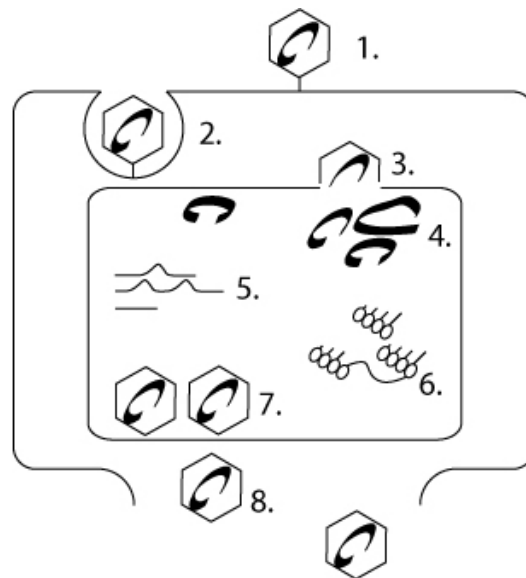
Der zelluläre Rezeptor für PVB19 ist das so genannte P-Antigen, ein Glykoprotein. Es befindet sich auf Zielzellen, vor allem in hoher Konzentration auf erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Daher stammt auch der synonyme Name PVB19-Genus Erythrovirus. Das P-Antigen ist aber auch in geringerer Konzentration auf Megakaryoblasten, Endothelzellen und Organen wie Leber, Lunge und Herz zu finden (3, 36, 4, 46, 53, 63, 101). Es wird vermutet, dass das PVB19-Virus, das normalerweise nur Erythrozyten-Vorläuferzellen befällt, vor allem im Verlauf von schweren Erkrankungen die oben genannten anderen Zelltypen befällt (81). Personen mit dem seltenen p-Phänotyp sind natürlicherweise resistent gegenüber PVB19-Virusinfektionen (4, 101). Bei Virusbefall erfolgt durch Virusreplikation im Zellkern und darauf folgender lytischer Reaktionen die Zellzerstörung (36, 90). Die Vermehrung in Endothelzellen kann die transplazentare Transmission, den Ausschlag und die Vaskulitis bei Erythema infectiosum erklären (4).

Die folgenden Bilder zeigen zum einen kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen und zum anderen den schematischen Lebenszyklus von PVB19.



**Abbildung 1: PVB19 kryoelektronenmikroskopische Aufnahme VP2-Kapside.  
Nach S. Modrow (80)**

**Links: Aufsicht auf die strukturierte Oberfläche des Partikels;  
Rechts: Querschnitt durch ein Partikel. Bei infektiösen Viren ist der  
Hohlraum mit Genom ausgefüllt, das aus einzelsträngiger DNA besteht.**



**Abbildung 2: Schematischer Lebenszyklus von PVB19. Modifiziert nach E. Heegard und K. Brown (36)**

1. Anheftung von PVP19 an den Rezeptor P-Antigen mit Hilfe des Korezeptors Alpha-5-Beta-Integrin
2. Endozytose des Virus
3. Aufnahme in den Zellkern
4. DNA-Replikation
5. RNA-Transkription von NS1-RNA und später von VP1/VP2-RNA
6. Translation viraler Proteine
7. Zusammensetzen des Virus
8. Zellyse und Virusfreisetzung

### 1.1.2 Epidemiologie und Immunologie

PVB19 ist weltweit verbreitet. In den entwickelten Ländern haben 2-10% der Kinder unter 5 Jahren eine Infektion durchgemacht. Personen über 20 Jahren zeigen in 40-60%, über 70-Jährige in über 85% Antikörper gegen PVB19 (36, 4, 80). Andere Quellen sprechen sogar von einer Durchseuchung bei Kleinkindern von bis zu 30%, bei über 70-Jährigen von über 90% (5, 10, 101, 113). Der Kontagionsindex liegt bei über 60% (4).

Infektionen häufen sich im gemäßigten Klima vor allem im späten Winter, Frühjahr und Frühsommer. Eine Epidemie der Erkrankungen ist alle drei bis fünf Jahre zu erkennen (10, 4). Frauen im gebärfähigen Alter weisen eine durchschnittliche jährliche Serokonversionsrate von 1,5% auf (10, 36).

PVB19 kann im Sekret des Nasopharyngealtraktes während einer Viruserkrankung nachgewiesen werden. Ebenso lässt sich PVB19 im Blut feststellen. Die Übertragung des Virus erfolgt per Tröpfcheninfektion oder Speichelkontakt, über Blut, Blutprodukte oder transplazentar (10, 36, 4, 42).

Die Mehrzahl der PVB 19-Virusinfektionen verläuft klinisch asymptomatisch. (4, 99). Etwa fünf bis sechs Tage nach Inokulation kann das Virus im Blut nachgewiesen werden. Die Infektion führt rasch zu einer Retikulozytopenie und nach vier bis acht Tagen zu einer Minderung der Produktion roter

Blutkörperchen (10, 63). Der Höhepunkt der Viruslast ist etwa an den Tagen acht bis neun. Der Nachweis von spezifischem IgM kann etwa 10 bis 14 Tage nach Infektion erfolgen. Es ist für etwa drei Monate nachweisbar. Das Auftreten von PVB19-spezifischen IgG-Antikörpern erfolgt ebenfalls etwa zwei Wochen nach Infektion. IgG bleibt lebenslang im Blut und weist auf eine durchgemachte PVB19-Infektion und bestehende Immunität hin (10, 36). Die frühe

Antikörperantwort ist gegen das Hauptkapsidprotein VP2 gerichtet. Nach einiger Zeit der Immunantwort überwiegt jedoch die Aktivität gegen VP1. Diese Immunantwort gegen VP1 verursacht die andauernd schützende Immunität (10,

82). Typischerweise verfügen Patienten mit persistierender PVB19-Infektion über Antikörper gegen VP2, jedoch nicht gegen VP1 (10).

Bei der Mehrzahl der immunkompetenten Patienten wird das Virus innerhalb weniger Wochen eliminiert. Bei etwa 20% kann jedoch auch nach Monaten oder Jahren Virus-DNA im Blut, Herz oder Synovialgewebe nachgewiesen werden. Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann teilweise über Monate oder Jahre zirkulierende PVB19-DNA bei persistierenden oder chronischen Erkrankungen nachgewiesen werden (4,10, 34, 122).

### **1.1.3 Klinische Manifestationen**

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von PVB19 als Auslöser einer Vielzahl an Erkrankungen entdeckt. Gewöhnlich verursacht PVB19 bei Kindern als Erstinfektion einen Hautausschlag, die Ringelröteln, auch Erythema infectiosum oder Fifth disease genannt (10, 43, 53, 99). Erwachsene erkranken vielfach in Form eines grippalen Infektes ohne Exanthem. Vereinzelt wurden bei infizierten Erwachsenen Hauterscheinungen beschrieben, die papular-purpuric „gloves and socks“ syndroms genannt werden (34, 43, 53). Daneben findet man andere Krankheitsbilder, wie Arthralgien und Polyarthritiden vor allem bei Frauen (10, 46, 53, 113), akute und chronische Anämien (3, 10, 12, 113), aplastische Krisen bei Patienten mit hämatologischen Störungen (10, 67, 81, 99, 104, 121), Hepatitiden vor allem bei Kindern (46, 53, 81) oder Hydrops fetalis bei der Infektion von schwangeren Frauen (10, 81, 99, 121). In seltenen Fällen kommt es nach PVB19-Infektion zu Erkrankungen mit Vaskulitiden (10, 12, 4), Myokarditiden (10, 12, 28, 46) oder neurologischen Störungen und Enzephalitiden (7, 10). Es scheint wahrscheinlich, dass PVB19, das normalerweise nur Erythrozytenvorläuferzellen befällt, vor allem im Verlauf schwerer Erkrankungen, bei primären oder sekundären Immunschwächen, auch andere Zelltypen befällt, deren infektiionsbedingte Zerstörung mit der Symptomatik verbunden ist (81). Besonders nach Organtransplantationen

können Infektionen mit PVB19 zu Abstoßungsreaktionen führen (28, 101). Beim Fetus sind im wesentlichen die Leber als Erythrozytenproduktionsstelle und das Herz mit seinen fetalen Myokardzellen, die das P-Antigen exprimieren, befallen. Dies kann unbehandelt zu fetaler Anämie, Herzversagen und schließlich einem Hydrops fetalis und dem Tod des Fetus in utero oder kurz nach der Geburt führen (34, 36, 4, 42, 43, 53, 81, 104, 121).

### **1.1.3.1 Erythema infectiosum**

Erythema infectiosum, auch Ringelröteln oder Fifth disease genannt, ist die häufigste Manifestation einer PVB19-Infektion bei Kindern (10, 36). Als Differentialdiagnosen sollten Röteln, Scharlach oder allergische Reaktionen in Betracht gezogen werden (4, 43). Ein Zusammenhang zwischen PVB19 und Erythema infectiosum wurde 1983 von Anderson et al. entdeckt, als in Blutproben erkrankter Patienten spezifisches IgM gefunden wurde. Die Erkrankung an sich war schon vor dieser Entdeckung bekannt, allerdings wurde erst jetzt klar, dass PVB19 der einzige Erreger davon ist (36).

Vorzeitige Anzeichen der Erkrankung werden oft nicht erkannt. Selten können prodormale, grippale Symptome auftreten, wie Fieber, Kopfschmerzen und Schwindel (10, 36, 43). Etwa 18 Tage nach der Infektion beginnt sich das charakteristische, schmetterlingsförmige Gesichtserythem zu zeigen. Es ist eine diffuse oder figurierte, livide Rötung und umfasst symmetrisch die Wangen. Typischerweise ist die Mundregion ausgespart. Im zweiten Stadium, nach ein bis vier Tagen, breitet sich ein Ausschlag auf dem Rumpf und den Extremitäten aus (10, 36, 43). Der Ausschlag ist netzartig mit roten Makulae, die nach Konfluenz girlandenartige Plaques bilden (36, 42). Im dritten Stadium kann das Erythem ganz verschwinden oder öfters wiederkehren. Die Intensität des Ausschlages ändert sich häufig. Dieses Stadium kann mehrere Wochen anhalten (10, 36). Weiter Symptome bei Erythema infectiosum können Juckreiz, Blasenbildung und schuppige Dermatitis sein (36).

### **1.1.3.2 Arthropathie**

1985 wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen PVB19 und dem Auftreten von Arthropathien festgestellt. Bei Kindern mit Erythema infectiosum war die Inzidenz einer Arthralgie etwa 10%, wobei Kinder mit einer kürzlich ausgebrochenen Arthritis in 19% der Fälle eine Infektion mit PVB19 hatten. Bei Erwachsenen sind Arthralgien und Arthritis die häufigsten Manifestationen einer PVB19-Infektion (36). 60% der Frauen und 30% der Männer sind hiervon betroffen. Die im vorigen Abschnitt beschriebene dermale Ausprägung erscheint hier seltener und uncharakteristisch. Die Arthropathien sind vermutlich immunologischen Ursprungs, da das Auftreten der Beschwerden mit dem Auftreten von Antikörpern zusammenfällt. Die Symptome sind eine akute, mittelschwere Polyarthritits ohne Destruktion, betreffend unter anderem die metacarpophalangealen Gelenke (75%), die Knie (65%), die Handgelenke (55%) und die Sprunggelenke (40%). Die Gelenke sind schmerzhaft, oft geschwollen und versteift. Meist erkranken die Gelenke symmetrisch. Die Symptome halten etwa ein bis zwei Wochen an. In Einzelfällen, vor allem bei Frauen, kann die Arthropathie oder Arthritis Monate oder sogar Jahre persistieren (10). Eine PVB19-Infektion kann bei bereits bestehender rheumatoiden Arthritis der Trigger eines akuten Schubes sein (83).

### **1.1.3.3 Transiente aplastische Krise**

Die transiente aplastische Krise war die erste Erkrankung, die mit PVB19 in Verbindung gebracht wurde (36). Es handelt sich dabei um eine kurze, selbstlimitierende Anämie der roten Blutkörperchen mit Retikulozytopenie und wurde bei Patienten mit hämolytischer Anämie beschrieben (10, 36, 4). Eine Woche post infectionem fällt eine Virämie auf, die die erythropoetischen Vorläuferzellen befällt. In der zweiten Wochen nach Infektion mit PVB19, kommt es zu einer Retikulozytopenie, die zur Folge hat, dass der Hämoglobinspiegel rapide abfällt. Nach etwa 30 Tagen erreicht der Hämoglobinspiegel wieder seinen Ausgangswert. Jeder Patient mit einer eingeschränkten

Blutkörperchenproduktion oder einem erhöhten Abbau oder Verlust, kann durch eine PVB19-Infektion eine aplastische Krise entwickeln (36, 4).

Obwohl in erster Linie die Erythrozyten bei dieser Erkrankung betroffen sind und typischerweise eine Anämie der roten Blutkörperchen auftritt, kann unregelmäßig auch eine Thrombozytopenie, Neutropenie oder Panzytopenie entdeckt werden. Dies lässt sich durch einen zytotoxischen Effekt erklären (10, 36). Die Anämie kann letal verlaufen, wo hingegen die aplastische Krise selber normalerweise nach etwa 2 Wochen selbstständig ausheilt. Bei Personen mit einer Prädisposition sind etwa 70 bis 80% der aplastischen Episoden auf eine PVB19-Infektion zurückzuführen. Aplastische Krisen gehen normalerweise mit Blässe, Müdigkeit und Lethargie einher. Die Patienten sind hoch-viral ansteckend und stellen damit ein Risiko für andere Personen dar. Nach überstandener Erkrankung besteht eine lebenslange Immunität (10, 36). In seltenen Fällen kann die Infektion persistieren, was eine chronische Anämie zur Folge hat.

#### **1.1.3.4 Hydrops fetalis**

Eine Infektion mit PVB19 während der Schwangerschaft kann bei nicht-immunen Schwangeren zu Fehlgeburten, Fruchttod oder Hydrops fetalis führen (10, 4, 42). Die Pathogenese des Hydrops fetalis scheint gleich wie bei Patienten mit transientser aplastischer Krise zu sein, bei welcher die Erythrozyten eine verkürzte Lebensdauer aufweisen (36). Beim Fetus ist im wesentlichen die Leber und das Herz befallen (4). Die intrauterine Infektion ist gekennzeichnet durch eine schwere Anämie, Herzinsuffizienz, massiven Ödemen und dem intrauterinen Tod (36, 4, 42).

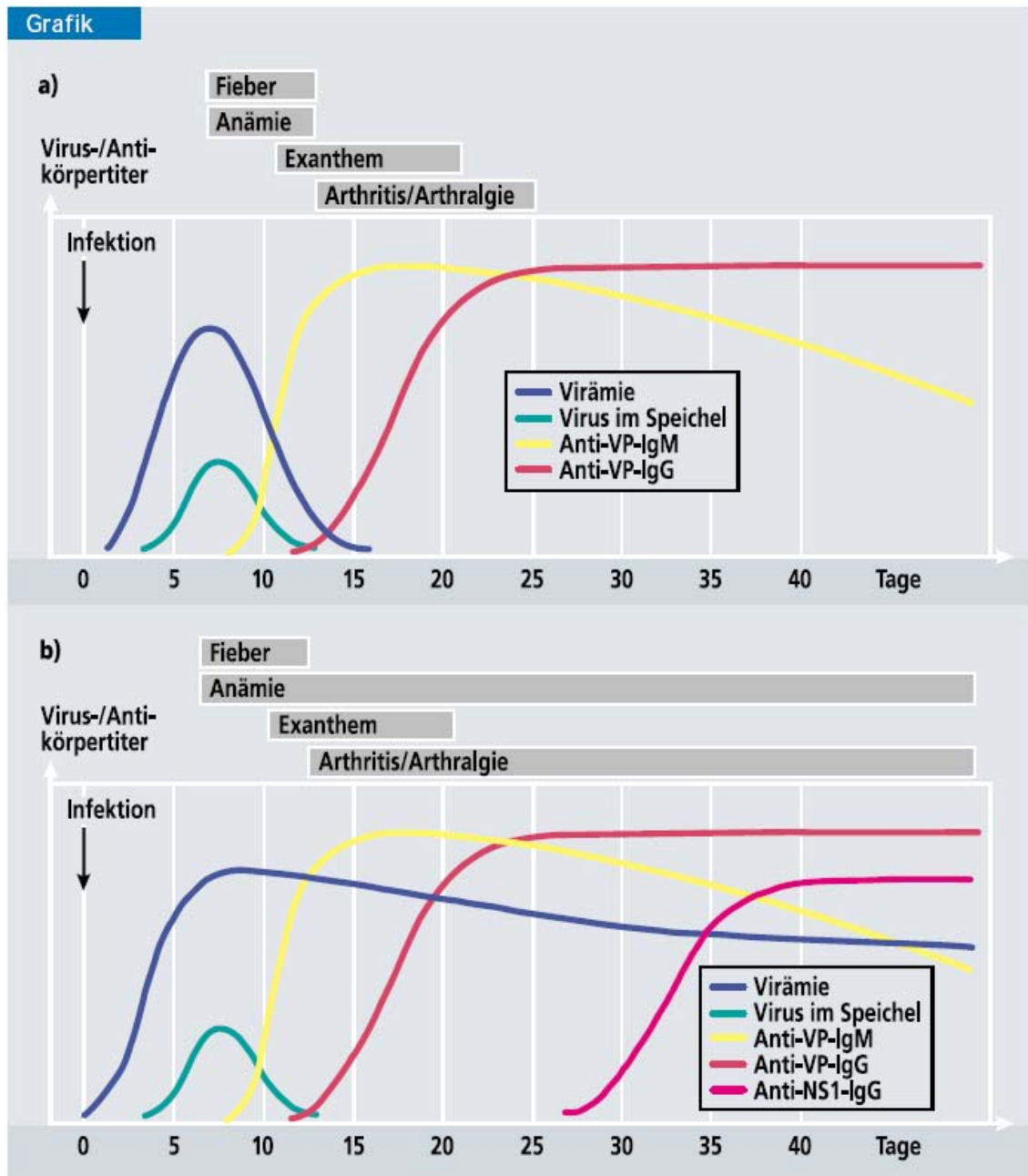
Die Inzidenz einer PVB19-Erstinfektion während der Schwangerschaft wird zwischen 1 und 5% angegeben. Die spätere transplazentare Transmission liegt bei 24 bis 33%. Die Zahlen für die Höhe des Risikos eines Hydrops fetalis durch eine PVB19-Infektion liegt etwa zwischen 1 bis 1,6% (36, 42) andere Quellen sprechen von 5 bis 15% (10, 42). Die Abweichungen sind dadurch zu erklären, dass die niedrigen Werte in Zeiten mit endemischen PVB19-Infektionen, die



hohen Werte in Zeiten epidemischer PVB19-Erkrankungen erfasst wurden (42). Dennoch ist das Risiko bei einer erstinfizierten Schwangeren bei 5 bis 10% während der Schwangerschaft Schwierigkeiten zu bekommen (36). Ein Hydrops fetalis nichtimmuner Herkunft ist selten (1 in 3000 Schwangerschaften). In 20 bis 50% der Fälle sind die Ursachen dafür jedoch unklar. PVB19 ist in etwa 15 bis 20% der Fälle die Ursache für einen Hydrops fetalis mit nichtimmuner Ursache (36).

#### **1.1.4 Myokarditis**

Enders et al. berichteten 1998, dass PVB19 in der Lage ist ernsthafte Myokarditiden bei immunkompetenten Personen hervorzurufen, was zuvor nur bei Kindern oder immunsupprimierten Erwachsenen beobachtet wurde (28). Molekularpathologisch infiziert PVB19 nicht die Myozyten direkt, wie beim Fetus. PVB19 befällt die intramyokardialen Endothelzellen, auf welchen sich das P-Rezeptorprotein befindet. Es folgt eine intravaskuläre Akkumulation, Adhäsion und Penetration der Entzündungszellen. Es resultiert eine endotheliale Dysfunktion und Beeinträchtigung der Mikrozirkulation mit einer sekundären Myozytennekrose, die sich in der akuten Phase klinisch wie ein Herzinfarkt darstellen kann (55, 56, 61). Der Mechanismus der Myokardschädigung bei einer PVB19-Myokarditis ist nicht vollkommen geklärt. Neuere Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass die Zytokine Interferon-Gamma, Tumornekrose-Faktor-Alpha und Interleukin-6 und -8, die in hoher Konzentration bei PVB19-assoziierten Myokarditiden bei Kindern gefunden wurden, zu einer myokardialen Zerstörung und Entzündung zusätzlich zur Dysfunktion der Mikrozirkulation führen können (55, 56). Bei Herztransplantierten fällt ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit PVB19 und der Abstoßung des Transplantates auf (36, 61, 94, 101). Kühl et al. konnte zeigen, dass bei 50% der Patienten mit myokardialen Auffälligkeiten PVB19-Genome nachweisbar waren (61). Erwähnenswert ist, dass der canine Parvovirus bei jungen Hunden als Auslöser fulminanter Myokarditiden bekannt ist (101).



**Abbildung 3: Virusvermehrung, Antikörperbildung und Symptome im Verlauf der Parvovirus-B19-Infektion; a) akute Infektion; b) persistierende Infektion. Nach S. Modrow (80)**

## 1.2 Humanes Herpesvirus 6

### 1.2.1 Taxonomie und Biochemie

Das humane Herpesvirus wurde 1986 durch Salahuddin et al. in Interleukin-2-stimulierten mononuklearen Zellen im Blut von AIDS-Patienten isoliert (1, 2, 31).

Es ist das kleinste der acht bekannten humanen Herpesviren, zu denen unter anderem Herpes simplex Virus 1 und 2 (HSV), Varizella Zoster Virus (VZV), Cytomegalievirus (CMV) und Epstein-Barr-Virus (EBV) gehören.

Kreuzreaktionen zwischen HHV6 und CMV oder HHV7 kommen vor. HHV6 gehört mit HHV7 zur Unterfamilie der Betaherpesviren, Genus Roseolavirus (1, 9). Das Virus ist 160-200nm im Durchmesser, ist etwa 167 kbp lang und hat, wie alle Herpesviren, einen zentralen Kern mit Virus-DNA, ein 90-110nm großes behülltes ikosaedrisches Kapsid und eine Außenmembran mit Glykoproteinen und Membranproteinen (1, 2, 9, 17, 23, 24). HHV6 besitzt eine lineare Doppelstrang-DNA mit einem Informationsgehalt von 160-162 kB<sup>b</sup>. Es gibt zwei eng verwandte HHV6-Varianten HHV6A und HHV6B. Die Varianten A und B unterscheiden sich, trotz bis zu 99%-iger Übereinstimmung im Genom, hinsichtlich ihrer biologischen, immunologischen und molekularen Charakteristika. Daher sind sie unter anderem durch monoklonale Antikörper oder PCR zu differenzieren (1, 2, 9, 17, 106).

HHV6 befällt bevorzugt CD4<sup>c</sup>+ T-Lymphozyten aber infiziert auch andere Zellen epithelialen, fibroblastischen oder neuronalen Ursprungs mit unterschiedlicher Effizienz (1, 18, 23, 24). Der Oberflächenmarker CD46, der von allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird, agiert dabei als Rezeptor für die Infektion mit HHV6 (1, 18, 24). HHV6 ist in der Lage mit seinem Protein pU83, einem funktionellen Chemokin, CCR2-exprimierende Zellen wie Monozyten und

---

<sup>b</sup> Kilobasen

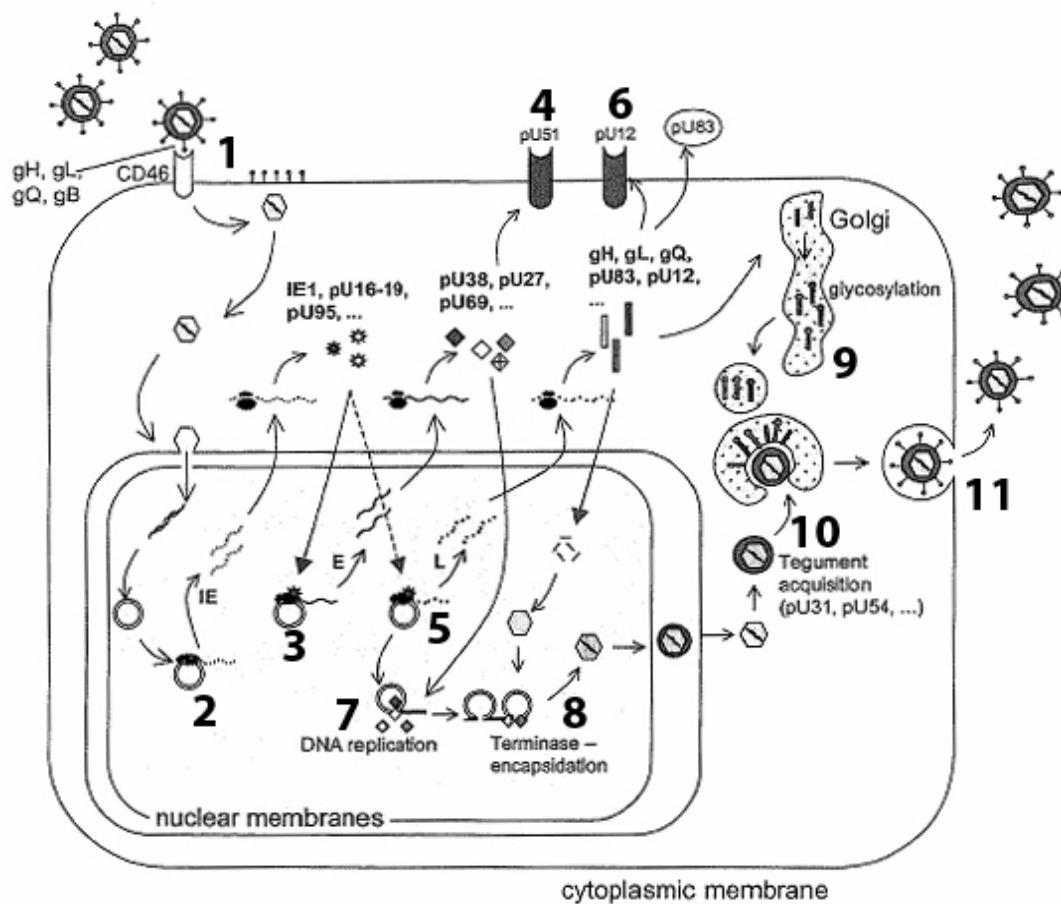
<sup>c</sup> Cluster of differentiation bzw. cluster determination

Makrophagen zu aktivieren und an Orte, an denen die Virusreplikation stattfindet zu locken (106). Es kommt dadurch zur Vermehrung von HHV6 und zu einer Streuung des Virus im gesamten Körper. Das Protein pU51 hat strukturelle Merkmale eines Beta-Chemokin-Rezeptors, genauso wie das Protein pU12. Beta-Chemokine sind wichtige Vermittler der Immunantwort. pU12 und pU51 können in Zellmembranen bestimmter Zellen integriert werden, die Ausschüttung zellulärer Chemokine dysregulieren und die Infektion vorantreiben (17, 106). pU51 und pU12 veranlassen anscheinend Zellen eine große Menge des CC-Chemokins RANTES auszuschütten. RANTES ist ein proinflammatorisches Chemokin, das Signale für die lokale Antwort der inflammatorischen Zellen zur Verfügung stellt und dadurch zirkulierende Monozyten und Lymphozyten selektiv anlockt (18).

HHV6 ist in der Lage die Funktion der T-Lymphozyten zu unterdrücken und dadurch die Immunabwehr zu schwächen. Dies zeigt sich durch eine verminderte Interleukin-2-Synthese und Zellproliferation (29).

HHV6 beschleunigt die Zerstörung von Zellen, die durch andere lytische Viren, wie z.B. HIV, infiziert sind. Eine HHV6-Infektion kann auch nach Jahren unter anderem durch Abwehrschwächen oder umweltbedingte Faktoren reaktiviert werden (115).

Ein Hauptmerkmal von HHV6 ist den Wirt zu infizieren und anschließend in einer latenten oder persistierenden Form in den Zellen des Immunsystems zu überleben. Das pathogene Potential von HHV6 erschließt sich dadurch, dass es in der Lage ist, die Kontrollmechanismen des Immunsystems zu umgehen (17). Das folgende Schaubild zeigt den Replikationszyklus von HHV6.



**Abbildung 4: Lytischer Replikationszyklus von HHV6. Nach L. De Bolle (23)**

1. Rezeptor: CD46-Oberflächenantigen und virale Glykoproteine: gH, gL, gQ, gB: Beteiligt an Virusadsorption und Fusion mit der Zellmembran.
2. Sehr frühe Transkription (IE): IE-Proteine zur Kontrolle der zeitlichen Abfolge der Replikationsprozesse.
3. Frühe Transkription (E).

- 
4. Funktioneller Chemokin-Rezeptor: pU51.
  5. Späte Transkription (L).
  6. Funktioneller Chemokin-Rezeptor: pU12.
  7. Für HHV6 spezielles funktionelles Chemokin: pU83.
  8. DNA-Replikation
  9. Beladung des Kapsids mit DNA und viralen Enzymen.
  10. Glykolisierung viraler Proteine und Freisetzung in Vesikeln am Golgi-Apparat.
  11. Tegumentaquisition und Beladen mit viralen Glykoproteinen.
  12. Virusfreisetzung und Zellyse.

### 1.2.2 Epidemiologie und Immunologie

HHV6 kommt ubiquitär vor. Es wird davon ausgegangen, dass es in der Bevölkerung eine Seroprävalenz von 95%-100% gibt (1, 9, 17, 23, 114, 118). 90% der Kinder weltweit erkranken während des Kleinkindalters durch HHV6. Der Antikörpertiter bei Neugeborenen ist sehr hoch, fällt zwischen dem dritten bis neunten Monat postnatal und steigt kurz danach wieder an. Bis zum Alter von 60 Jahren bleibt der Antikörpertiter hoch und fällt dann wieder ab (17). Neugeborene scheinen durch die diaplazentare Übertragung von HHV6-Antikörpern der Mutter in den ersten Lebensmonaten geschützt zu sein. Es wird angenommen, dass 50-60% der Kinder in den ersten 12 Monaten, und fast alle im Alter von 2-3 Jahren mit HHV6 infiziert sind (1, 9, 17). Die meisten HHV6-Infektionen sind mit der Variante B. Infektionen mit HHV6A sind unter gesunden Kindern sehr selten, allerdings bei Erwachsenen häufiger zu finden (1, 25). Beide Varianten sind opportunistische Erreger bei immuninkompetenten Patienten, wie AIDS-Patienten oder organtransplantierten Patienten (17, 40). Nach der Erstinfektion überdauert HHV6 latent in Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten und persistiert in den Speicheldrüsen, dem lymphatischen Gewebe der Tonsillen, dem Gehirn und den Nieren (1, 17). HHV6 wurde in Gewebeproben aus Speicheldrüsen entdeckt, die ein Reservoir für HHV6 darstellen. Es wird häufig von der Mutter an das Kind über den Speichel übertragen (1, 9, 17, 23). Einzelfälle berichten von einer intrauterinen oder perinatalen Transmission von HHV6 von der Mutter auf das Kind (9, 23). HHV6 kann jedoch auch nosokomial via Bluttransfusionen oder Organtransplantationen übertragen werden (1).

### 1.2.3 Klinische Manifestationen von HHV6

Mit der Variante A lassen sich kein Zeitpunkt der Primärinfektion und auch keine Erkrankung eindeutig assoziieren (17, 25, 40).

3 Phasen einer HHV6-Infektion lassen sich unterscheiden:

Die erste Phase ist die Primärinfektion von HHV6B im Kindesalter, die zu Exanthem subitum führt, auch Roseola infantum, Dreitage-Fieber oder Sechste Krankheit genannt. Es heilt im Allgemeinen selbständig aus (1, 9, 29, 31)

Die zweite Phase tritt bei gesunden Kindern oder Erwachsenen auf. Das Virus repliziert sich in den Speicheldrüsen und wird über den Speichel ausgeschieden. Dabei kommt es im Allgemeinen zu keiner offensichtlichen Erkrankung. Das Virus bleibt latent in den Lymphozyten und Monozyten und persistiert in verschiedenen Organen und Geweben, möglicherweise mit einer geringen Replikationsrate (17).

Die dritte Phase tritt nur bei immuninkompetenten Patienten, wie Krebspatienten während einer Chemotherapie, organtransplantierten Patienten oder HIV-positive Patienten auf. Es kann bei diesen Patienten zu einer Reaktivierung der latenten HHV6-Infektion oder Reinfektion kommen, was zu verschiedenen klinischen Symptomen führen kann (17). Die Inzidenz bei transplantierten Patienten schwankt je nach Organ zwischen 48% und 62% laut Abdel-Haq et al. (2004). Laut Gentile (2000) schwankt der Wert zwischen 24%-66%. Eine Korrelation mit Transplantatabstoßungen und erschwerter Transplantateinheilung ist vorhanden (1, 9, 31). Die klinischen Symptome beinhalten bei immuninkompetenten Patienten unter anderem hohes Fieber mit Leukopenie, Hautausschlag, Pneumonitis, Erkrankung des Knochenmarks und Encephalitis (1, 106, 118). Interaktionen von HHV6 mit HHV7 oder CMV kommen häufig vor (1, 26, 106).

Bei AIDS-Patienten wurde HHV6 in verschiedenen Organen nachgewiesen (1, 9, 26, 106) Lusso et al. vermutete 1989 HHV6 als Kofaktor bei AIDS, da HHV6 genauso wie HIV-1 CD4+ Lymphozyten befallen kann, was in einem verstärkten zytopathischen Effekt münden kann (19, 106).



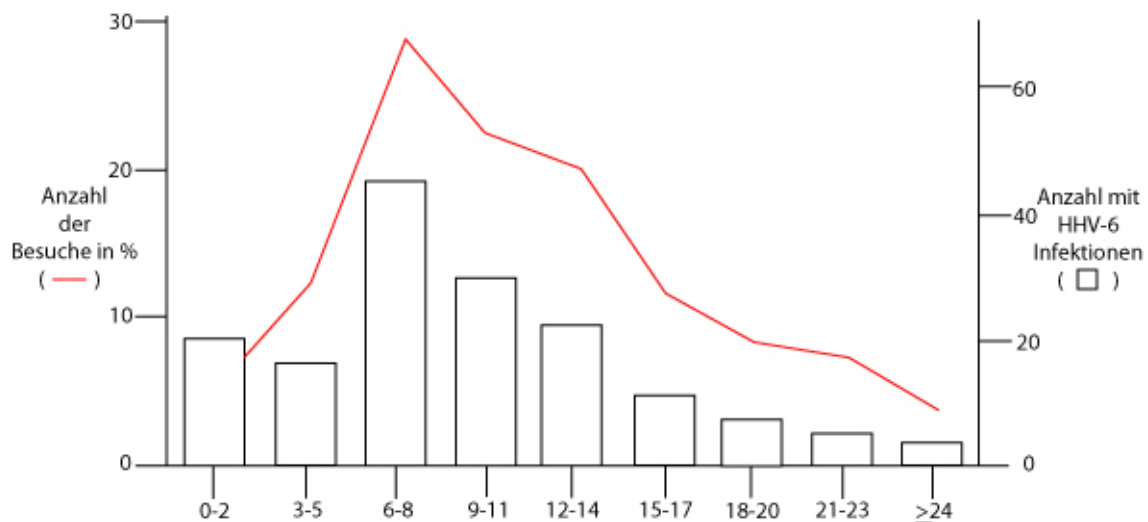
HHV6 wird als Kofaktor bei Multipler Sklerose vermutet, da das Virus myelinproduzierende Zellen zerstören kann (1, 9, 24, 26, 118). Der Antikörpertiter im Plasma bei MS-Patienten ist gegenüber Gesunden stark erhöht (9, 19). Abdeq-Haq spricht von 73% gegenüber 18%. HHV6 wurde mittels PCR in über 70% der Gehirne von MS-Patienten gefunden, was mit einer Erhöhung an HHV6 im zentralen Nervensystem dieser Patienten einhergeht. Zum Grossteil handelte es sich dabei um HHV6B (9).

Das chronische Erschöpfungssyndrom (CFS) wird ebenfalls mit HHV6 in Zusammenhang gebracht. Neben CMV und EBV wird HHV6 als Erreger diskutiert. Mit großer Wahrscheinlichkeit war HHV6 die Ursache für eine CFS-Epidemie am Lake Tahoe 1984 in den USA. Bei CFS-Patienten werden in einem Teil der Fälle erhöhte Antikörpertiter gegen HHV6 gefunden, was für eine phasenweise Reaktivierung bei diesen Patienten sprechen könnte (34, 115, 114, 118).

HHV6 wird als ein möglicher Auslöser von malignen Tumoren betrachtet, wie Hodgkin-Krankheit, Non-Hodgkin-Lymphom, akute lymphatische Leukämie, Mundhöhlenkarzinom oder Zervixkarzinom. In vitro Studien haben neoplastische Transformationen durch HHV6-DNA nachgewiesen, allerdings wurde in vivo noch kein eindeutiger Nachweis einer Korrelation zwischen HHV6 und Neoplasien nachgewiesen (1, 9).

Das papular-purpuric „gloves and socks“-syndrom wird nicht nur mit PVB19, sondern auch mit HHV6 in Zusammenhang gebracht. Es ist eine Erkrankung mit einem Ausschlag auf den Akren (1).

Das folgende Schaubild zeigt die Anzahl der Kinder, die in die Notaufnahme eines Krankenhauses eingeliefert wurden mit Erkrankungen, die auf primäre HHV6-Infektionen zurückzuführen sind (Balken) im Vergleich zu dem Durchschnitt aller Besuche von Kindern wegen akuter, fieberhafter Infekte (Kurve). Die Werte wurden dem Alter zugeordnet.



**Abbildung 5: Anzahl der Kinder mit HHV6-Infektionen im Vergleich zu allen fieberhaften Infektionen. Nachbau nach D. Braun (9)**

### 1.2.3.1 Exanthema subitum

Exanthema subitum, auch Dreitagefieber oder Sechste Krankheit genannt, ist eine seltene Erkrankung bei Kleinkindern zwischen 6 Monaten und 4 Jahren. Nach dreitägigem hohem Fieber tritt ein nur ein bis zwei Tage dauerndes Exanthem auf. Es ist eine weltweit vorkommende Erkrankung mit einer geringen Kontagiosität (1, 9, 17, 26, 43). Erst 1988 wurde von Yamanishi ein Zusammenhang zwischen HHV6 und dieser Erkrankung festgestellt (1, 23). Nach einer Inkubationszeit von 5-15 Tagen kommt es zu einem plötzlichen Fieberanstieg auf 40°C ohne wesentliche Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Nach 3 Tagen kommt es zu einem Temperaturabfall, und 3-5 mm große, rötelnähnliche Makulae treten zuerst am Rumpf und dann an den Extremitäten auf. Das Gesicht bleibt dabei ausgespart. Nach ein bis zwei Tagen ist das Exanthem abgeklungen (9, 43). Als Differentialdiagnosen müssen Röteln, Masern, Scharlach, Erythema infectiosum und Enterovirusinfektionen in Betracht gezogen werden (43).

Die Erkrankung verläuft im Allgemeinen komplikationslos. Es kann jedoch besonders im Alter zwischen 12 und 15 Monaten während der Erkrankung zu Fieberkrämpfen kommen, die im Einzelfall auch letal verlaufen können. Andere, sehr seltene Komplikationen sind thrombozytopenische Purpurae, fulminante Hepatitiden mit Leberversagen und tödliche Myokarditiden (1, 17). Zusätzliche Komplikationen können Otitis, gastrointestinale Verstimmungen, Erbrechen, Husten und das emphagozytische Syndrom sein (17, 23). HHV6 steht im Verdacht das zentrale Nervensystem zu infiltrieren und Krampfanfälle zu verursachen (1, 9, 17, 23, 106).

Etwa 20% der HHV6-Ersterkrankungen verlaufen symptomlos (9, 17).

Bei Erwachsenen kann eine HHV6-Infektion eine Lymphadenopathie und infektiöse mononukleose-ähnliche Krankheit hervorrufen. Jedoch sind sich die Autoren nicht einig, ob es sich dabei um eine Erstinfektion oder eine Reaktivierung von HHV6 handelt (1, 9).

### **1.2.3.2 Meningitis und Enzephalitis**

Einige Studien lassen vermuten, dass HHV6 Meningitis und Enzephalitis verursachen kann. Es ist allerdings schwierig diese Studien zu interpretieren, da HHV6 ubiquitär vorkommt und einen weit verbreiteten Gewebe-Tropismus inklusive des Gehirns zeigt. In vitro wurde eine Empfindlichkeit von Gliazellen auf HHV6 festgestellt (1).

### **1.2.3.3 Myokarditis**

Deutlich seltener als PVB19 wird der 1986 entdeckte Humane Herpesvirus 6 (HHV6) als Verursacher oder Kofaktor myokardialer Infekte beschrieben. Nur wenige Quellen sprechen von einer kardialen Manifestation von HHV6-Infektionen (1, 120). Nach Caruso et al. ist HHV6 in der Lage Aorta- und Herzendothel zu befallen (18, 19). Daneben kann das Endothel als Reservoir für HHV6 fungieren (19). Sehr vereinzelt gibt es Fallbeschreibungen von Myokarditiden, die auf eine HHV6-Infektion zurückzuführen sind (96, 97, 120). Die erste Fallbeschreibung, die auf eine HHV6-assoziierte tödliche

Myokarditis bei einem 13 Monate alten Kind hinweist, wurde 1992 von Prezioso et al. veröffentlicht (96). Lediglich ein weiterer Fall eines 5 Monate alten Kindes, das eindeutig an einer tödlich verlaufenen HHV6-assoziierten Myokarditis erkrankt war, wurde 2001 veröffentlicht (120). Von einer tödlichen Myokarditis durch eine Koinfektion von HHV6 mit PVB19 wurde 2001 von Rohayem et al. berichtet (97). Allen Fällen ist der fulminante Krankheitsverlauf, mit einem häufig letalen Ende, gemeinsam.

### **1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Bisherige Studien haben lediglich ermittelt, ob PVB19 und/oder HHV6 in Endomyokardbiopsien bei Patienten mit Verdacht auf Myokarditis vorkommen (Bestimmung der Prävalenz). Mittlerweile ist eine kardiopathogene Virulenz von PVB19 nachgewiesen (10, 13, 4, 61, 64, 67, 101). HHV6 wurde bisher nur im Einzelfall als Auslöser von Myokarditiden erwähnt (96, 97, 120). Die pathogenetische Bedeutung dieses Virus ist noch nicht vollkommen geklärt (1, 9, 26).

Bisher wurde noch keine Studie veröffentlicht, die den klinischen Krankheitsverlauf myokardialer Erkrankung bei PVB19- und/oder HHV6-Infektionen konsequent verfolgt hat. Insbesondere liegen keine Untersuchungen über die morphologischen, histologischen und molekularpathologischen Befunde in konsekutiven Endomyokardbiopsien vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, aus einem großen Patientenkollektiv die Patienten zu verfolgen, die konsekutiven Endomyokardbiopsien unterzogen wurden. Dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen liegen seit 1997 4241 Proben endomyokardbiopsierter Patienten vor. Aus diesem Kollektiv wurden die Patienten herausgesucht, bei denen in der Erstbiopsie entweder PVB19 und/oder HHV6-Viren nachgewiesen wurden und die zum Monitoring des Krankheitsbildes mehrmals biopsiert wurden.

Die folgenden Fragestellungen wurden überprüft:

1. Morphologische Charakterisierung von PVB19- und HHV6-positiven ersten und konsekutiven Endomyokardbiopsien nach der Dallas-Klassifikation.
2. Überprüfung der quantitativen Viruslast von PVB19 in den Endomyokardbiopsien anhand molekularbiologischer Untersuchungsergebnisse. Vergleich zur Morphologie z.B. Entzündungsreaktionen.
3. Charakterisierung des Typus der PVB19-Virusinfektion mit Berücksichtigung molekularpathologischer Befunde aus mit untersuchten venösen Blutproben (Plasma und Buffy coat).
4. Soweit vorhanden Aufnahme von klinischen Informationen über die Präsentation des Krankheitsbildes.
5. Kombination aller Befunde mit dem Ziel, sie nach der neuen klinisch-pathologischen Klassifikation nach Baughman (8) einzuordnen.
6. Pathogenetische Überlegungen zur Entwicklung von PVB19- und HHV6-assozierten Kardiomyopathien.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

In den Jahren 1997-2003 wurden am Institut für Pathologie der Universität Tübingen Endomyokardbiopsien von 4241 Patienten untersucht. Eingesandt wurden die Endomyokardbiopsien aus insgesamt 29 Kliniken der Bundesrepublik Deutschland, aus Österreich und der Schweiz in denen mittels Herzkatheteruntersuchung EMBs entnommen wurden.

In die Studie aufgenommen wurden Patienten, bei deren Biopsien eine komplett durchgeführte Trippeldiagnostik vorlag. Zudem musste bei allen Biopsien die molekularbiologischen Untersuchungen auf PVB19 und HHV6 durchgeführt worden sein. War dies nicht der Fall, wurde der betreffende Fall nicht in die Studie aufgenommen. Zudem ausgeschlossen waren Proben von Patienten nach Herztransplantation.

Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur ätiologischen Abklärung ihres Krankheitsbildes. Die Daten wurden zusammengeführt, randomisiert und verschlüsselt in einer Datenbank elektronisch erfasst.

Als Ausgangsmaterial für diese Arbeit dienten 41 konsekutiv endomyokardbiopsierte Patienten mit 86 Endomyokardbiopsien. Die Biopsien wurden im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Pathologie der Universität Tübingen in den Abteilungen Allgemeine Pathologie und Molekulare Pathologie untersucht. Bei diesen Patienten hatte die molekularpathologische Diagnostik in der Erstbiopsie einen positiven Nachweis von PVB19- und/ oder HHV6-viralen Genomen ergeben.

Eine Kontrollgruppe konnte wegen der zu geringen Anzahl an Patienten nicht gebildet werden. Wir haben lediglich die mehrfach endomyokardbiopsierten Patienten, die bei der Erstbiopsie keine Belastung durch Viren hatten, als Gruppe 4 zusammengefasst. Diese Gruppe 4 bestand aus 8 Patienten, die

wegen des klinischen Verdachtes auf entzündliche oder sonstige Kardiomyopathien konsekutiv endomyokardbiopsiert wurden. Die 16 Endomyokardbiopsien wurden ebenfalls im Rahmen der Routinediagnostik untersucht. Die Patienten hatten folgende morphologische Diagnosen: borderline Myokarditis, DCMi (nach der neuen Nomenklatur borderline Myokarditis mit interstitieller Fibrose), DCM, Normalbefund, andere Kardiomyopathien (reaktive Kardiomyopathie, Speicherkrankheit und hypertrophe Kardiomyopathie).

Zudem waren alle Patienten auf zusätzlich untersuchte kardiotope Erreger molekularpathologisch negativ getestet worden.

Bei der Erstbiopsie wurden 40 von 49 Patienten (81,6%) zeitgleich EDTA<sup>d</sup>-Blut abgenommen und auf PVB19 und HHV6 untersucht. Bei der Zweitbiopsie waren es ebenfalls 40 Patienten (81,6%), deren Blut auf virale Genome untersucht wurde. Bei zwei Patienten, die 3- bzw. 5-mal biopsiert wurden, lag ebenfalls EDTA-Blut vor. Die Untersuchung des Blutes diente zur Abklärung systemischer Infektionen. Es wurden Plasma und Buffy-coat getrennt und nach anschließender DNA-Extraktion beide Kompartimente einzeln mittels der PCR-Methode qualitativ, bei PVB19 auch mittels der quantitativen PCR quantitativ, untersucht.

---

<sup>d</sup> Ethylene diamine tetraacetic acid

## 2.2 Klinische Daten

Anhand der durch die Kliniken ausgefüllten Untersuchungsanträge konnten bestimmte klinische Daten erhoben und ausgewertet werden. Es wurden folgende Daten untersucht:

- **Klinische Diagnose:**

Es konnten durch die einsenden Kliniken bis zu zwei gleichwertige klinische Differentialdiagnosen angegeben werden. Es wurde in der Auswertung der Daten besonders die Fragestellung einer inflammatorischen Kardiomyopathie beachtet. Es wurde überprüft in wie weit sich die morphologischen Diagnosen im Verhältnis zu den molekularpathologischen Befunden im Verlauf der Biopsien veränderten.

- **Dauer der Erkrankung:**

Die Kliniken gaben die Dauer der bestehenden Krankheitssymptome bis zur Biopsieentnahme an. Es wurde bei der Datenerfassung die Zeiten in Monate aufgeteilt. Ab einer Dauer von 15 Tagen wurde auf einen Monat gerundet.

- **Herzinsuffizienzgrad nach NYHA:**

Die Einteilung erfolgte nach der New York Heart Association (NYHA) in vier Gruppen. Diese Gruppen wurden nach der körperlichen Belastbarkeit unterteilt.



**Tabelle 1: Grad der Herzinsuffizienz nach NYHA**

Schweregrad	Klinik
Grad I	Herzkranke ohne Beschwerden
Grad II	Herzkranke mit Beschwerden bei schweren körperlichen Arbeiten
Grad III	Herzkranke mit Beschwerden bei leichten alltäglichen Tätigkeiten
Grad IV	Herzkranke mit Beschwerden in Ruhe und deren Verstärkung durch jede körperliche Tätigkeit

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF):**

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) ist die Menge Blut, die die linke Herzkammer während der Systole auswirft. Normalerweise beträgt die LVEF ca. 65% des Blutvolumens. Sie wird als Maß für die Leistungsfähigkeit der Herzmuskulatur angesehen. Ab einer LVEF von unter 45 % liegt eine deutlich reduzierte Auswurfleistung vor. Mittels Echokardiographie kann die LVEF gemessen werden.

### 2.3 Histologie und Immunhistologie

Die Proben wurden in der Regel in 5% Phosphat-gepuffertem (0,15m) Formalin fixiert, in 70%-igem Ethanol oder RNA-Later (Ambion, Inc., Austin, Texas) bzw. als natives Material dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Die formalinfixierten Endomyokardbiopsien wurden routinemäßig in Paraffin eingebettet. An diesen Schnitten wurden Untersuchungen vorgenommen, wie lichtmikroskopische Standardfärbungen, immunhistochemische Färbungen, elektronenmikroskopische Untersuchungen und molekularbiologische Techniken, wie nested polymerase-chain-reaction und quantitative polymerase-chain-reaction.

### **2.3.1 Konventionelle Standardfärbungen**

#### **2.3.1.1 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Hämalaun-Eosin ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung. Hämalaun ist ein Gemisch aus Hämatoxylin und Alaun. Es ist basisch und färbt Chromatin blau. Chromatin ist eine basophile Substanz im Karyoplasma, die im Wesentlichen aus DNA, RNA und Kernproteinen besteht.

Als Kontrast wird saures Eosin, das Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rosa färbt, verwendet.

#### **2.3.1.2 Masson-Trichrom-Färbung**

Bei allen Endomyokardbiopsien wurde eine Masson-Trichrom-Färbung durchgeführt. Diese diente zur Bestimmung des quantitativen Ausmaßes der Anteile des interstitiellen Bindegewebes im Myokard, sowie zur qualitativen lichtmikroskopischen Beurteilung, insbesondere der nekrobiotischen Anteile, Masson-Trichrom färbt mittels verschiedener Lösungen, wie Biebrich-Fuchsin-Rot, Phosphomolybdän-Phosphat-Lösung, Bouin`s-Flüssigkeit, Weigert`s Eisen-Hämatoxylin und Anilin-Blau die Zellkerne schwarz, das Zytoplasma, Kreatin und Muskelfasern rot, Kollagenfasern und Muzine blau (22).

#### **2.3.1.3 Kongo-Rot-Färbung**

Kongo-Rot ist ein Diazofarbstoff mit der Stammsubstanz Benzidin. Es dient zum histomorphologischen Nachweis von Amyloid, einem Protein-Polysaccharid-Komplex, der sich beim Krankheitsbild der Amyloidose ablagert. Im polarisierten Licht ist es nach Kongo-Rot-Färbung durch eine grüne Doppelbrechung zu erkennen. Zudem ist es durch eine Fibrillenstruktur und  $\beta$ -Faltblattkonfiguration definiert.

**Tabelle 2: Standardfärbungen**

Färbungen/Reaktionen	Ergebnis der Färbung
Hämalaun-Eosin	Chromatin blau Interzellulärsubstanz, Zytoplasma rosa-rot
Masson-Trichrom-Färbung	Zellkerne schwarz Zytoplasma, Kreatin, Muskelfasern rot Kollagenfasern, Muzine blau
Kongo-Rot-Färbung	Amyloid grüne Doppelbrechung

### 2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

Durch die Anwendung von immunhistochemischen Färbungen werden immunologisch reaktive Strukturen auf oder in Zellen oder Geweben dargestellt. Die Übertragung von Antikörper-Farbkomplexen führt zu einer Anfärbbarkeit der entsprechenden antigentragenden Strukturen im histologischen Präparat.

Bei der vorliegenden Studie wurden dazu verschiedene Mausantikörper nach Vorbehandlung des Gewebes mit proteolytischen Enzymen, sowie der weiteren Behandlung basierend auf der Avidin-Biotin-Methode und Verdünnungen nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.3.2.1 T-Lymphozyten

Zur Darstellung von T-Lymphozyten wurden monoklonale IgG1-Maus-Antikörper Anti-CD45R0 UCHL1 (Fa. DAKO, Denmark) und Anti-CD3 (Fa. Novocastra, UK) verwendet.

CD45 R0 ist ein transmembranes Glykoprotein, das von den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert wird. UCHL 1 erkennt und bindet an dieses 180 kDa schwere Glykoprotein, das auf den meisten Thymozyten- und aktivierten T-Lymphozyten-Oberflächen, jedoch nicht auf ruhenden T-Lymphozyten, zu finden ist.

CD3 besteht aus fünf Ketten und hat ein Molekulargewicht von 1628 kDa. Die mittlere Dichte von CD3+T-Lymphozyten beträgt im gesunden Herz <5,5 T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup>. Anti-CD3 erkennt und bindet an die Epsilon-Kette des Oberflächenrezeptors (22).

### **2.3.2.2 Makrophagen**

Zur Darstellung der Makrophagen wurde der monoklonale IgG1-Mausantikörperklon KP1 (Fa. DAKO, Denmark) eingesetzt. Durch ihn kann CD68, ein intrazytoplasmatisches Antigen in Lysosomen-Granula der Gewebsmakrophagen angefärbt werden.

### **2.3.2.3 Glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, myoepitheliale Zellen**

Diese Strukturen wurden mittels des monoklonalen IgG-Antikörper Anti-Human smooth muscle actin (Fa. DAKO, Denmark) dargestellt. Anti-SM-Aktin reagiert spezifisch mit der Alpha-Isoform der glatten Muskulatur, einer von 6 Isoformen mit einem Molekulargewicht von jeweils 42 kDa, welche sich in ihren N-terminalen Enden unterscheiden.

### **2.3.2.4 Aktivierte Endothelzellen**

Endothelzellen wurden mittels der monoklonalen IgG1-Mausantikörper Anti-CD34 (Fa. DAKO, Denmark) und Anti-CD62E (Fa. Novocastra, UK) dargestellt. Anti-CD34 erkennt und bindet an das 110kDa schwere transmembrane Glykoprotein CD34.

### **2.3.2.5 HLA-Klasse-II-DR**

HLA<sup>e</sup>-Antigene spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr bei der Erkennung von Fremdgewebe. Beim Menschen sind die Klassen I-III bekannt. Die Klasse-II-Moleküle sind transmembrane, heterodimere Proteine, die aus einer schweren Alpha-Kette und einer leichten Beta-Kette bestehen. Der monoklonale Mausantikörper Anti-human-HLA-DR bindet an die Alpha-Kette des HLA-II-DR-Antigens. Das Epitop ist intrazellulär am C-terminalen Ende der

---

<sup>e</sup> Human leukocyte antigen

DR-Alpha-Kette lokalisiert. Der Antikörper reagiert mit B-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, Antigen-präsentierenden Zellen sowie einigen endothelialen und epithelialen Geweben.

**Tabelle 3: Immunhistochemische Färbungen**

Zielzellart	Benutzter Antikörper	Epitope
T-Lymphozyten	Anti-CD3  Anti-CD45R0 (UCHL1)	Epsilon-Kette des CD3-Oberflächenrezeptors transmembranes Glykoprotein von CD45
Makrophagen	Anti-CD68 (KP1)	Zytoplasmatisches CD68-Antigen
Glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, myoepith. Zellen	Anti-SM-Aktin	Zytoplasmatische Aktinfilamente
B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen, antigenpräsentierende Zellen, einige endotheliale und epitheliale Gewebe	Anti-human-HLA-DR	Alpha-Kette des HLA-Klasse-II-DR-Antigen

## 2.4 Histologische und immunhistologische Klassifikation der Myokarditiden nach Dallas und ISFC

1984 haben acht Pathologen die Dallas-Kriterien aufgestellt, um einheitliche, reproduzierbare morphologische Kriterien zur Diagnostik von Myokarditiden anhand von Endomyokardbiopsien zu erhalten. Die Dallas-Kriterien unterscheiden zwei getrennte Klassifikationen; eine für die Erstbiopsie und die zweite für die konsekutiven Biopsien (in der Folge k-EMBs genannt) des Patienten (119):

### Unterscheidungen bei der Erstbiopsie:

- Aktive Myokarditis (active myocarditis)
- Grenzwertige Myokarditis (borderline myocarditis)
- Grenzwertige Myokarditis mit interstitieller Fibrose (DCMi)
- Keine Myokarditis (no myocarditis)

### Unterscheidungen bei weiteren Biopsien:

- Fortschreitende Myokarditis (ongoing myocarditis)
- Abheilende Myokarditis (resolving myocarditis)
- Abgeheilte Myokarditis (resolved myocarditis)

Die Dallas-Klassifikation beruht ausschließlich auf histologische Routinefärbungen ohne eine Subtypisierung der Entzündungszellen, die seinerzeit nicht möglich war bei noch nicht etablierter Immunhistologie. 1998 haben deshalb Expertengruppen der ISFC die immunhistologischen Kriterien der Myokarditis definiert. Ein Auftreten von mehr als 14 infiltrierenden Leukozyten/mm<sup>3</sup> (CD3+ T-Lymphozyten und/oder CD68+ Makrophagen) wurde als Grundlage der morphologischen Diagnosestellung einer inflammatorischen Kardiomyopathie angenommen (70).

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit basierend auf Maisch et al. (71) der Begriff der dilatativen Kardiomyopathie mit Entzündung (DCMi) eingeführt. Die morphologische Charakterisierung einer DCMi ist in den **Abbildungen 17 und 18** zu sehen.

## 2.5 Molekularbiologische Techniken

### 2.5.1 Die Polymerasekettenreaktion

Die molekularbiologische Untersuchung der Endomyokardbiopsien und der EDTA-Blutproben erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro Technik basierend auf der enzymatischen und selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten. Die PCR-Methode beruht auf der zyklischen Wiederholung von thermischer Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation). Spezifische Oligonukleotide (Primer) flankieren den zu vermehrenden DNA-Abschnitt von den 3'-Strangenden her und dienen als Initiationsstelle für den Polymerisationsprozess der thermostabilen DNA-Polymerase. In unserem Fall wurden sogenannte Vorwärts- (Forward-, FP) und Rückwärts- (Reverse-, RP) Primer von ca. 20bp Länge verwendet. Nach der Verdopplung der Einzelstränge wird die DNA erneut denaturiert und der Zyklus beginnt von neuem. Innerhalb kurzer Zeit kann so das bestimmende Genom um

den Faktor  $10^6$  bis  $10^7$  vervielfältigt werden. Mittels Gelelektrophorese können die entstandenen Produkte aufgetrennt werden.

Die PCR kann in 3 Phasen eingeteilt werden (37):

- **Denaturierung:**  
Zu Beginn des PCR-Zyklus wird bei  $94^\circ\text{C}$  der DNA-Doppelstrang des zu untersuchenden Erregers in seine zwei Einzelstränge aufgetrennt.
- **Annealing:**  
Anschließend wird Primer zugegeben, der sich an die entsprechenden DNA-Abschnitte bei  $54^\circ\text{C}$  anlagert.
- **Extensionsphase:**  
Hier bilden sich mittels Polymerase bei  $72^\circ\text{C}$  neue DNA-Abschnitte.

Die in dieser Studie benutzte Methode der nested PCR ermöglicht es, Krankheitserreger, die nur in sehr geringer Anzahl vorhanden sind, nachzuweisen. Nach der ersten PCR-Runde liegt meist nicht genug Material zur elektrophoretischen Darstellung vor. Daher wird mit einem zweiten Primerpaar, das innerhalb des bereits amplifizierten Segmentes liegt, eine zweite Runde durchgeführt. Hierdurch wird die Sensivität erhöht und die Nachweisgrenze des viralen Genoms gesenkt.

In der folgenden **Tabellen 4** und **5** sind die PCR-Protokolle für PVB19 und HHV6 dargestellt (11, 22, 61, 67)



### **2.5.2 DNA-Sequenzierung**

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde mittels einer automatischen DNA-Sequenzierung bestätigt. Die direkte DNA-Sequenzierung der PVB19-PCR-Fragmente zeigte 2 stille C-zu T-Punktmutationen an nt 3217 und nt 3313, die durch den Abgleich mit den PVB19-Sequenzen der GenBank Acc. No. M24682 entdeckt wurden (11).

**Tabelle 4: PCR-Protokoll für PVB19****1.PCR: 35 Zyklen**

Primer	Nukleotidsequenz	Paare
PVB19/3	5`-AGC ATG TGG AGT GAG GGG GC-3`	20mer
PVB19/4	5`-AAA GCA TCA GGA GCT ATA CTT CC-3`	23mer

Phasen	Temp.	Zeit
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	56 °C	30 s
Extension	72 °C	45 s

Zyklen: 35  
 Fragmentlänge: 290 Basenpaare  
 Referenz-Sequenz Nr.: U38509  
 Amplifikationsbereich: VP1, VP2  
 Lage der Primer: PVB3: 748-767  
 PVB4: 1015-1037

**Nested PCR: 40 Zyklen**

Primer	Nukleotidsequenz	Paare
PVB19/1	5`-GCT AAC TCT GTA ACT TGT AC-3`	20mer
PVB19/2	5`-AAA TAT CTC CAT GGG GTT GAG-3`	21mer

Phasen	Temp.	Zeit
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	56 °C	30 s
Extension	72 °C	45 s

Zyklen: 40  
 Fragmentlänge: 173 Basenpaare  
 Referenz-Sequenz Nr.: U38509  
 Amplifikationsbereich: VP1, VP2  
 Lage der Primer: PVB1: 778-797  
 PVB2: 930-950

**Tabelle 5: PCR-Protokoll für HHV6****1.PCR: 40 Zyklen**

Primer	Nukleotidsequenz	Paare
HHV6/1	5`-AAG CTT GCA CAA TGC CAA AAA ACA G-3`	25mer
HHV6/2	5`-CTC GAG TAT GCC GAG ACC CCT AAT C-3`	25mer

Phasen	Temp.	Zeit
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	56 °C	30 s
Extension	72 °C	45 s

Zyklen: 40  
 Fragmentlänge: 223 Basenpaare  
 Referenz-Sequenz Nr.: M68963  
 Amplifikationsbereich: Kapsidprotein,  
 alkaline Exonuklease,  
 Phosphotransferasegene  
 Lage der Primer: HHV1: 17603-17627  
 HHV2: 17405-17429

**Nested PCR:**

Primer	Nukleotidsequenz	Paare
HHV6/3	5`-TCC ATT ATT TTG GCC GCA TTC GT-3`	23mer
HHV6/4	5`-TGT TAG GAT ATA CCG ATG TGC GT-3`	23mer

Phasen	Temp.	Zeit
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	56 °C	30 s
Extension	72 °C	45 s

Zyklen: 40  
 Fragmentlänge: 173 Basenpaare  
 Referenz-Sequenz Nr.: M68963  
 Amplifikationsbereich: Kapsidprotein,  
 alkaline Exonuklease,  
 Phosphotransferasegene  
 Lage der Primer: HHV3: 17580-17602  
 HHV4: 17430-17452

### 2.5.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative PCR wurde in der vorliegenden Arbeit für die Ermittlung des PVB19 genome equivalent/  $\mu\text{g}$  myokardiale DNA (PVB19 g.e./  $\mu\text{g}$ ) verwendet. Das Ziel der quantitativen PCR ist die Messung der in den Endomyokardbiopsien und im Plasma vorhandenen, sequenzspezifischen Nukleinsäure-Konzentration. Um auf die zu Beginn der PCR vorliegende Konzentration der Nukleinsäure schließen zu können, bedient man sich heute verschiedener Methoden, unter anderem:

- Externe Eichkurve: Mit Proben bekannter Konzentration, die der Analysensequenz ähnlich sind und mit dem gleichen Primer amplifiziert werden, wird vor der eigentlichen PCR eine Eichkurve erstellt.
- Interne Standardisierung: Während der PCR wird durch ein weiteres Primerpaar die Amplifizierung von  $\beta$ -Globulin ausgelöst, welches ebenfalls auf der zu analysierenden DNA codiert ist. Da sich mit jeder Verdoppelung der DNA auch die Menge des  $\beta$ -Globin verdoppelt, kann man später von der  $\beta$ -Globulin-Konzentration direkt auf die DNA-Konzentration zurückschließen.

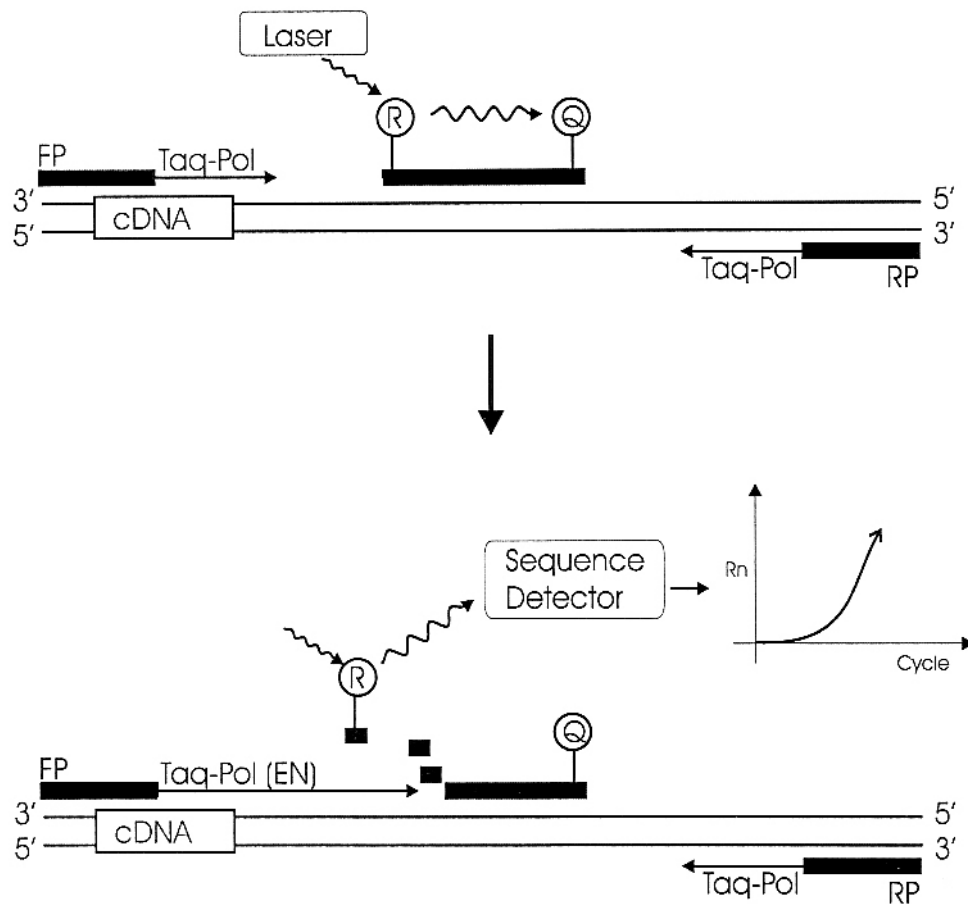
In dieser Studie wurde das Prinzip der „Taqman“ quantitativen PCR verwendet. Dieses Prinzip der quantitativen PCR baut auf dem bekannten PCR-Verfahren auf. Zusätzlich zu den Vorwärts- und Rückwärts-Primern wird in dieser Technik eine sogenannte Taq-Probe (TP) eingesetzt. Die TP ist ein ca. 20 Basen langes Oligonukleotid, dessen 5`-und 3`- Enden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Reporter 6-FAM = 6-Carboxyfluorescein) und Quencher (TAMRA = 5/6-Carboxytetramethylrhodamine) markiert sind. Die TP dient als Sonde und bindet kurz hinter dem 3`-Ende des Vorwärts-Primers durch Hybridisierung. Durch einen sogenannten „Förster-Energietransfer“ kann die Fluoreszenz des Reporters auf den Quencher übertragen werden. Wird die Taqmanprobe während der Extensionsphase der PCR durch die 5`-Exonukleaseaktivität der

Taq-Polymerase jedoch hydrolisiert, findet auch kein Förstertransfer auf den Quencher statt. Stattdessen werden Reporter und Quencher durch Spaltung getrennt, was zu einer gesteigerten Fluoreszenz des Reporters führt. Die Emission des Reporters kann mit einer Kamera detektiert werden.

Je mehr Kopien der spezifischen Nukleinsäure im Reaktionsansatz vorhanden sind, desto mehr TP wird gebunden und Reporterfarbstoff abgespalten. Ab einem gewissen Punkt überschreitet die Emissionsstärke des Reporters die Detektionsschwelle (Treshold). Dieser Zykluspunkt wird durch lineare Regression gegen die Werte einer bekannten DNA-Verdünnungsreihe auf die Kopienzahl zurückgerechnet.

Eine weitere Möglichkeit bei der quantitativen PCR besteht im Einsatz von SYBR Green (Fa. Molecular Probes, Applied Biosystems) anstelle von TP. In den amplifizierten Strängen lagert sich das fluoreszierende Interkalans SYBR Green ein, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich dadurch ändern. Die Spezifität diese Systems muss durch eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte nachgewiesen werden.

Die quantitative PCR lässt sich auch für den quantitativen RNA-Nachweis anwenden, indem ein reverse Transkriptase-(RT-) Schritt vor die eigentliche quantitative PCR gesetzt wird.



**Abbildung 6: Prinzip der Taqman quantitativen PCR: Die Exonukleaseaktivität (EN) der Taq-Polymerase (Taq-Pol) schneidet den Reporter (R) von der Taq-Probe ab. Somit kann er sein Fluoreszenz-Signal nicht mehr auf den Quencher (Q) übertragen und wird dadurch messbar (11).**

## 2.6 Datenerfassung

Die klinischen Daten wurden von den einsendenden Kliniken in dafür vorgesehene klinische Untersuchungsanträge eingetragen und zusammen mit der bioptischen Probe eingesandt. Die vorhandenen Daten und die erhobenen Befunde wurden in vorhandene Datenerfassungsbögen übertragen. Die gesammelten Daten wurden in einer Datenbank elektronisch erfasst, verschlüsselt und ausgewertet.

Die nachfolgenden **Abbildungen 7-10** zeigen die oben erwähnten klinischen Untersuchungsanträge und Dokumentationsbögen.

<b>KARDIOPATHOLOGIE</b>	
<b>Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen</b>	
Prof. Dr. med. R. Kandolf Abt. Molekulare Pathologie Liebermeisterstr. 8 72076 Tübingen	Tel. 07071- 29 80205, Fax - 295334 (Sekretariat), 29 82260 (Anforderung von Einsenderöhrchen)
<b><u>Patientendaten:</u></b>	
Name:	
Geburtsdatum:	
Ansprechpartner: (Arzt)	
Tel.:	
Fax:	
<u>Einsender</u> (Stempel)	
<u>Unterschrift</u> (Arzt):	
<input type="checkbox"/> ambulant <input type="checkbox"/> stationär <input type="checkbox"/> privat	
Eingangsnummer:	Eingangsdatum:
<b>FRAGESTELLUNG:</b>	
<b>HERZBIOPSIEN</b>	
Anzahl der Biopsien:    Formalin <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3                      RNAlater <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	
<input type="checkbox"/> Erstbiopsie	<input type="checkbox"/> Rechter Ventrikel <input type="checkbox"/> Septum <input type="checkbox"/> freie Wand
<input type="checkbox"/> Verlaufsbiopsie	<input type="checkbox"/> Linker Ventrikel <input type="checkbox"/> Septum <input type="checkbox"/> freie Wand
<input type="checkbox"/> EDTA-Blut	
<b>UNTERSUCHUNGSauftrag</b> Histologische Voruntersuchung <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	
<input type="checkbox"/> Histologie <input type="checkbox"/> Immunhistologie <input type="checkbox"/> Molekularpathologie <input type="checkbox"/> System. Infektion <input type="checkbox"/> EM	
<b>INFEKTIONSdiagnostik</b>	
<input type="checkbox"/> Kardiotrope Viren	
<input type="checkbox"/> Enteroviren	<input type="checkbox"/> Epstein-Barr Virus <input type="checkbox"/> Mumpsvirus
<input type="checkbox"/> Coxsackieviren	<input type="checkbox"/> Humanes Cytomegalievirus <input type="checkbox"/> Masernvirus
<input type="checkbox"/> Echoviren	<input type="checkbox"/> Herpes Virus simplex 1/2 <input type="checkbox"/> Rötelnvirus
<input type="checkbox"/> Adenoviren	<input type="checkbox"/> Varizella-Zoster-Virus <input type="checkbox"/> Borrelien
<input type="checkbox"/> Parvovirus B19	<input type="checkbox"/> Humanes Herpesvirus 6 <input type="checkbox"/> Chlamydia pneumoniae
<input type="checkbox"/> Influenzaviren	<input type="checkbox"/> Humanes Herpesvirus 7 <input type="checkbox"/> 16S rRNA Eubakterien
	<input type="checkbox"/> Humanes Herpesvirus 8 <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii
<input type="checkbox"/> Sonstige: .....	<input type="checkbox"/> Aspergillen
<b>GENETISCHE ERKRANKUNGEN</b> (Mutationsanalyse)	
<input type="checkbox"/> Hypertrophe Kardiomyopathie	<input type="checkbox"/> Mitochondriale Kardiomyopathie

Abbildung 7: Klinischer Untersuchungsantrag Seite 1



<b>ANAMNESE</b>	
Beginn der kardialen Erkrankung:	.....
Infektanamnese:	.....
Familienanamnese:	.....
Begleiterkrankungen:	.....
Immunsuppressive Therapie:	.....
<b>KLIN. SYMPTOMATIK</b>	
<input type="checkbox"/> Herzinsuffizienz, NYHA	.....
<input type="checkbox"/> Arrhythmie, Art:	.....
<input type="checkbox"/> Perikarderguß ml:	.....
<b>ECHOKARDIOGRAFIE</b>	
<input type="checkbox"/> Regionale Hypokinesien, Ort:	.....
<input type="checkbox"/> Enddiastolischer Durchmesser:	.....
<b>HERZKATHETER</b>	
<input type="checkbox"/> Linksventrikuläre Auswurfraction (LVEF):	.....
<input type="checkbox"/> Linksventrikulärer enddiast. Druck (LVEDP):	.....
<input type="checkbox"/> Pulmonalarterieller Mitteldruck (Ruhe):	.....
<input type="checkbox"/> Pulmonalarterieller Mitteldruck (Belastung):	.....
<input type="checkbox"/> KHK; Ort:	.....
<b>MRT</b>	
<input type="checkbox"/> Late enhancement, Ort:	.....
<input type="checkbox"/> Sonstiges:	.....
<b>KLINISCHE DIAGNOSE</b>	
<input type="checkbox"/> V.a. Myokarditis	<input type="checkbox"/> akut <input type="checkbox"/> chronisch
<input type="checkbox"/> V.a. Dilatative Kardiomyopathie	<input type="checkbox"/> beginnend <input type="checkbox"/> Vollbild
<input type="checkbox"/> V.a. Hypertrophe Kardiomyopathie	<input type="checkbox"/> obstruktiv <input type="checkbox"/> nicht-obstruktiv
<input type="checkbox"/> V.a. Restriktive Kardiomyopathie	
<input type="checkbox"/> V.a. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	
<input type="checkbox"/> V.a. Ischämische Kardiomyopathie	<input type="checkbox"/> Infarkt; Lokalisation: .....
<input type="checkbox"/> V.a. Hypertensive Herzerkrankung	
<input type="checkbox"/> V.a. Non-compaction myocardium	
<input type="checkbox"/> V.a. Speicherkrankheit	<input type="checkbox"/> Art:.....
<input type="checkbox"/> V.a. Alkoholabusus	
<input type="checkbox"/> V.a. Transplantatabstossung	
<input type="checkbox"/> Sonstiges:	
<b>THERAPIE</b>	
<input type="checkbox"/> Symptomatisch:	.....
<input type="checkbox"/> Antiviral:	.....
<input type="checkbox"/> Interferon:	Dosis:..... Dauer:.....
<input type="checkbox"/> Immunglobulin:	Dosis:..... Dauer:.....
<input type="checkbox"/> Antibakteriell:	.....
<input type="checkbox"/> Immunsuppressiv:	.....

Abbildung 8: Klinischer Untersuchungsantrag Seite 2

Institut für Pathologie der Universität Tübingen  
 Direktor Prof. Dr. med. BD Bültmann

**DATENERFASSUNGSBLATT ENDOMYOKARDBIOPSIEN**

JAHR:..... BUCHSTABE:.....

**Patientendaten**

**KLINIK:**  a =auswärts   k =Uni Tü  **EINSENDER:** Name.....  
**EING-NR:**..... (Schlüssel-PAS)  
**JAHR(JJJJ):**..... **2003**..... (PLZ&Ort)  
**NACHNAME/VORNAME:**..... (Bundesland-siehe Liste)  
**GEBURTSDATUM(TT.MM.JJJJ):**..... **BIOPSIEDATUM(TT.MM.JJJJ):**.....

**Material und Diagnose** (zutreffendes ankreuzen)

**MATERIAL:**   $\mu$ 1=Herz   $\mu$ 2=Blut   $\mu$ sonstige:.....  
**TOPOGR.:**   $\mu$  1=li.Ventrikel   $\mu$  2=re.Ventrikel   $\mu$  3=ges.Herz   $\mu$  4=unbekannt  
  $\mu$  5=sonstiges  
**BIOPSIE NUMMER**  **VORBIOPSIE N ?**  **ANZAHL**  (AB 2002)  
 ETHANOL   
 FORMALIN   
 NATIV

**KHK:**   $\mu$ 0=nein   $\mu$ 1=ja   $\mu$ 2=keine Angabe **HTX:**   $\mu$ 0=nein   $\mu$ 1=ja  
**ALKOHOL?:**   $\mu$ 0=nein   $\mu$ 1=ja   $\mu$ 2=keine Angabe (Wann ??.....)

KLINISCHE DIAGNOSE	DIAG2	MORPHOLOGIE HAUPTDIAGNOSE	DIAG2	DIAG3
$\mu$ 1 kein pathol. Befund.....	$\mu$ 1	$\mu$ 0 Befund auswärts.....		
$\mu$ 2 akute Myokarditis.....	$\mu$ 2	$\mu$ 1 kein pathol. Befund.....	$\mu$ 1	$\mu$ 1
$\mu$ 3 chron. Myokarditis.....	$\mu$ 3	$\mu$ 2 akute Myokarditis.....	$\mu$ 2	$\mu$ 2
$\mu$ 4 Z.n. Myokarditis.....	$\mu$ 4	$\mu$ 3 chron. Myokarditis.....	$\mu$ 3	$\mu$ 3
$\mu$ 5 DCM.....	$\mu$ 5	$\mu$ 4 Z.n. Myokarditis.....	$\mu$ 4	$\mu$ 4
$\mu$ 6 DCMI.....	$\mu$ 6	$\mu$ 5 DCM.....	$\mu$ 5	$\mu$ 5
$\mu$ 7 ARVD.....	$\mu$ 7	$\mu$ 6 DCMI.....	$\mu$ 6	$\mu$ 6
$\mu$ 8 HCM.....	$\mu$ 8	$\mu$ 7 ARVD.....	$\mu$ 7	$\mu$ 7
$\mu$ 9 RCM.....	$\mu$ 9	$\mu$ 8 HCM.....	$\mu$ 8	$\mu$ 8
$\mu$ 10 Amyloidose.....	$\mu$ 10	$\mu$ 9 RCM.....	$\mu$ 9	$\mu$ 9
$\mu$ 11 Speicherkrankheit.....	$\mu$ 11	$\mu$ 10 Amyloidose.....	$\mu$ 10	$\mu$ 10
$\mu$ 12 Mitochondriopathie.....	$\mu$ 12	$\mu$ 11 Speicherkrankheit.....	$\mu$ 11	$\mu$ 11
$\mu$ 13 Fibroelastose.....	$\mu$ 13	$\mu$ 12 Mitochondriopathie.....	$\mu$ 12	$\mu$ 12
$\mu$ 14 spongy myocardium.....	$\mu$ 14	$\mu$ 13 Fibroelastose.....	$\mu$ 13	$\mu$ 13
$\mu$ 15 Vaskulitis.....	$\mu$ 15	$\mu$ 14 spongy myocardium.....	$\mu$ 14	$\mu$ 14
$\mu$ 16 sonstiges.....	$\mu$ 16	$\mu$ 15 Vaskulitis.....	$\mu$ 15	$\mu$ 15
		$\mu$ 16 sonstiges.....	$\mu$ 16	$\mu$ 16
		$\mu$ 99 reakt. Hypertrophie.....	$\mu$ 99	$\mu$ 99
		$\mu$ 100 hypertensiv.....	$\mu$ 100	$\mu$ 100
		$\mu$ 101 ischämisch.....	$\mu$ 101	$\mu$ 101
		$\mu$ 102 Abstoßung.....	$\mu$ 102	$\mu$ 102

CAVE: Bei sonstigen Diagnosen bitte genaue Bezeichnung.....

**SPEZIELLE ENTZÜNDUNGSPARAMETER** aufgrund immunhistochemischer Färbungen

<b>T-Lymphozyten</b>	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	<input type="checkbox"/> keine Angabe
<b>Makrophagen</b>	<input type="checkbox"/> erhöht	<input type="checkbox"/> NORMAL	<input type="checkbox"/> keine Angabe
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<input type="checkbox"/> erhöht	<input type="checkbox"/> NORMAL	<input type="checkbox"/> keine Angabe
<b>HLA-DR</b>	<input type="checkbox"/> erhöht	<input type="checkbox"/> NORMAL	<input type="checkbox"/> keine Angabe

ICD10:

Abbildung 9: Datenerfassungsblatt Endomyokardbiopsien. Seite 1. Erstellt von S. Tachlinski in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B.D. Bültmann und Prof. Dr. R. Kandolf, Institut für Pathologie, Tübingen.

**Färbungen Immunhistochemie Elmi** (zutreffendes ankreuzen)

Methode	Nein=0	Ja=1	Keine Angabe=2
HE		X	
MTRI		X	
Giemsa			
KONGO			
CD3		X	
CD68		X	
SM-Aktin		X	
TGF- $\beta$		X	
HLA-DR		X	
MC-Trypase		X	

Sonstige Immunhisto (Text):

	Nein=0	Ja=1	Keine Angabe=2
ELMI			

**Molekularbiologie**

**PCR**  
MYOKARDBIOPSIE

Erreger	Erreger
EV	FSME Virus
ECHO	Rötelnvir.
ADV	Coxiella
PARV	Mykobakter
HCMV	Mycoplasma
CHLA	Aspergillen
BORR	Toxoplasm
HSV_1	Pneumocys
HSV_2	HHV6
INF_A	<b>SONSTIGE</b>
INF_B	
HCV	Coxackie A
EBV	Coxackie B

SYSTEMISCHER NACHWEIS (periphere Leukos/Plasma)

Erreger	P	P	Erreger	P	P
EV	E	L	FSME Virus	E	L
ECHO	R	A	Rötelnvir.	R	A
ADV	I	S	Coxiella	I	S
PARV	P	M	Mykobakter	P	M
HCMV	H	A	Mycoplasma	H	A
CHLA			Aspergillen		
BORR	L		Toxoplasm	L	
HSV_1	E		Pneumocys	E	
HSV_2	U		HHV6	U	
INF_A	K		<b>SONSTIGE</b>	K	
INF_B	O				
HCV	S		Coxackie A	O	
EBV			Coxackie B	S	

CAVE Text „SONSTIGE“ nicht vergessen !

CAVE: Blut gleichzeitig? Blut nachgeschendet? wenn JA: DATUM: E-Nummer

**Insitu-Hybridisierung**

Erreger	
EV	
ADV	
PARV	
HCMV	
EBV	
HHV6	
<b>SONSTIGE 2</b>	
Coxackie A	
Coxackie B	

☐ Markieren wenn KEIN systemischer Nachweis geführt wurde !

**QUANTITATIVE PCR**  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

Ergebnis.....

**SEQUENZIERUNG**  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

Viren & .....

**Klinische Befunde**

**ERKRANKUNGSDAUER** bis Erstbiopsie (in Monaten; 0-14d=0 Monate):..... Monat(e)

**NYHA** Stadium (1-4) ..... **LVEF** (%).....% **LVEDP** (mmHg).....mmHg

**ENDDIAST. DURCHM.** (mm) .....mm **PAMP** (mmHg).....mmHg

**ARRHYTHMIE**  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

**VERLAUF**  $\mu 0$ =keine Angabe  
 $\mu 1$ =gebessert  
 $\mu 2$ =verschlechtert  
 $\mu 3$ =unverändert  
 $\mu 4$ =HTX  
 $\mu 5$ =verstorben

**REG. HYPOKINESIE ?**  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

**RESP. RELAXATIONSSTÖRUNG:**  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

**THERAPIE** symptomatisch  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

immunsuppressiv  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

interferon  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

**INFEKTANAMNESE**  
 $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =k.A.  
 TEXT:.....

**KLINISCHE STUDIE**  $\mu 0$ =nein  $\mu 1$ =ja  $\mu 2$ =keine Angabe

Abbildung 10: Datenerfassungsblatt Endomyokardbiopsien. Seite 2. Erstellt von S. Tachlinski in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B.D. Bültmann und Prof. Dr. R. Kandolf, Institut für Pathologie, Tübingen.

## 2.7 Klassifikation der Myokarditis nach Baughman

Baughman (8) unterteilt die Myokarditis nach seiner neuen klinisch-pathologischen Klassifikation in eine **fulminante**, eine **akute** und eine **chronisch aktive** Myokarditis. Der Zeitfaktor spielt hier eine große Rolle. So definiert sich eine fulminante Myokarditis als eine kardiale Erkrankung, deren Verlauf innerhalb von 2 Wochen zum Tode oder zur Genesung führt. Klinisch lässt sich eine starke linksventrikuläre Dysfunktion erkennen. Histologisch zeigen sich viele entzündliche und nekrotische Areale. Es handelt sich hier nach der Dallas-Klassifikation in der Regel um eine aktive Myokarditis.

Bei einer akuten Myokarditis liegt die kardiale Erkrankungsdauer zwischen 14 Tagen bis 6 Wochen. Charakterisiert wird sie durch eine hohe Viruslast und eine Entzündung des Myokards. Nach der Dallas-Klassifikation handelt es sich hier histologisch in der Regel um eine aktive oder borderline Myokarditis.

Die chronische aktive Myokarditis hat einen unklareren Verlauf mit einem schleichenden Krankheitsbeginn. Die Patienten haben eine moderate ventrikuläre Dysfunktion und präsentieren histologisch nach der Dallas-Klassifikation das Bild einer Borderline Myokarditis. Daraus kann sich innerhalb von 2 bis 4 Jahren bei geringen Entzündungszeichen eine Fibrose des Myokards bilden, was innerhalb von 2 bis 4 Jahren in einer restriktiven oder dilatativen Kardiomyopathie enden kann (8, 73).

## 2.8 Typisierung der PVB19-Virusinfektion

Nach den Prinzipien der allgemeinen Virologie unterscheidet man zwischen **akuten**, **persistierenden** und **latenten** Virusinfektionen.

Akute Virusinfektionen sind abhängig von der Immunreaktion des Patienten in der Regel durch eine hohe Viruslast begleitet von virusassoziierten Gewebnekrosen und begleitender aktiver Entzündung charakterisiert.

Bei der persistierenden Virusinfektion sinkt die Viruslast im Gewebe, ebenso wie das Ausmaß der Entzündungsreaktion.

Die latente Virusinfektion ist charakterisiert durch eine geringe Viruslast im Gewebe ohne begleitende Entzündung.

Entsprechende Informationen, speziell über die mit Hilfe der q-PCR bestimmten Viruslast in den Endomyokardbiopsien, lagen nur für PVB19-positive Patienten vor. Eine Typisierung der HHV6-Infektionen konnte wegen fehlender q-PCR-Ergebnisse konsequenterweise nicht durchgeführt werden.

Eine akute Infektion kann von einer Virämie entweder im Buffy-coat und/oder im Plasma begleitet werden. Bei persistierenden Infektionen können virale Genome im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma entdeckt werden. Serologische Untersuchungen zum PVB19- bzw. HHV6-Antikörpernachweis wurden nicht durchgeführt.

## **2.9 Statistik**

Eine statistische Auswertung erfolgte nicht, da in Rücksprache mit Frau Dr. T. Herberts, Institut für Biometrie, Universität Tübingen, nicht genügend Daten zur Verfügung standen, um ausreichend aussagekräftige Erhebungen durchführen zu können.

## **3 Ergebnisse: allgemeiner Teil**

### **3.1 Charakterisierung des Patientengutes**

In den Jahren 1997-2003 wurden am Institut für Pathologie der Universität Tübingen Endomyokardbiopsien von 4241 Patienten untersucht. Die Analysen wurden durch eine sogenannte Trippeldiagnostik mit Routinehistologie, Immunhistologie für die Quantifizierung und Qualifizierung des entzündlichen Exsudats und mehreren molekularpathologischen Techniken zum Nachweis kardiotroper Erreger durchgeführt. Von insgesamt 4241 Patienten lagen bei 49 Patienten konsekutive Endomyokardbiopsien vor. Bei 41 Patienten waren PVB19- und/oder HHV6- virale Genome in der Erstbiopsie nachgewiesen worden. Die restlichen 8 Personen, die bei der Erstbiopsie PVB19- bzw. HHV6- negativ getestet wurden, dienten als Vergleich, können aber wegen ihrer geringen Patientenmenge nicht als Kontrollgruppe definiert werden. 1 Patient wurden 3-mal, 1 Patient sogar 5-mal rebiopsiert. Der Abstand zwischen der ersten und der zweiten Biopsie betrug durchschnittlich 252,8 Tage, wobei der kürzeste Zeitabstand 31 Tage, der längste 1205 Tage betrug. Der Abstand zwischen der ersten und der letzten Biopsie in Hinblick auf die zwei Patienten, die mehr als zweimal biopsiert wurden, betrug 267 Tage.

### 3.2 Gruppeneinteilung

Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand des Leitsymptoms, dem Nachweis von PVB19- und/oder HHV6-viralen Genomen in der initialen Endomyokardbiopsie.

Es ergaben sich dadurch 4 Gruppen bei der **Erstbiopsie**:

**Gruppe 1:** PVB19 positiv und HHV6 negativ

**Gruppe 2:** PVB19 und HHV6 positiv

**Gruppe 3:** PVB19 negativ und HHV6 positiv

**Gruppe 4:** PVB19 und HHV6 negativ

Bei den konsekutiven Endomyokardbiopsien (folgend k-EMB genannt) kam noch eine **5. Gruppe** dazu. Bei diesen Patienten fand sich in den Erstbiopsien ein positiver Nachweis von PVB19 und/oder HHV6. Es zeigte sich bei den k-EMBs jedoch kein Hinweis mehr auf PVB19 und/oder HHV6.

Gruppeneinteilung bei der Konsekutivbiopsie:

**Gruppe 1:** PVB19 positiv und HHV6 negativ

**Gruppe 2:** PVB19 und HHV6 positiv

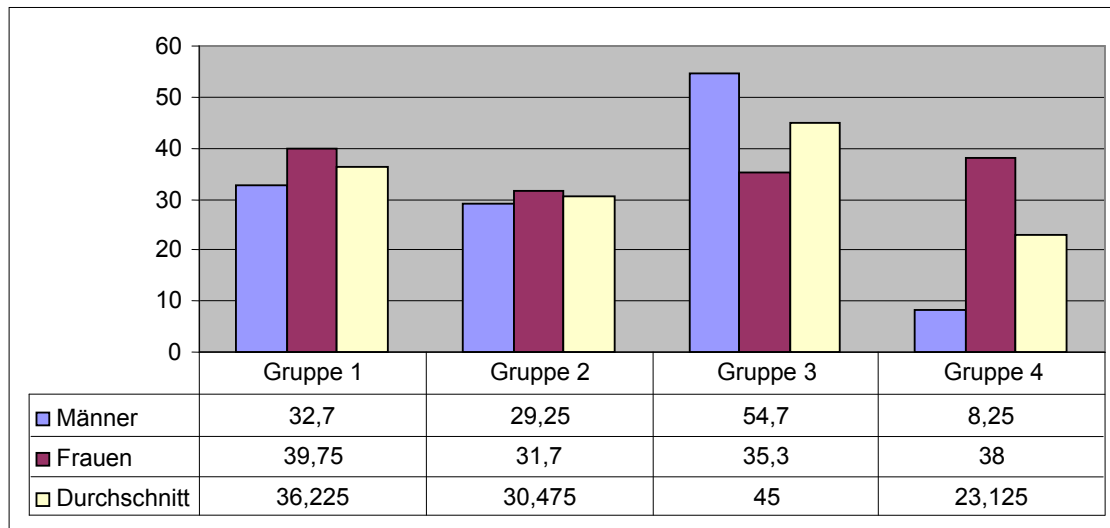
**Gruppe 3:** PVB19 negativ und HHV6 positiv

**Gruppe 4:** PVB19 und HHV6 negativ

**Gruppe 5:** Bei der Erstbiopsie PVB19-und/oder HHV6- Virus positiv, bei k-EMB virusnegativ.

### 3.3 Altersverteilung

Die in die Studie aufgenommenen Patienten waren zwischen 0,02 und 67 Jahren alt mit einem Durchschnittsalter von 32,6 Jahren, wobei Männer im Durchschnitt 31,4 Jahre alt und Frauen 35,2 Jahre alt waren. Selbst wenn die jüngsten und ältesten Patienten aus dieser Berechnung ausgenommen wurden, blieb das Durchschnittsalter insgesamt nahezu konstant.

**Abbildung 11: Altersverteilung mit Gruppeneinteilung**

**Gruppe 1:** PVB19+, HHV6-

**Gruppe 2:** PVB19+, HHV6+

**Gruppe 3:** PVB19-, HHV6+

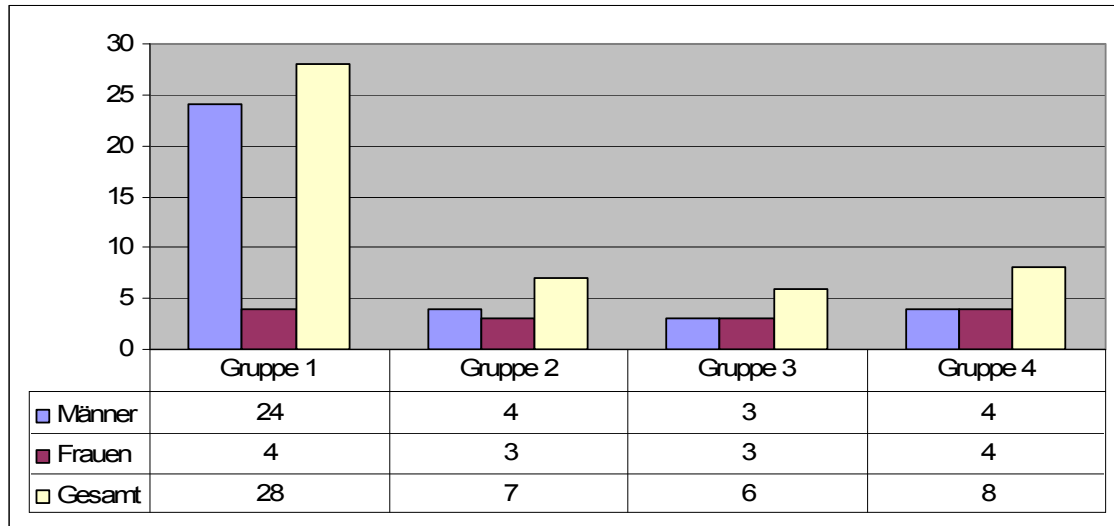
**Gruppe 4:** PVB19-, HHV6-

### 3.4 Geschlechterverteilung

Bei der Verteilung der Geschlechter gab es eine deutliche Häufung des männlichen Geschlechts mit 71,4 %, Frauen waren demnach in 28,6 % der Fälle betroffen.

**Abbildung 12** zeigt die Geschlechterverteilung in den einzelnen Gruppen.



**Abbildung 12: Geschlechterverteilung**

**Gruppe 1:** PVB19+, HHV6-

**Gruppe 2:** PVB19+, HHV6+

**Gruppe 3:** PVB19-, HHV6+

**Gruppe 4:** PVB19-, HHV6-

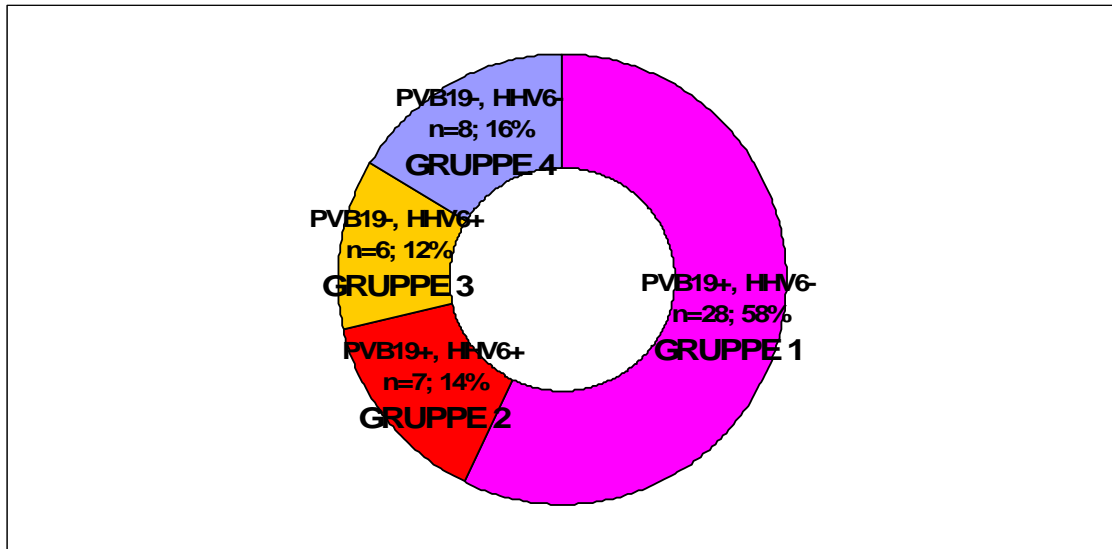
## 4 Ergebnisse der Erstbiopsie

Die Ergebnisse aus den molekularpathologischen, histologischen und immunhistologischen Daten sind patienten- und gruppenorientiert in den **Tabellen 6-9** zusammengefasst.

### 4.1 Molekularpathologische Daten bei der Erstbiopsie

#### 4.1.1 Prävalenz von PVB19 und HHV6 bei Erstbiopsie

Durch die molekularpathologische Diagnostik konnten virale PVB19- und/oder HHV6-Genome bei 41 Patienten in den EMBs nachgewiesen werden. Die nachfolgende **Abbildung 13** zeigt die Virusverteilung bei der Erstbiopsie. 28 Patienten (57,1%) waren PVB19 positiv und HHV6 negativ (Gruppe 1). Bei 7 Personen (14,3%) wurden beide Viren koinzident positiv diagnostiziert (Gruppe 2). Lediglich 6 Patienten (12,2%) waren HHV6 positiv und PVB19 negativ (Gruppe 3). 8 Patienten (16%) waren sowohl PVB19- als auch HHV6-negativ (Gruppe 4).

**Abbildung 13: Prävalenz PVB19 und HHV6 bei Erstbiopsie n=49**

#### 4.1.2 Die Sequenzierung der viralen Genome bei Erstbiopsie

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde mittels einer automatischen DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab für PVB19 einen Median der Homologie mit dem publizierten Referenzstamm von 97% (92%-100%). Alle HHV6-Genome wurden als HHV6-B identifiziert.

#### 4.1.3 Ergebnisse der quantitativen PCR

Aus methodischen Gründen wurde nur bei n=12 Patienten eine quantitative PCR lediglich zum Nachweis von PVB19-Genomen durchgeführt. Hiervon gehörten n=11 Patienten der Gruppe 1 und n=1 Patient der Gruppe 2 an. Die Werte lagen zwischen 35 und 6000 PVB19 g.e./ µg m. DNA. Es ergab sich ein Mittelwert von 1029 PVB19 g.e./ µg m. DNA. Die Einzelergebnisse und ihre Zuordnung zur Morphologie sind in den **Tabellen 6-9** ersichtlich.

#### 4.1.4 Ergebnisse der Blutuntersuchungen

Bei n=40 Patienten wurde EDTA-Blut zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme abgenommen und getrennt Buffy coat und Plasma untersucht.

Bei n=33 Patienten fanden sich keine viralen Genome im untersuchten Blut.

Bei n=2 Patienten (Pat. 5, 7) gelang der Nachweis von PVB19-Genomen im Buffy coat.

Bei n=2 Patienten (Pat. 24, 28) fand sich zu dem Nachweis im Buffy coat auch PVB19-virales Genom im Plasma.

N=2 Patienten (Pat. 35, 41) hatten PVB19- und HHV6-viralen Genom im Buffy coat.

Bei lediglich n=1 Patient (Pat. 40) wurde HHV6-Genom im Buffy coat gefunden.

## 4.2 Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bei der Erstbiopsie

Zur Auswertung der Daten wurden die histologischen Diagnosen den Dallas-Kriterien der Myokarditiden und der WHO/ISFC-Klassifikation der Kardiomyopathien zugrunde gelegt.

Ohne Kenntnisse der molekularpathologischen Befunde ergaben sich für die insgesamt 49 Patienten folgende histologischen und immunhistologischen Diagnosen:

**Normalbefund:** n=6

**Aktive Myokarditis:** n=4

**Borderline Myokarditis:** n=16

**DCMi:** n=15

**DCM:** n=5

**Andere Kardiomyopathien:** n=3 (reaktive hypertrophe Kardiomyopathie bei Hypertonie).

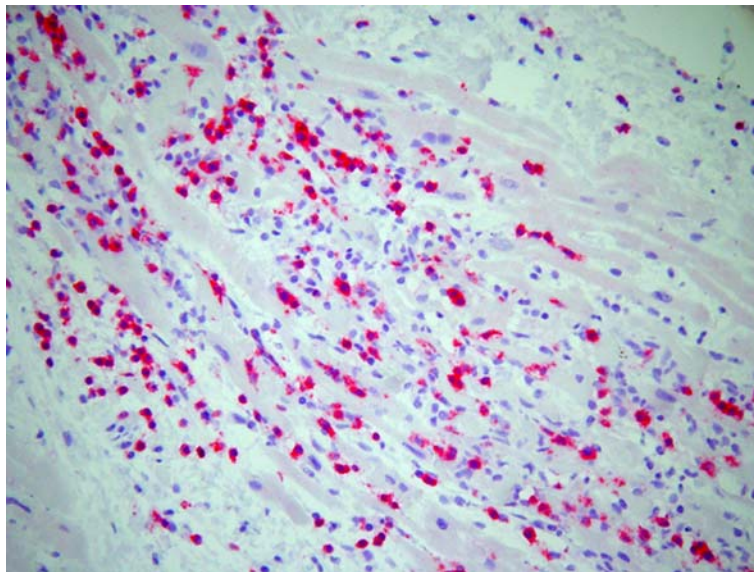
Im Folgenden erfolgt die Beschreibung der histologischen und immunhistologischen Befunde:

#### 4.2.1 Häufigkeit der morphologischen Diagnosen (Dallas-Kriterien und WHO/ISFC-Klassifikation) bei der Erstbiopsie:

- *Aktive Myokarditis*: n=4 (Patient 4, 5, 6, 30)

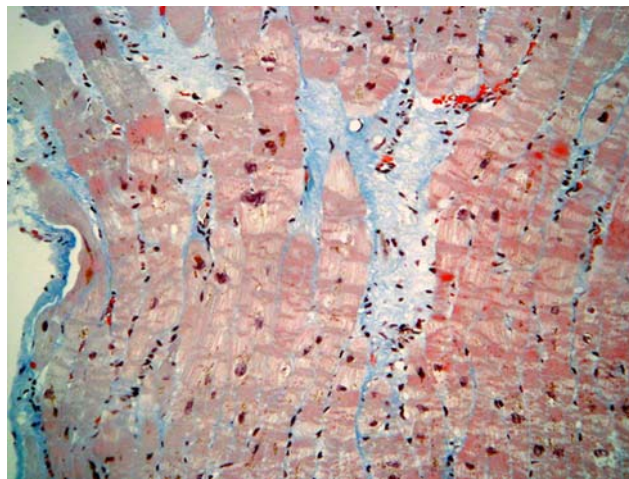
Bei der aktiven Myokarditis konnten fokale oder multifokale Nekroseareale, teils konfluierend, sowie myofibrilläre Degenerationen und ein ausgeprägtes interstitielles Ödem gefunden werden (**Abbildung 14**).

Zudem fand sich ein mononukleäres Infiltrat, das durch reichlich CD3-positive T-Lymphozyten (rot) und CD68-positive Makrophagen (braun) gekennzeichnet war. Die Makrophagen zeigten eine Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen, die ebenfalls in den angrenzenden Kapillarendothelien gefunden wurde (**Abbildung 14**).

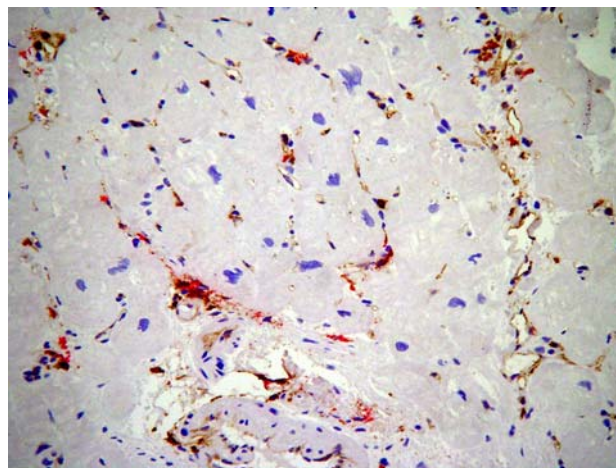


**Abbildung 14:** Aktive PVB19 Myokarditis mit Bereichen myokardaler Nekrosen, die durch CD3-positive Lymphozyten (rot) und PGM1-positive Makrophagen (blau) infiltriert wurden

- *Borderline Myokarditis*: n=16 (Patient 7-14, 31, 32, 36-39, 44, 45)  
Histologisch zeigten sich leichte bis mittelgradige Kaliberschwankungen der Myozyten ohne Myozytennekrosen und eine erhöhte Anzahl an Makrophagen. Das inflammatorische Infiltrat war im Vergleich zu den Patienten mit akuter Myokarditis geringer ausgeprägt und wurde durch CD68-positive Makrophagen dominiert (**Abbildung 15**). Es fanden sich nur vereinzelte CD3- positive T-Lymphozyten. Es konnte eine Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen nicht nur auf den Makrophagen, sondern auch auf den angrenzenden Kapillarendothelien gefunden werden (**Abbildung 16**).



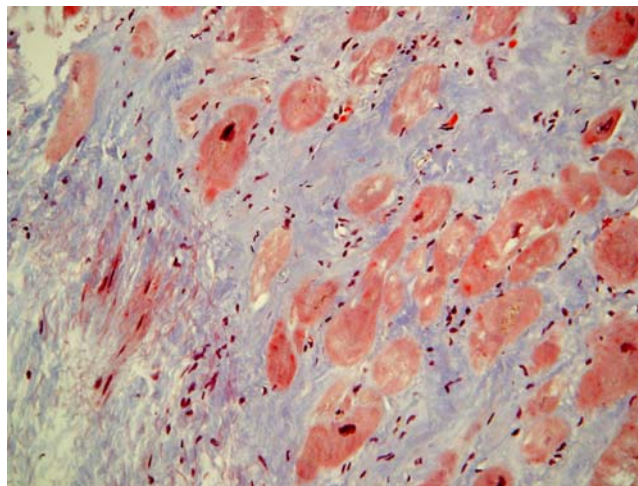
**Abbildung 15: Borderline Myokarditis Histologie (Masson-Trichrom-Färbung)**



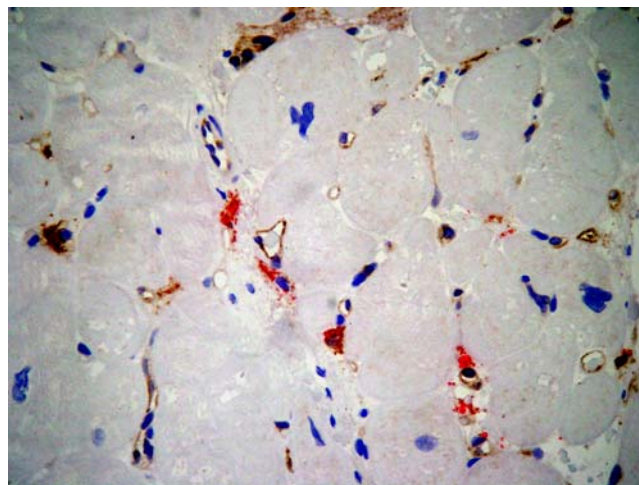
**Abbildung 16: Borderline Myokarditis immunhistologische Doppelfärbung: PGM1-positive Makrophagen (braun)**

- *Dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi):* n=15 (Patienten 18-28, 34, 35, 41, 46)

Die DCMi ist als DCM mit zusätzlicher Inflammation ( $>14$  Leukozyten/mm<sup>2</sup>) definiert (70). Nach der neuen Nomenklatur ist es eine BM mit interstitieller Fibrose. Wie auch bei der BM zeigt sich hier eine erhöhte Anzahl Makrophagen. Das Infiltrat wurde von CD68-positiven Makrophagen dominiert. Vereinzelt fanden sich CD3-positive T-Lymphozyten. Eine Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen in Makrophagen und Kapillarenendothelien war ebenfalls regelmäßig anzutreffen.



**Abbildung 17: Dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation Histologie**

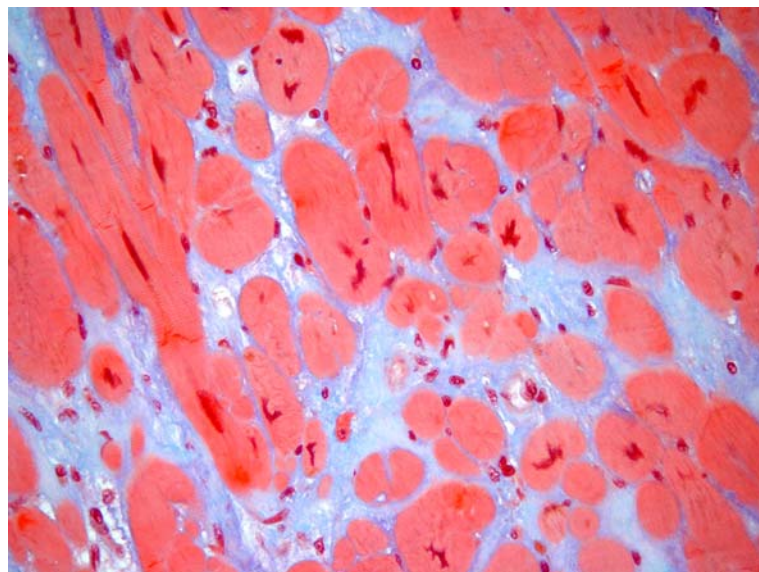


**Abbildung 18: Dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation Immunhistologie**



- *Dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation*: n=5 (Patienten 15-17, 33, 40)

Es zeigte sich eine irreguläre Hypertrophie der Myozyten mit teils hyperchromatischen Zellkernen und einer Vakuolisierung des Sarkoplasmas in Begleitung einer fokalen bis multifokalen oder netzförmigen interstitiellen Fibrosierung (**Abbildung 19**). Es waren keine Entzündungen vorhanden.



**Abbildung 19: Dilatative Kardiomyopathie**

#### **4.2.2 Zuordnung der molekularpathologischen Befunde zu den morphologischen Diagnosen**

Um Informationen über die pathogenetische Bedeutung der molekularpathologischen Befunde im Vergleich zu den morphologischen Diagnosen zu erhalten, wurden die Ergebnisse in **Abbildung 20** gegenübergestellt.

Insgesamt hatten bei der Erstbiopsie n=4 Patienten eine **aktive Myokarditis**, wobei n=3 Patienten der Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-) und n=1 Patient der Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+) angehörten.



Eine **borderline Myokarditis** fand sich bei n=16 Patienten. Hier gehörten n=8 Patienten der Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-), n=2 Patienten der Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+), n=4 Patienten der Gruppe 3 (PVB19-/HHV6+) und n=2 Patienten der Gruppe 4 (PVB19-/HHV6-) an.

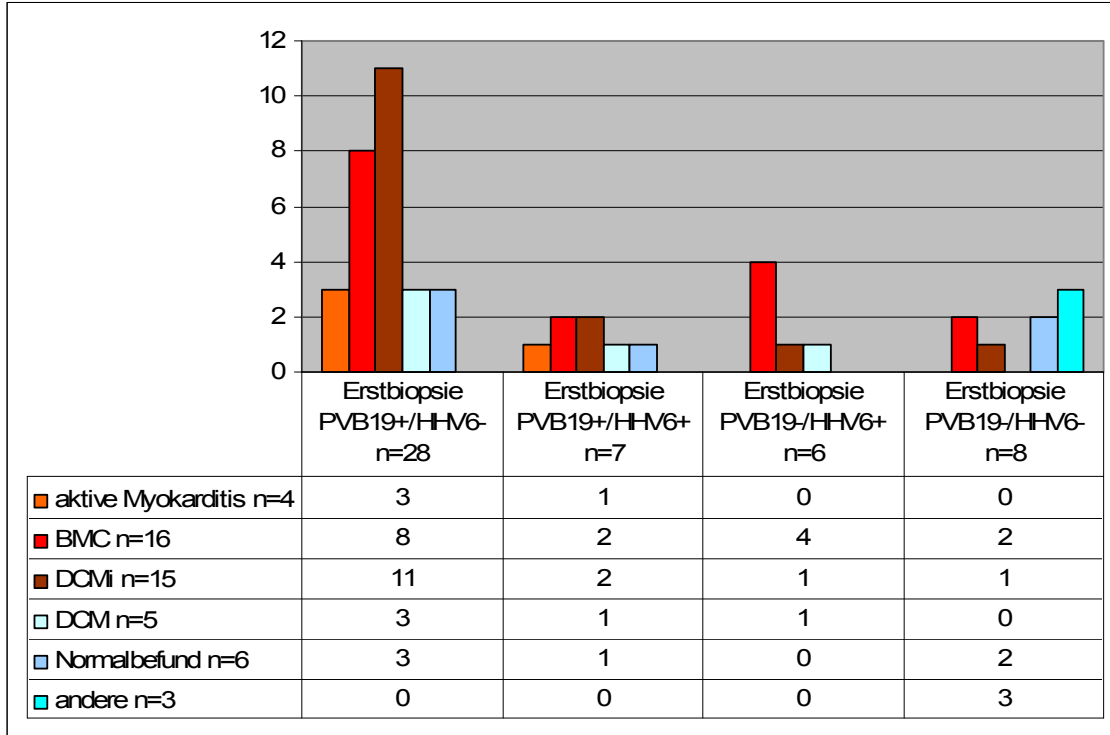
Histologisch zeigte sich bei n=15 Patienten eine **DCMi**. Der Grossteil mit n=11 Patienten gehörte Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-), n=2 Patienten Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+) und jeweils n=1 Patient Gruppe 3 (PVB19-/HHV6+) und Gruppe 4 (PVB19-/HHV6-) an.

N=5 Patienten hatten eine **DCM**. Hiervon fanden sich n=3 Patienten in Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-) und jeweils n=1 Patient in Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+) und Gruppe 3 (PVB19-/HHV6+).

Ein **Normalbefund** zeigte sich bei n=6 Patienten. N=3 Patienten fielen in Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-), n=1 Patient in Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+) und n=2 Patienten in Gruppe 4 (PVB19-/HHV6-).

N=3 Patienten, die alle zu Gruppe 4 (PVB19-/HHV6-) gehörten hatten eine andere Kardiomyopathie, hier eine reaktive hypertrophe Kardiomyopathie bei hypertensiver Herzerkrankung.

**Abbildung 20: Diagramm Übersicht morphologische Diagnosen Erstbiopsie n=49**



### 4.2.3 Tabellen Erstbiopsie

**Tabelle 6: Einzelergebnisse Erstbiopsie Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-)**

Erstbiopsie				
Pat.	Gr.	Histo.	q-PCR (PVB19 g.e./ µg)	n-PCR Buffy-c./Plasma
1	1	N.	/	neg./neg.
2	1	N.	/	neg./neg.
3	1	N.	400	neg./neg.
4	1	AM	782	/
5	1	AM	/	PVB+/neg.
6	1	AM	760	neg./neg.
7	1	BM	105	PVB+/neg.
8	1	BM	510	neg./neg.
9	1	BM	35	neg./neg.

10	1	BM	/	neg./neg.
11	1	BM	2000	neg./neg.
12	1	BM	/	neg./neg.
13	1	BM	/	neg./neg.
14	1	BM	/	neg./neg.
15	1	DCM	/	/
16	1	DCM	505	neg./neg.
17	1	DCM	/	neg./neg.
18	1	DCMi	60	neg./neg.
19	1	DCMi	/	/
20	1	DCMi	/	neg./neg.
21	1	DCMi	833	neg./neg.
22	1	DCMi	/	neg./neg.
23	1	DCMi	6000	neg./neg.
24	1	DCMi	/	PVB+/PVB+
25	1	DCMi	/	neg./neg.
26	1	DCMi	/	neg./neg.
27	1	DCMi	/	neg./neg.
28	1	DCMi	/	PVB+/PVB+

**Legende Erstbiopsie:**

Pat.: Patientenummer

Gr.: Gruppennummer

Histo.: Histologischer Befund

q-PCR (PVB19 g.e./ µg): quantitative PCR zur Ermittlung der Viruslast PVB19 (PVB19 genome equivalent/ µg myokardiale DNA)

n-PCR Buffy-c./Plasma: PCR zur Abklärung einer systemischen Virusbelastung im Buffy-coat oder Plasma

Gruppe 1: PVB19+/HHV6-

Gruppe 2: PVB19+/HHV6+

Gruppe 3: PVB19-/HHV6+

Gruppe 4: PVB19-/HHV6-

N: Normalbefund

AM: Aktive Myokarditis

BM: Borderline Myokarditis

DCM: Dilatative Kardiomyopathie

DCMi: Inflammatorische dilatative Kardiomyopathie (nach der neuen Nomenklatur BM mit interstitieller Fibrose)

RH: Reaktive hypertrophe Kardiomyopathie bei hypertensiver Herzerkrankung

**Tabelle 7: Einzelergebnisse Erstbiopsie Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+)**

Erstbiopsie					
Pat.	Gr.	Histo.	q-PCR (PVB19 g.e./ µg)	n-PCR coat/Plasma	Buffy-
29	2	N.	/	neg./neg.	
30	2	AM	/	/	
31	2	BM	/	neg./neg.	
32	2	BM	/	neg./neg.	
33	2	DCM	/	neg./neg.	
34	2	DCMi	358	neg./neg.	
35	2	DCMi	/	PVB+, HHV+/neg.	

**Tabelle 8: Einzelbetrachtung Erstbiopsie Gruppe 3 (PVB19-/HHV6+)**

Erstbiopsie					
Pat.	Gr.	Histo.	q-PCR (PVB19 g.e./ µg)	n-PCR	Buffy-coat/Plasma
36	3	BM	/	neg./neg.	
37	3	BM	/	neg./neg.	
38	3	BM	/	neg./neg.	
39	3	BM	/	neg./neg.	
40	3	DCM	/	HHV+/neg.	
41	3	DCMi	/	PVB+, HHV+/neg.	

**Tabelle 9: Einzelbetrachtung Erstbiopsie Gruppe 4 (PVB19-/HHV6-)**

Erstbiopsie				
Pat.	Gr.	Histo.	q-PCR (PVB19 g.e./ µg)	PCR coat/Plasma Buffy-
42	4	N.	/	neg./neg.
43	4	N.	/	neg./neg.
44	4	BM	/	/
45	4	BM	/	/
46	4	DCMi	/	neg./neg.
47	4	RH	/	/
48	4	RH	/	/
49	4	RH	/	/

#### 4.2.4 Zuordnung weiterer molekularpathologischer und klinischer Befunde zu den einzelnen Gruppen: klinisch-pathologische Klassifizierung der Myokarditis

Basierend auf den Ergebnissen der histologischen und PCR-Befunde wurden zusätzliche klinische und molekularpathologische Informationen den Gruppen einzeln zugeordnet. Folgende Parameter wurden berücksichtigt:

- Quantitative PVB19-Viruslast.
- Nachweis von viralen Genomen im peripheren Blut.
- Klinische Parameter wie klinische Indikation, kardialer Erkrankungsbeginn, NYHA und linksventrikuläre Ejektionsfraktion.

Folgend werden die Einzelergebnisse nach Gruppen vorgestellt.

#### 4.2.5 Gruppe 1 (PVB19+, HHV6-) Erstbiopsie n=28

##### 4.2.5.1 Akute Myokarditis: n=3 (Pat. 4-6)

###### Histologie: aktive Myokarditis

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Bei 2 Patienten fanden sich Angaben zur quantitativen Viruslast:

Die quantitative PVB19-Viruslast lag bei 782 und 760 g.e./ µg m. DNA (Pat. 4, 6).

- **Buffy-coat/Plasma:**

Eine Blutuntersuchung erfolgte bei 2 Patienten:

Es fand sich der Nachweis von PVB19 im Buffy-coat (Pat. 5).

Die Blutbefunde waren negativ (Pat. 6).

- **Klinische Indikation:**

Bei einem Patienten war eine klinische Diagnose angegeben:

1 Patient hatte die Diagnose einer akuten Myokarditis oder DCM (Pat.4).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Bei einem Patienten gab es hierzu Angaben:

Seit 1 Monat lagen kardiale Beschwerden vor (Pat. 5).

- **NYHA:**

Es wurden keine Informationen zum NYHA-Index gemacht.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu lagen keine Daten vor.

Aufgrund dieser Befunde handelt es sich zumindest bei Patient 5 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine **akute** PVB19-assoziierte Myokarditis charakterisiert durch einen erst kürzlich zurückliegenden Krankheitsbeginn, eine histologisch gesicherte aktive Myokarditis und einer allerdings geringen Viruslast in der Endomyokardbiopsie bei gleichzeitig bestehender PVB19-Virämie. Es liegt zumindest bei den Patienten 4 und 6 eine **akute** PVB19-Virusinfektion vor.

#### 4.2.5.2 Chronisch aktive Myokarditis ohne Fibrose: n=8 (Pat. 7-14)

##### Histologie: borderline Myokarditis

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Daten zur quantitativen PVB19-Viruslast gab es bei 4 Patienten:

Sie lag bei 35, 105, 510, 2000 g.e./ µg m. DNA (Pat. 9, 7, 8, 11).

- **Buffy-coat/Plasma:**

Bei allen Patienten dieser Gruppe wurden Blutuntersuchungen durchgeführt:

Es fand sich der Nachweis von PVB19 im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma (Pat. 7).

Es fanden sich ansonsten negative Blutbefunde (Pat. 8-14).

- **Klinische Indikation:**

Bei 6 Patienten gab es dazu Angaben:

2 Patienten mit der klinischen Diagnose einer akuten Myokarditis (Pat. 8, 9).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer DCM (Pat. 11).

2 Patienten mit der klinischen Diagnose einer akuten Myokarditis oder DCM (Pat. 7, 12).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis oder DCM (Pat. 14).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es bei 3 Patienten Daten:

Der kardiale Erkrankungsbeginn lag bei 2, 4 und 6 Monaten (Pat. 14, 12, 7).

- **NYHA:**

Bei 4 Patienten wurde der NYHA-Index angegeben:

1 Patient hatte einen NYHA-Index von II (Pat. 11).

2 Patienten hatten einen NYHA-Index von III (Pat. 12, 14).

1 Patient hatte einen NYHA-Index von IV (Pat. 7).

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es bei 2 Patienten klinische Informationen:

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag bei 15% und 35% (Pat. 14, 12).



Aufgrund dieser Befunde handelt es sich zumindest bei den Patienten 7, 12 und 14 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine **chronisch aktive** PVB19-assoziierte **Myokarditis** charakterisiert durch die zeitlich mittlere Dauer der Erkrankung (2-6 Monate), die histologisch gesicherte borderline Myokarditis, die geringe Viruslast in der Endomyokardbiopsie und die PVB19-Virämie bei Patient 7. Es handelt sich zumindest bei den Patienten 9, 7, 8 und 11 um eine **persistierende** PVB19-Infektion.

#### 4.2.5.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=11 (Pat. 18-28)

##### Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi)

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Die quantitative PVB19-Viruslast wurde bei 3 Patienten angegeben:

Sie lag bei 60, 830 und 6000 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA (Pat. 18, 21, 23).

- **Buffy-coat/Plasma:**

Bei 10 Patienten dieser Gruppe wurden Blutuntersuchungen durchgeführt:

2 Patienten hatten den Nachweis von PVB19 im Buffy-coat und Plasma (Pat. 24, 28).

Es fanden sich 8 Patienten mit negativen Blutbefunden (Pat. 18, 20-23, 25-27).

Lediglich 1 Patient hatten keine Blutuntersuchung (Pat. 19).

- **Klinische Indikation:**

Bei allen Patienten gab es dazu Angaben:

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer akuten Myokarditis (Pat. 28).

2 Patienten mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis (Pat. 24, 25).

3 Patienten mit der klinischen Diagnose einer DCM (Pat. 19, 21, 23).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer akuten Myokarditis oder DCM (Pat. 18).

3 Patienten mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis oder DCM (Pat. 20, 22, 27).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis oder Speicherkrankheit (Pat. 26).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Dazu wurden bei 7 Patienten Angaben gemacht (Pat. 19-22, 24-26):

Der kardiale Erkrankungsbeginn lag zwischen 1-36 Monaten.

Bei 6 Patienten lag der Erkrankungsbeginn zwischen 1-5 Monaten (Pat. 20-22, 24-26), lediglich Pat. 19 hatte schon 36 Monate vor EMB kardiale Probleme.

- **NYHA:**

Bei 3 Patienten wurde der NYHA-Index angegeben:

1 Patient hatte einen NYHA-Index von I (Pat. 23).

2 Patienten hatten einen NYHA-Index von III (Pat. 20, 22).

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu fanden sich bei 4 Patienten klinische Informationen:

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag bei 15%, 34%, 35% und 50% (Pat. 22, 27, 20, 21).

Aufgrund dieser Befunde handelt es sich bei den Patienten 19-22 und 24-26 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine PVB19-assoziierte **chronisch aktive Myokarditis**. Sie ist charakterisiert durch eine mittlere Erkrankungsdauer, eine geringe Viruslast in der Endomyokardbiopsie bei Patient 21 und eine histologisch gesicherte borderline Myokarditis mit erkennbarer Fibrose und Remodelling des Myokards als Zeichen eines chronischen Krankheitsverlaufs. Eine PVB19-Virämie lag bei den Patienten 24 und 28 vor. Es handelt sich zumindest bei den Patienten 18, 21 und 23 um eine **persistierende** PVB19-Infektion.

#### 4.2.5.4 Dilatative Kardiomyopathie n=3 (Pat. 15-17)

##### Histologie: dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation (DCM)

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Die quantitative PVB19-Viruslast wurde bei 1 Patient angegeben:

Sie lag bei 505 g.e./ µg m. DNA (Pat. 16).

- **Buffy-coat/Plasma:**

Bei 2 Patienten dieser Gruppe wurden Blutuntersuchungen durchgeführt:

Beide Patienten hatten keine Virusbelastung im Blut (Pat. 16, 17).

- **Klinische Indikation:**

Bei allen Patienten gab es hierzu Angaben:

2 Patienten mit der klinischen Diagnose einer akuten Myokarditis (Pat. 15, 17).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis (Pat. 16).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es bei einem Patienten Daten (Pat.17):

Der Erkrankungsbeginn bis zur EMB lag bei 24 Monaten.

- **NYHA:**

Hierzu gab es keine Informationen.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es keine Angaben.

Zumindest bei Patient 16 lag eine **latente** PVB19-Virusinfektion vor.

Histologisch zeigte sich eine dilatative Kardiomyopathie ohne Begleitentzündung.

#### 4.2.6 Gruppe 2 (PVB19+, HHV6+): n=7

##### 4.2.6.1 Akute Myokarditis: n=1 (Pat. 30)

###### Histologie: aktive Myokarditis

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Hierzu gab es keine Daten.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es wurde kein Blut untersucht.

- **Klinische Indikation:**

Es lag die klinische Diagnose einer akuten Myokarditis vor.

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es keine Angaben

- **NYHA:**

Hierzu gab es keine Informationen.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es keine Angaben.

Aufgrund der histologischen Befunde kann bei diesem Patienten eine **akute** HHV6-assoziierte PVB19-Myokarditis vermutet werden. Ebenso kann eine **akute** Virusinfektion angenommen werden.

#### 4.2.6.2 Chronische aktive Myokarditis ohne Fibrose n=2 (Pat. 31, 32)

##### Histologie: borderline Myokarditis

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es lagen keine Informationen vor.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es lagen bei beiden Patienten virusnegative Blutuntersuchungen vor.

- **Klinische Indikation:**

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis (Pat. 31).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer akuten Myokarditis oder DCM (Pat. 32).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Die Erkrankungsdauer bis zur EMB lag bei beiden Patienten bei 2 Monaten.

- **NYHA:**

1 Patient hatte einen NYHA-Index von II (Pat. 31).

1 Patient hatte einen NYHA-Index von IV (Pat. 32).

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag bei 20% und 55% (Pat. 32, 31).

Aufgrund dieser Befunde handelt es sich bei den Patienten 31 und 32 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine HHV6-assoziierte **chronisch aktive PVB19-Myokarditis** bei mittlerer Erkrankungsdauer (2 Monate) und histologisch gesicherter borderline Myokarditis. Da keine Angaben zur q-PCR vorlagen kann nur vermutet werden, dass es sich um eine HHV6-assoziierte **persistierende** PVB19-Infektion handelt.

#### 4.2.6.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=2 (Pat. 34, 35)

##### Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi)

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Die quantitative PVB19-Viruslast war bei 358 g.e./ µg m. DNA (Pat. 34).

- **Buffy-coat/Plasma:**

1 Patient mit dem Nachweis von PVB19 und HHV6 im Buffy-coat (Pat. 35).

1 Patient mit negativem Blutbefund (Pat. 34).

- **Klinische Indikation:**

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis (Pat. 34).

1 Patient mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis oder DCM (Pat. 35).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Der kardiale Erkrankungsbeginn lag bei 3 und 10 Monaten vor EMB (Pat. 35, 34).

- **NYHA:**

Es lagen keine Daten vor.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Es lagen keine Informationen vor.

Aufgrund dieser Befunde handelt es sich bei den Patienten 34 und 35 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine **chronisch aktive Myokarditis** bei etwas länger zurückliegendem Erkrankungsbeginn, geringer Viruslast in der Endomyokardbiopsie bei Patient 34 und einer Virämie bei Patient 35. Histologisch gesichert ist eine borderline Myokarditis mit erkennbarer Fibrose und Remodelling des Myokards als Zeichen eines chronischen Krankheitsverlaufs. Es handelt sich zumindest bei Patient 34 um eine HHV6-assoziierte **persistierende** PVB19-Infektion.

#### 4.2.6.4 Dilatative Kardiomyopathie n=1 (Pat. 33)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation (DCM)**

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es lagen keine Daten vor.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es gab keine Virusbelastung im Blut.

- **Klinische Indikation:**

Es lag die klinische Diagnose einer DCM vor.

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Es lagen keine Informationen vor.

- **NYHA:**

Es lagen keine Daten vor.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Es lagen keine Angaben vor.

Es handelt sich hier um eine HHV6-assoziierte **latente** PVB19-Virusinfektion.

#### 4.2.7 Gruppe 3 (PVB19-, HHV6+) n=6

##### 4.2.7.1 Akute Myokarditis

**Histologie: aktive Myokarditis**

Kein Patient dieser Gruppe hatte eine akute Myokarditis.

#### 4.2.7.2 Chronisch aktive Myokarditis ohne Fibrose n=4 (Pat. 36-39)

##### Histologie: borderline Myokarditis

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es gab hierzu keine Informationen.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Alle 4 Patienten hatten negative Blutbefunden (Pat. 36-39).

- **Klinische Indikation:**

Es wurden bei 2 Patienten dazu Angaben gemacht:

2 Patienten mit der klinischen Diagnose einer chronischen Myokarditis (Pat. 36, 37).

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es keine Angaben.

- **NYHA:**

Bei 2 Patienten wurde der NYHA-Index angegeben:

1 Patient hatte einen NYHA-Index von I (Pat. 36).

1 Patient hatte einen NYHA-Index von III (Pat. 39).

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es bei 3 Patienten klinische Informationen:

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion lag bei 42%, 48% und 60% (Pat. 37, 36, 39).

Aufgrund der fehlenden Erkrankungszeiten, kann lediglich angenommen werden, dass es sich bei diesen Patienten nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine **chronisch aktive** HHV6-assoziierte Myokarditis bei histologisch gesicherter borderline Myokarditis handelt. Ebenso kann eine HHV6-assoziierte **persistierende** oder reaktivierte Viruserkrankung vermutet werden.



#### 4.2.7.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=1 (Pat. 41)

##### Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi)

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es gab hierzu keine Informationen.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es fand sich eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma vor.

- **Klinische Indikation:**

Es lag die klinische Diagnose einer chronischen Myokarditis vor.

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Der kardiale Erkrankungsbeginn vor EMB lag bei wenigen Tagen.

- **NYHA:**

Es lagen keine Daten vor.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es keine Angaben.

Aufgrund dieser Befunde handelt es sich bei Patient 41 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation um eine HHV6-assoziierte **chronisch aktive Myokarditis** allerdings mit kurzer Erkrankungsdauer bei histologisch gesicherter borderline Myokarditis mit erkennbarer Fibrose und Remodelling des Myokards als Zeichen eines chronischen Krankheitsverlaufs. Es lag eine HHV6-Virämie vor.

#### 4.2.7.4 Dilatative Kardiomyopathie n=1 (Pat. 40)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation (DCM)**

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es gab hierzu keine Informationen.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es lag eine HHV6-Belastung im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma vor.

- **Klinische Indikation:**

Es fand sich die klinische Diagnose einer chronischen Myokarditis.

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es keine Angaben.

- **NYHA:**

Hierzu gab es keine Informationen.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es keine Daten.

Es kann bei Patient 40 eine **latente** HHV6-Virusinfektion angenommen werden.

#### 4.2.8 Gruppe 4 (PVB19-, HHV6-) n=8

##### 4.2.8.1 Akute Myokarditis

**Histologie: aktive Myokarditis**

Kein Patient der Gruppe 4 hatte bei der Erstbiopsie eine akute Myokarditis.

#### 4.2.8.2 Chronisch aktive Myokarditis ohne Fibrose n=2 (Pat. 44, 45)

##### Histologie: borderline Myokarditis

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es gab hierzu keine Informationen.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es wurden keine Blutuntersuchungen durchgeführt.

- **Klinische Indikation:**

Beide Patienten hatten die klinische Diagnose einer akuten Myokarditis.

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es keine Angaben.

- **NYHA:**

Hierzu gab es keine Informationen.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es keine Daten.

Aufgrund dieser Befunde kann bei den Patienten 44 und 45 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation eine virus-negative **chronisch aktive** Myokarditis bei histologisch gesicherter borderline Myokarditis lediglich vermutet werden.

#### 4.2.8.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=1 (Pat. 46)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi)**

- **Quantitative PVB19-Viruslast:**

Es gab hierzu keine Informationen.

- **Buffy-coat/Plasma:**

Es lag keine Virusbelastung im Blut vor.

- **Klinische Indikation:**

Als klinische Diagnose zur EMB wurde eine akute Myokarditis angegeben.

- **Kardialer Erkrankungsbeginn:**

Hierzu gab es keine Angaben.

- **NYHA:**

Hierzu gab es keine Informationen.

- **Linksventrikuläre Ejektionsfraktion:**

Hierzu gab es keine Daten.

Aufgrund fehlender Befunde kann bei Patient 46 nach der neuen klinisch-pathologischen Baughman-Klassifikation eine virus-negative **chronisch aktive Myokarditis** bei histologisch gesicherter borderline Myokarditis mit erkennbarer Fibrose und Remodelling des Myokards als Zeichen eines chronischen Krankheitsverlaufs vermutet werden.

#### 4.2.8.4 Dilatative Kardiomyopathie

**Histologie: dilatative Myokarditis ohne Inflammation (DCM)**

In Gruppe 4 hatte kein Patient eine DCM.

## 5 Ergebnisse der konsekutiven Biopsien

Bei der konsekutiven Endomyokardbiopsie (folgend k-EMB genannt) kam noch eine **5. Gruppe** dazu. Bei diesen Patienten fand sich bei den Erstbiopsien ein positiver Nachweis von PVB19 und/oder HHV6. Es zeigte sich bei den k-EMBs jedoch kein Hinweis mehr auf PVB19 und/oder HHV6.

Gruppeneinteilung bei der Konsekutivbiopsie:

**Gruppe 1:** PVB19 positiv und HHV6 negativ

**Gruppe 2:** PVB19 und HHV6 positiv

**Gruppe 3:** PVB19 negativ und HHV6 positiv

**Gruppe 4:** PVB19 und HHV6 negativ

**Gruppe 5:** Bei der Erstbiopsie PVB19-und/oder HHV6- Virus positiv, bei k-EMB virusnegativ.

Die Ergebnisse aus den molekularpathologischen, histologischen und immunhistologischen Daten sind patienten- und gruppenorientiert in den **Tabellen 10-13** zusammengefasst.

### 5.1 Molekularpathologische Daten bei den konsekutiven Biopsien

#### 5.1.1 Prävalenz von PVB19 und HHV6 bei den konsekutiven Biopsien im Vergleich zur Erstbiopsie

Die Ergebnisse der k-EMBs sind in **Abbildung 22** dargestellt: 65,9% der Patienten des Patientenkollektivs, das sind 27/41 Personen, sind bei der letzten Biopsie PVB19 positiv. 17,1% der Patienten (7/41) haben eine Doppelinfektion

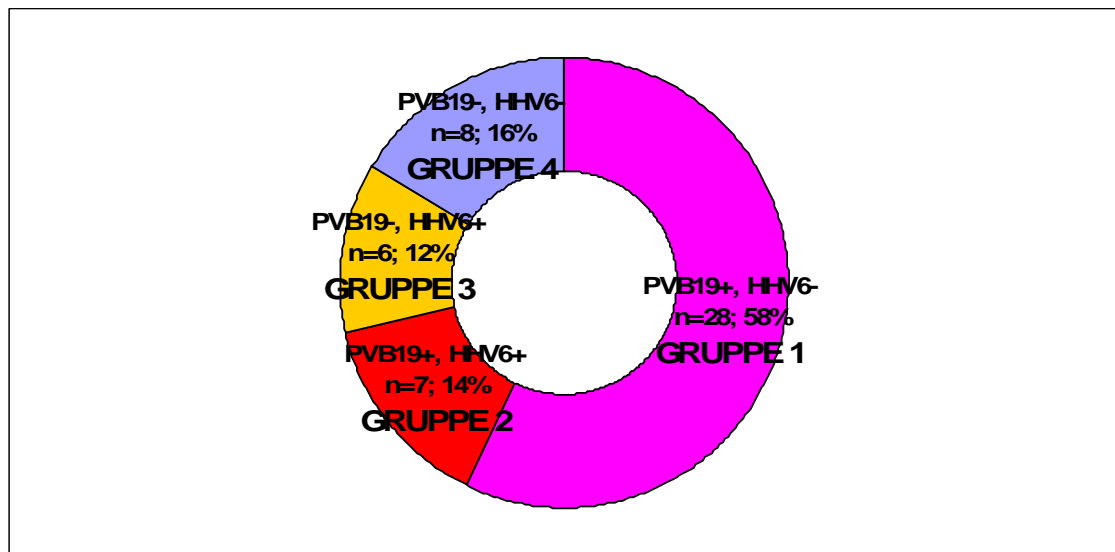
mit PVB19 und HHV6. Wiederum 17,1% (7/41) der Patienten sind bei der letzten Biopsie sowohl PVB19, als auch HHV6 negativ.

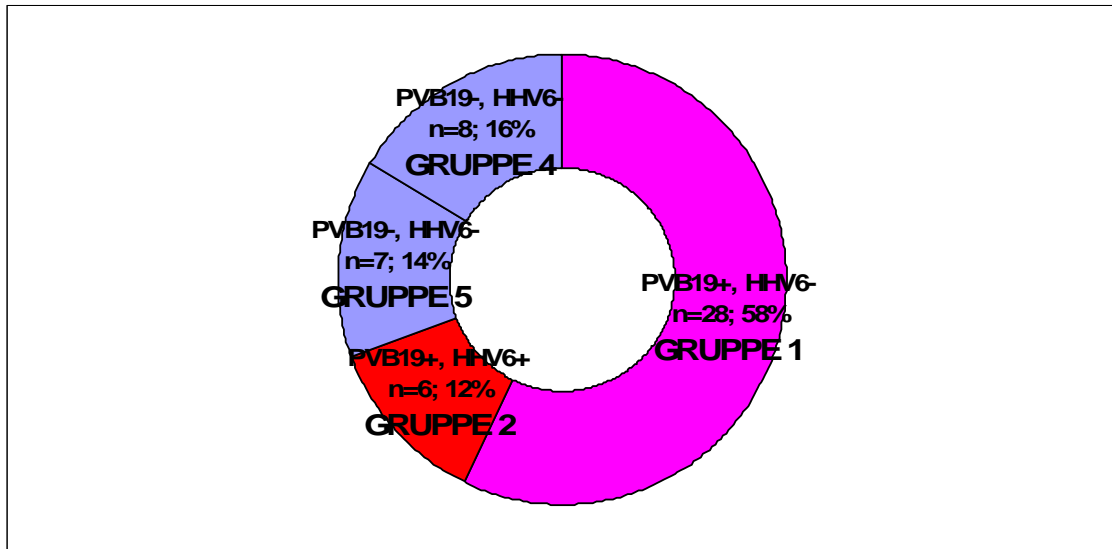
Bei Gruppe 4 bleiben alle Patienten PVB19- und HHV6-negativ.

Im Vergleich der Erstbiopsien (**Abbildung 21**) zu den letzten Biopsien (**Abbildung 22**) findet man folgende Ergebnisse:

28 Patienten waren bei der Erstbiopsie PVB19 positiv, das sind 58% der Patienten des Patientenkollektivs. Ihre Zahl ist bei der letzten Biopsie gleich geblieben. Die Anzahl der Patienten mit einer PVB19- und HHV6-Doppelinfection ist mit 6 Personen (12%) um eine Person verringert. Die Anzahl der PVB19 und HHV6-negativen Personen ist auf 7 gestiegen. Es gibt keinen HHV6-positiven Patienten mehr.

**Abbildung 21: Prävalenz PVB19 und HHV6 bei Erstbiopsie n=49**



**Abbildung 22: Prävalenz PVB19 und HHV6 bei k-EMB n=49**

### 5.1.2 Die Sequenzierung bei konsekutiven Biopsien

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde wiederum mittels einer automatischen DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab für PVB19 einen Median der Homologie mit dem publizierten Referenzstamm von 97% (92%-100%). Die PVB19-Isolate waren bei den Erst- und Mehrfachbiopsien für jeden Patienten jeweils identisch. Es handelte sich also bei den Erkrankungen nicht um Neuinfektionen, sondern um persistierende oder latente Infektionen. Alle HHV6-Genome wurden wie auch bei den Erstbiopsien als HHV6-B identifiziert.

## 5.1.3 Tabellen konsekutive Biopsien

Tabelle 10: Einzelergebnisse k-EMB Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-)

Erstbiopsie					Konsekutivbiopsie				
Pa t.	Gr	Histo.	q- PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma	d	Gr.	Histo	q- PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma
1	1	N.	/	neg./neg.	191	1	N.	/	neg./neg.
2	1	N.	/	neg./neg.	181	1	BM	/	neg./neg.
3	1	N.	400	neg./neg.	287	1	BM	482	neg./HHV+
4	1	AM	782	/	49	2	CM	3000	PVB+, HHV+/neg.
5	1	AM	/	PVB+/neg.	31	1	CM	/	/
6	1	AM	760	neg./neg.	216	1	DCM	24	neg./neg.
7	1	BM	105	PVB+/neg.	84	1	CM	165	neg./neg.
8	1	BM	510	neg./neg.	183	1	CM	814	neg./neg.
9	1	BM	35	neg./neg.	372	5	CM	/	neg./neg.
10	1	BM	/	neg./neg.	293	1	DCM	561	neg./neg.
11	1	BM	2000	neg./neg.	265	1	DCM	650	neg./neg.
12	1	BM	/	neg./neg.	823	1	DCM	/	neg./neg.
13	1	BM	/	neg./neg.	206	1	DCMi	384	neg./neg.
14	1	BM	/	neg./neg.	187	1	DCMi	/	neg./neg.
15	1	DCM	/	/	182	1	DCM	/	/
16	1	DCM	505	neg./neg.	151	1	DCM	143	neg./neg.
17	1	DCM	/	neg./neg.	270	1	DCM	/	neg./neg.
18	1	DCMi	60	neg./neg.	372	1	DCM	317	neg./neg.
19	1	DCMi	/	/	97	1	DCM	/	/
20	1	DCMi	/	neg./neg.	143	1	DCMi	/	neg./neg.



21	1	DCMi	833	neg./neg.	195	1	DCMi	608	neg./neg.
22	1	DCMi	/	neg./neg.	359	1	DCMi	88	neg./neg.
23	1	DCMi	6000	neg./neg.	696	1	DCMi	97	neg./neg.
24	1	DCMi	/	PVB+/PVB+	204	1	DCMi	/	/
25	1	DCMi	/	neg./neg.	232	1	DCMi	/	neg./neg.
26	1	DCMi	/	neg./neg.	174	1	DCMi	/	/
27	1	DCMi	/	neg./neg.	295	1	DCMi	/	/
28	1	DCMi	/	PVB+/PVB+	216	1	DCMi	/	PVB+, HHV+/neg.

**Legende k-EMB:**

Pat.: Patientennummer

Gr.: Gruppennummer

Histo.: Histologischer Befund

d: Zeitabstand in Tagen zwischen Biopsien

q-PCR PVB19: quantitative PCR zur Ermittlung der Viruslast

PVB19 (PVB19 genome equivalent/ µg myokardiale DNA)

n-PCR Bufo./Plasma: PCR zur Abklärung einer systemischen  
Virusbelastung im Buffy-coat oder Plasma

Gruppe 1: PVB19+/HHV6-

Gruppe 2: PVB19+/HHV6+

Gruppe 3: PVB19-/HHV6+

Gruppe 4: PVB19-/HHV6-

Gruppe 5: Bei der Erstbiopsie PVB19-und/oder HHV6-Virus  
positiv, bei konsekutiven Biopsie virusnegativ

N: Normalbefund

AM: Aktive Myokarditis

CM: Chronische Myokarditis

<p>BM: Borderline Myokarditis</p> <p>DCM: Dilatative Kardiomyopathie</p> <p>DCMi: Inflammatorische dilatative Kardiomyopathie (nach der neuen Nomenklatur BM mit interstitieller Fibrose)</p> <p>RC: Reaktive Kardiomyopathie</p> <p>RH: Reaktive hypertrophe Kardiomyopathie bei hypertensiver Herzerkrankung</p> <p>HCM: Hypertrophe nicht obstruktive Kardiomyopathie</p>
--

**Tabelle 11: Einzelergebnisse k-EMB Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+)**

Erstbiopsie					Konsekutivbiopsie				
Pat	Gr	Histo.	q-PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma	d	Gr	Histo	q-PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma
29	2	N.	/	neg./neg.	232	5	N.	/	/
30	2	AM	/	/	81	2	CM	/	neg./neg.
					125	2	CM	/	neg./neg.
					114	1	CM	/	neg./neg.
					308	1	CM	/	neg./neg.
31	2	BM	/	neg./neg.	217	2	CM	/	HHV+/ HHV+
32	2	BM	/	neg./neg.	1205	2	DCMi	13	neg./neg.
33	2	DCM	/	neg./neg.	284	2	DCMi	/	/
34	2	DCMi	/	neg./neg.	199	2	DCMi	455	HHV+/neg
35	2	DCMi	/	PVB19+, HHV+/neg.	339	2	DCMi	/	HHV+/neg

**Tabelle 12: Einzelbetrachtung k-EMB Gruppe 3 (PVB19-/HHV6+)**

Erstbiopsie					Konsekutivbiopsie				
Pa t.	Gr.	Histo.	q- PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma	d	Gr	Histo.	q- PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma
36	3	BM	/	neg./neg.	152	5	N.	/	neg./neg.
37	3	BM	/	neg./neg.	150	5	DCM	/	neg./neg.
38	3	BM	/	neg./neg.	269	5	DCMi	/	neg./neg.
39	3	BM	/	neg./neg.	189	3	CM	/	neg./neg.
					413	5	RC	/	neg./neg.
40	3	DCM	/	HHV+/neg.	192	5	DCMi	/	neg./neg.
41	3	DCMi	/	PVB+, HHV+/neg.	353	1	DCM	/	PVB+, HHV+/neg.

**Tabelle 13: Einzelbetrachtung k-EMB Gruppe 4 (PVB19-/HHV6-)**

Erstbiopsie					Konsekutivbiopsie				
Pat	Gr	Histo.	q- PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma	d	Gr	Histo.	q- PCR PVB 19	n-PCR Bufc./Plas ma
42	4	N.	/	neg./neg.	258	4	DCM	/	neg./neg.
43	4	N.	/	neg./neg.	270	4	DCM	/	neg./neg.
44	4	BM	/	/	298	4	DCM	/	neg./neg.
45	4	BM	/	/	32	4	DCM	/	neg./neg.
46	4	DCMi	/	neg./neg.	191	4	DCMi	/	neg./neg.
47	4	RH	/	/	160	4	N.	/	neg./neg.
48	4	RH	/	/	295	4	HCM	/	HHV+/neg
49	4	RH	/	/	69	4	Glykog enose Pompe	/	/

## 5.2 Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bei der konsekutiven Biopsie

Zur Auswertung der Daten wurden wie auch bei der Erstbiopsie die histologischen Diagnosen den Dallas-Kriterien der Myokarditiden und der WHO/ISFC-Klassifikation der Kardiomyopathien zugeordnet.

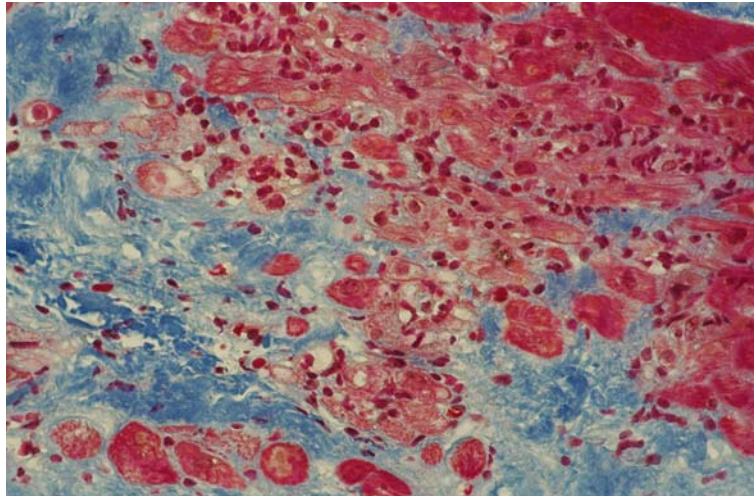
Ohne Kenntnisse der molekularpathologischen Befunde ergaben sich für die k-EMB folgende histologischen und immunhistologischen Diagnosen:

**Normalbefund:** n=4 (Pat. 1, 29, 36, 47).

**Borderline Myokarditis:** n=2. Hierbei handelte es sich um Patienten, die bei der Erstbiopsie einen Normalbefund hatten (Pat.2, 3).

**Chronische Myokarditis:** n=7 (Pat. 4, 5, 7-9, 30, 31).

Die Diagnose „chronische Myokarditis“ kann entsprechend der Dallas-Klassifikation nur bei einer konsekutiven Biopsie erfolgen, da nur durch den Vergleich mit einer vorher durchgeführten Biopsie die Chronifizierung diagnostizierbar ist. Eine chronische Myokarditis erfordert ein inflammatorisches Infiltrat von ähnlicher Ausdehnung wie bei der Erstbiopsie (119). Ähnlich wie bei einer borderline Myokarditis manifestiert sie sich durch geringe/fehlende Myozytennekrosen mit oder ohne interstitielle Fibroseareale. Ihr Verlauf kann sich unterteilen in eine abheilende (healing) oder abgeheilte (healed) Form (119).



**Abbildung 23: Chronische Myokarditis mit interstitieller Fibrose**

**DCMi:** n=15 (Patient 13, 14, 20-28, 32-35, 38, 40, 46). Nach der neuen Nomenklatur BM mit interstitieller Fibrose.

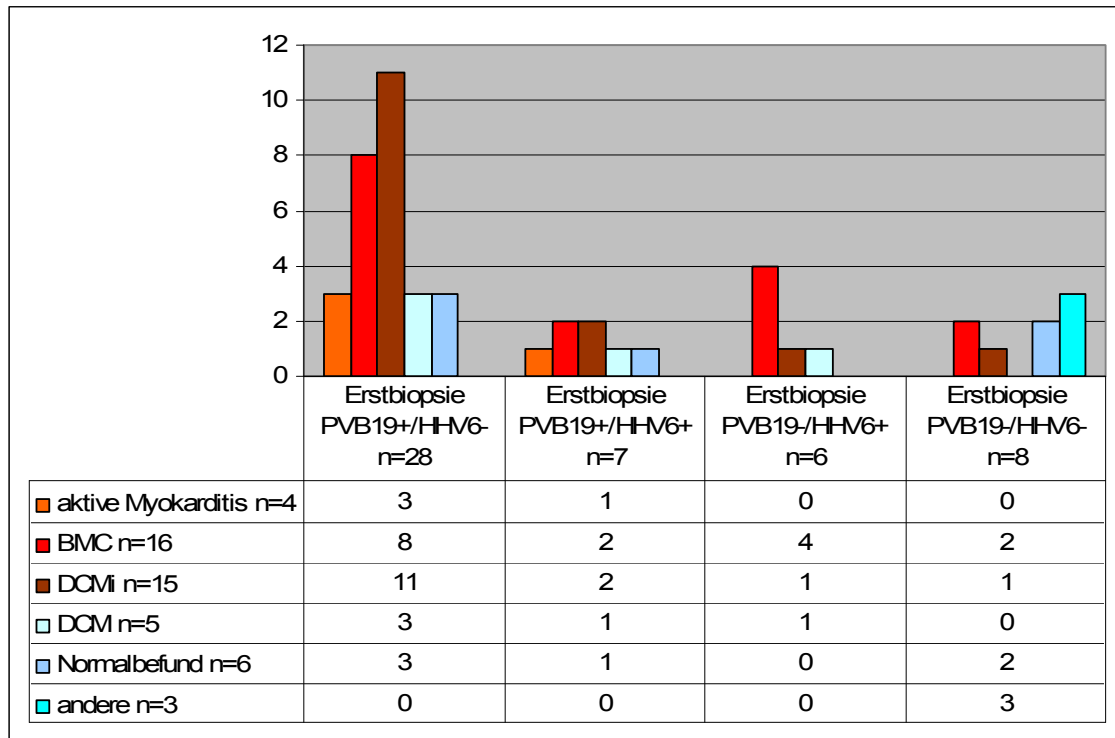
**DCM:** n=18 (Patient 6, 10-12, 15-19, 37, 41, 42-45).

**Andere Kardiomyopathien:** n=3 (reaktive Kardiomyopathie, hypertrophe nicht obstruktive Kardiomyopathie, Glykogenose Typ Pompe) (Pat. 39, 48, 49).

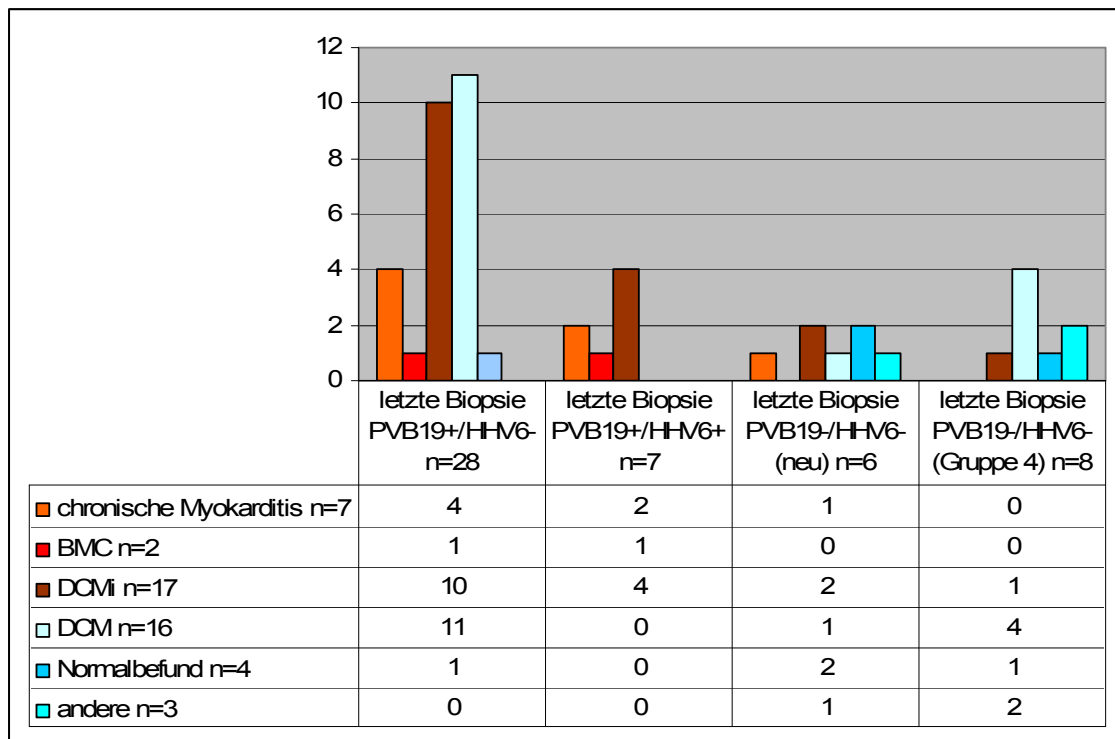
### **5.2.1 Zuordnung der molekularpathologischen Befunde zu den morphologischen Diagnosen und klinischen Befunden der Konsekutivbiopsie**

Um Informationen über die pathogenetische Bedeutung der molekularpathologischen Befunde im Vergleich zu den morphologischen Diagnosen zu erhalten, wurden im folgenden die Ergebnisse in **Abbildung 24** (Erstbiopsie) und **Abbildung 25** (k-EMB) gegenübergestellt.

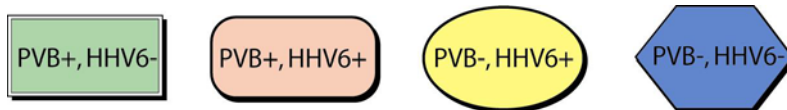
**Abbildung 24: Diagramm Übersicht morphologische Diagnosen Erstbiopsie n=49**



**Abbildung 25: Diagramm Übersicht morphologische Diagnosen letzte Biopsie n=49**



Für die folgenden Organigramme gilt die hier aufgeführte **Legende**, die die Virusbelastung durch PVB19 und/oder HHV6 in den EMBs aufzeigt:



Eine getrennte Betrachtung der Gruppen ergibt folgende Konstellationen:

### 5.2.2 Gruppe 1 (PVB19+, HHV6-) n=28

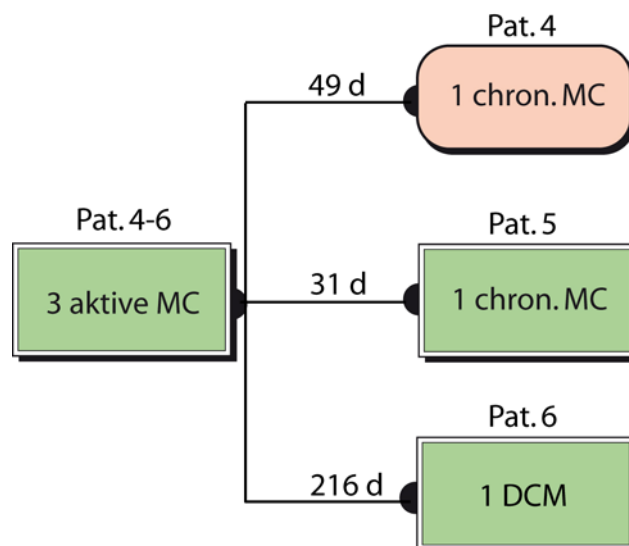
Bei 26 Patienten blieb die PVB19-Belastung auch in der k-EMB erhalten. 1 Patient (Pat. 4) hatte in der k-EMB eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 (Pat. 4). Lediglich 1 Patient hatte in der k-EMB keine Virusbelastung mehr aufzuweisen (Pat. 9).

#### 5.2.2.1 Akute Myokarditis: n=3 (Pat. 4-6)

**Histologie: aktive Myokarditis (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 26** dargestellt.

**Abbildung 26: Verlauf Gruppe 1 aktive Myokarditis n=3**



Von den 3 Patienten der Gruppe 1, die bei der Erstbiopsie (EB) eine aktive Myokarditis hatten, entwickelten 2 Patienten in der k-EMB eine **chronische Myokarditis** (Pat. 4, 5).

Auffällig ist **Patient 4**, der zusätzlich zur PVB19-Belastung eine HHV6-Belastung in der k-EMB aufwies. Flankierend hierzu war die quantitative PVB19-Viruslast auffällig von 782 auf 3000 g.e./ µg m. DNA gestiegen. Ein Vergleich der Blutbefunde konnte wegen der fehlenden Blutuntersuchung bei der Erstbiopsie nicht angestellt werden (k-EMB: PVB19 und HHV6 im Buffy-coat). Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion waren nicht angegeben. Diese Befunde sprechen für eine **persistierende PVB19-Virusinfektion**.

**Patient 5** hatte wiederum eine PVB 19-Belastung in der k-EMB. Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast lagen nicht vor. Die Blutbefunde konnten wegen der fehlenden Information bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: PVB19 im Buffy-coat). Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

**Patient 6** hatte in der Verlaufskontrolle eine **DCM** bei positivem PVB19-Nachweis in der k-EMB. Die quantitative PVB19-Viruslast hatte sich von 760 auf 24 g.e./ µg m. DNA stark verringert. Es lag wie bei der Erstbiopsie keine Virusbelastung im Blut vor. Der NYHA-Index konnte wegen der fehlenden Information bei der Erstbiopsie nicht verglichen werden (k-EMB: NYHA I). Die Ejektionsfraktion war nicht angegeben. Diese Befunde weisen auf eine **latente PVB19-Virusinfektion** bei niedriger PVB19-Viruslast hin.

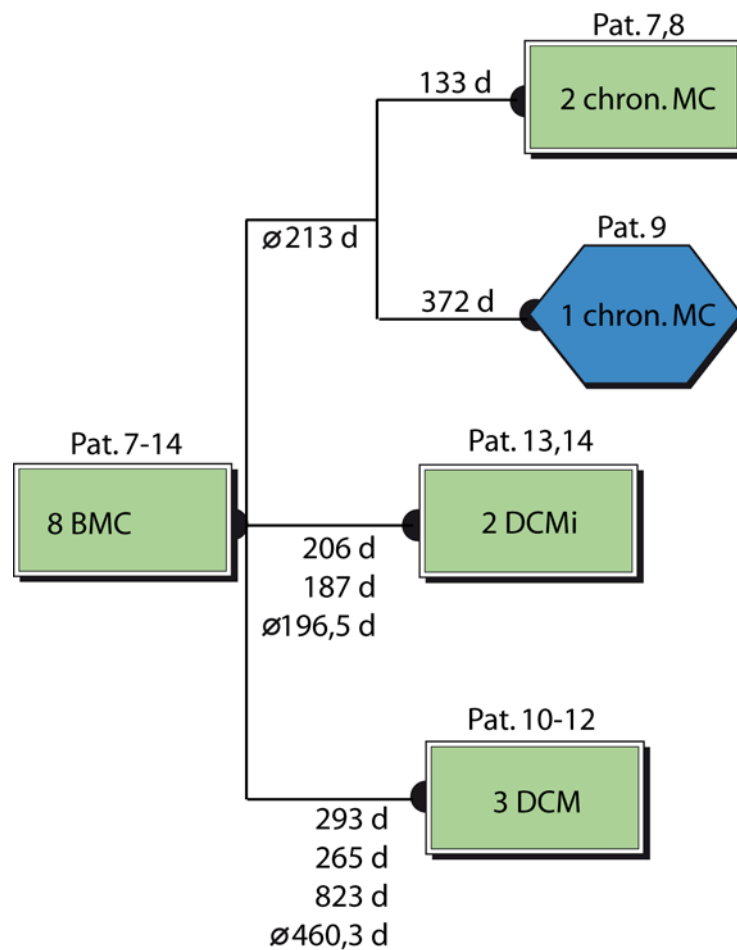


### 5.2.2.2 Chronisch aktive Myokarditis ohne Fibrose: n=8 (Pat. 7-14)

#### Histologie: borderline Myokarditis (Erstbiopsie)

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 27** dargestellt.

**Abbildung 27: Verlauf Gruppe 1 borderline Myokarditis n=8**



3 Patienten dieser Gruppe wiesen bei der k-EMB eine **chronische Myokarditis** auf (Pat. 7-9).

Bei den **Patienten 7 und 8** zeigte sich wiederum eine PVB19-Belastung in der Verlaufskontrolle. Die quantitative PVB19-Viruslast hatte sich bei Patient 7 von 105 auf 165 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA, bei Patient 8 von 510 auf 814 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA erhöht. Bei beiden Patienten waren die Blutbefunde negativ, nachdem bei der Erstbiopsie bei Patient 7 eine PVB19-Belastung im Buffy-coat nachweisbar war.

Der NYHA-Index konnte bei Patient 7 wegen der fehlenden Information bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: NYHA IV). Bei Patient 8 fehlte diese klinische Information. Die Ejektionsfraktion war bei beiden Patienten nicht angegeben. Bei beiden Patienten handelte es sich um eine **persistierende PVB19-Virusinfektion**.

Auffallend ist **Patient 9**, bei dem in der k-EMB keine Virusbelastung durch PVB19 und/oder HHV6 vorlag. Die quantitative PVB19-Viruslast ließ sich wegen der fehlenden Information in der k-EMB nicht vergleichen (EB: 35 g.e./ $\mu$ g m. DNA). Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

**Patient 13 und 14** hatten bei der k-EMB bei vorhandener PVB19-Belastung übereinstimmend mit der klinischen Diagnose eine **DCMi**. Bei Patient 13 war die quantitative PVB19-Viruslast durch fehlende Informationen bei der Erstbiopsie nicht vergleichbar (k-EMB: 384 g.e./ $\mu$ g m. DNA). Bei Patient 14 lagen hierzu keine Daten vor. Die Blutbefunde waren wie bei den Erstbiopsien negativ. Der NYHA-Index konnte bei Patient 14 wegen fehlender Daten bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: NYHA III). Bei Patient 13 war er nicht angegeben. Die Ejektionsfraktion ließ sich bei Patient 13 wegen der fehlenden Information bei der Erstbiopsie (k-EMB: EF 38%), bei Patient 14 wegen der fehlenden Daten bei der k-EMB (EB: 15%) nicht vergleichen. Bei Patient 13 handelt es sich um eine **persistierende PVB19-Virusinfektion**.

Die **Patienten 10, 11 und 12** hatten bei der k-EMB bei weiterhin vorhandener PVB19-Belastung eine **DCM**.

Bei Patient 10 war die quantitative Viruslast wegen der fehlenden Information bei der Erstbiopsie nicht vergleichbar (k-EMB: 561.e./ $\mu$ g m. DNA). Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

Die quantitative PVB19-Viruslast sank bei Patient 11 von 2000 auf 650 g.e./ $\mu$ g m. DNA. Die Blutbefunde waren wieder negativ. Er hatte abermals einen NYHA-Index von II. Die Ejektionsfraktion war nicht angegeben.

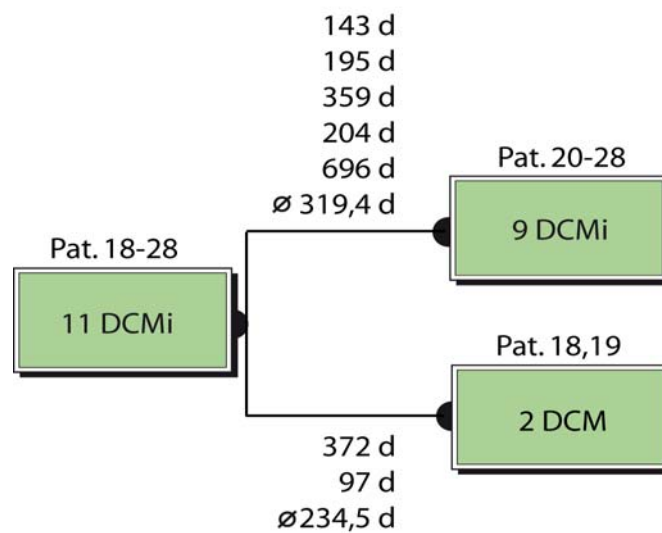
Bei Patient 12 lagen keine Informationen zur quantitativen PVB19-Viruslast vor. Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion ließen sich wegen der fehlenden Informationen bei der k-EMB nicht vergleichen (EB: NYHA: III, EF: 35%). Bei den Patienten 10 und 11 lag aufgrund der fehlenden Entzündung eine **latente PVB19-Virusinfektion** bei geringer bis mittlerer Viruslast vor.

### 5.2.2.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=11 (Pat. 18-28)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi) (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 28** dargestellt.

**Abbildung 28: Verlauf Gruppe 1 DCMi n=11**



9 Patienten hatten auch bei der k-EMB zur Verlaufskontrolle bei positivem PVB19-Befund eine **DCMi**.

Bei **Patient 20 und 25** gab es bei molekularpathologisch positivem PVB19-Befund keine Informationen zur quantitativen Viruslast. Beide Patienten hatten sowohl bei Erst- als auch bei der k-EMB negative Blutbefunde. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion waren bei Patient 20 wegen der fehlenden Daten bei der k-EMB nicht vergleichbar (EB: NYHA: III, EF: 35%). Bei Patient 25 lagen dazu keine Angaben vor.

**Patient 26 und 27** hatten bei positivem PVB19-Befund keine Angaben zur quantitativen Viruslast vorliegen. Die Blutbefunde waren durch fehlende Informationen bei den k-EMBs nicht vergleichbar (EB: negativ in Buffy-coat und Plasma). Der NYHA-Index war nicht angegeben. Bei Patient 26 war der Vergleich der Ejektionsfraktion wegen der fehlenden Angabe bei der Erstbiopsie nicht möglich (k-EMB: EF 56%). Bei Patient 27 gab es hierzu keine klinischen Daten.

**Patient 24 und 28** hatten ebenfalls wiederum eine molekularpathologische PVB19-Belastung. Bei beiden Patienten wurde abermals keine quantitative PVB19-Viruslast angegeben. Beide Patienten hatten bei der Erstbiopsie eine PVB19-Belastung im Buffy-coat und Plasma. Es lag bei Patient 24 bei der k-EMB keine Blutuntersuchung vor. Bei Patient 28 lag eine Doppelbelastung durch PVB19 und HHV6 im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma vor. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

**Patient 22** hatte keine Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast bei der Erstbiopsie (k-EMB: 88 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA). Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren wegen fehlender Informationen bei der k-EMB nicht vergleichbar (EB: NYHA III, EF: 15%). Es lag eine **persistierende PVB19-Virusinfektion** bei geringer Viruslast vor.

Bei **Patient 21** sank die quantitative PVB19-Viruslast von 833 auf 608 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA. Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren nicht angegeben. Dieser Patient hatte eine **persistierende PVB19-Virusinfektion** bei gesunkener PVB19-Viruslast.

Auffallend ist **Patient 23**, bei dem die quantitative PVB19-Viruslast stark von 6000 auf 97 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA sank. Die Blutbefunde waren abermals negativ. Der NYHA-Index konnte wegen fehlender Angaben bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: NYHA I). Die Ejektionsfraktion war nicht angegeben. Es lag eine **persistierende PVB19-Virusinfektion** vor.

Patienten 18 und 19 hatten bei der k-EMB bei positivem PVB19-Befund eine **DCM**.

Bei **Patient 18** stieg die quantitative PVB19-Viruslast von 60 auf 317 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA. Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion konnten wegen fehlender Angaben bei der Erstbiopsie nicht verglichen werden (k-EMB: NYHA III, EF: 22%). Es handelte sich hier bei einer geringen bis mittleren Viruslast aufgrund der fehlenden Entzündung um eine **latente PVB19-Virusinfektion**.

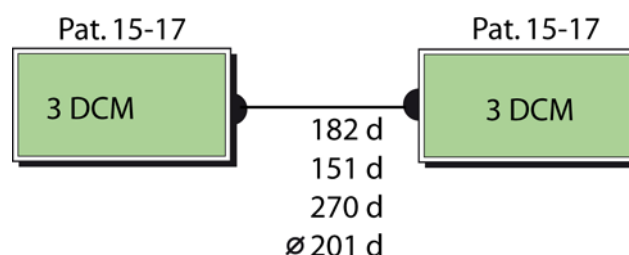
**Patient 19** hatte auch bei der k-EMB keine Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast. Es lagen abermals keine Daten über eine Blutuntersuchung vor. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

#### 5.2.2.4 Dilatative Kardiomyopathie n=3 (Pat. 15-17)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation (DCM) (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 29** dargestellt.

**Abbildung 29: Verlauf Gruppe 1 DCM n=3**



Die **Patienten 15, 16 und 17** hatten abermals eine PVB19-positive **DCM**.

Bei Patient 15 lagen keine Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast oder zu Blutbefunden vor. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren ebenfalls nicht angegeben.

Bei Patient 16 sank die quantitative PVB19-Viruslast von 505 auf 143 g.e./  $\mu\text{g}$  m. DNA, seine Blutbefunde waren wieder negativ. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion waren nicht angegeben. Die Befunde sprechen aufgrund der fehlenden Entzündung für eine **latente PVB19-Virusinfektion**.

Patient 17 hatte bei der k-EMB abermals keine Daten zur quantitativen PVB19-Virusbelastung. Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

### **5.2.3 Gruppe 2 (PVB19+, HHV6+) n=7**

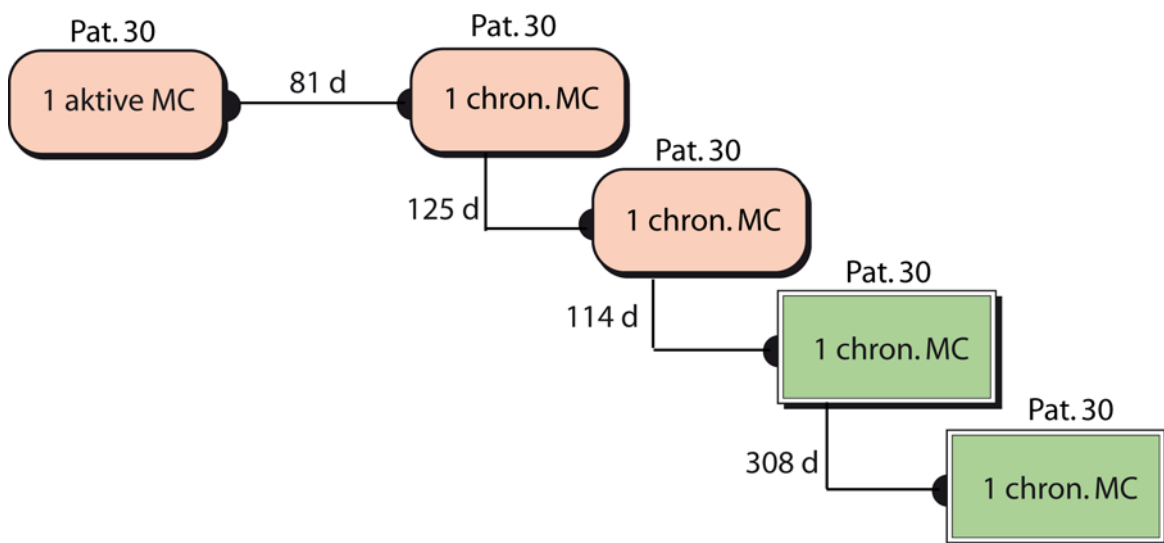
Bei 5 Patienten blieb die Doppelbelastung durch PVB19 und HHV6 auch in der k-EMB erhalten (Pat. 31-35). 1 Patient hatte mehrfache k-EMBs, in deren Verlauf die Infektion mit HHV6, jedoch nicht die mit PVB19, verschwand (Pat. 30).

### 5.2.3.1 Akute Myokarditis: n=1 (Pat. 30)

#### Histologie: aktive Myokarditis (Erstbiopsie)

Der Krankheitsverlauf dieses 5-mal endomyokardbiopsierten Patienten ist in **Abbildung 30** dargestellt.

**Abbildung 30: Verlauf Gruppe 2 aktive Myokarditis n=1**

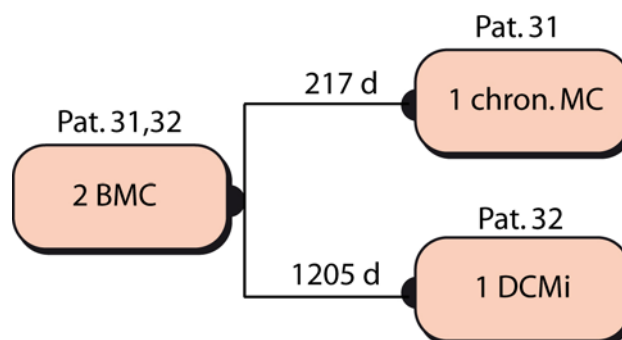


**Patient 30** hatte bei der k-EMB eine **chronische Myokarditis**. Diese Diagnose änderte sich auch nicht im Verlauf der folgenden 3 Biopsien. In den ersten 3 Biopsien lag jedes Mal eine Doppelbelastung durch PVB19 und HHV6 vor. Ab der 4. Biopsie lag lediglich eine Belastung mit PVB19 vor, die HHV6-Belastung war nicht mehr vorhanden. Untersuchungen zur quantitativen Viruslast wurden nicht durchgeführt. Im Gegensatz zur Erstbiopsie wurde bei allen k-EMBs Blut untersucht. Die Blutuntersuchungen waren auf PVB19- und HHV6-virales Genom jedes Mal negativ. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren nicht angegeben. Es ist zu vermuten, dass in den ersten 3 Biopsien **HHV6-assoziierte persistierende PVB19-Virusinfektionen** vorlagen.

### 5.2.3.2 Chronische aktive Myokarditis ohne Fibrose n=2 (Pat. 31, 32) Histologie: borderline Myokarditis (Erstbiopsie)

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 31** dargestellt.

**Abbildung 31: Verlauf Gruppe 2 borderline Myokarditis n=2**



**Patient 31** hatte in der k-EMB abermals eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 bei vorliegender **chronischer Myokarditis**. Die quantitative PVB19-Viruslast war nicht angegeben. Auffällig war nach den negativen Blutbefunden der Erstbiopsie eine HHV6-Belastung im Buffy-coat und im Plasma bei der k-EMB. Der NYHA-Index war von II auf III gefallen. Die Ejektionsfraktion war von 55% auf 50% leicht gefallen.

Auch bei **Patient 32** lag in der k-EMB erneut eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 bei **DCMi** vor. Die quantitative Viruslast war wegen der fehlenden Information bei der Erstbiopsie nicht vergleichbar (k-EMB: 13 g.e./ µg m. DNA). Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. Der NYHA-Index stieg von IV auf II. Die Ejektionsfraktion stieg von 20% auf 50%. Die Befunde weisen auf eine **HHV6-assoziierte persistierende PVB19-Virusinfektion** hin.

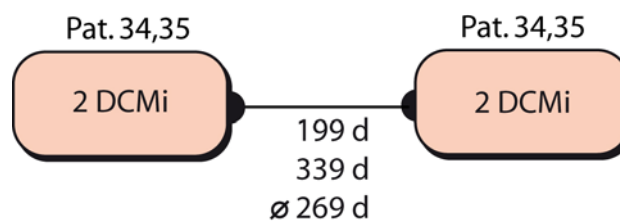


### 5.2.3.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=2 (Pat. 34, 35)

#### Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi) (Erstbiopsie)

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 32** dargestellt.

**Abbildung 32: Verlauf Gruppe 2 DCMi n=2**



Die **Patienten 34 und 35** hatten wieder eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 in der k-EMB bei vorliegender **DCMi**.

Die quantitative PVB19-Viruslast stieg bei Patient 34 von 358 auf 455 g.e./ µg m. DNA leicht. Es fand sich nach negativen Blutbefunden in der Erstbiopsie bei der k-EMB eine HHV6-Belastung im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren wegen fehlender Daten in der Erstbiopsie nicht vergleichbar (k-EMB: NYHA II, EF: 52%). Patient 34 hatte eine **HHV6-assoziierte persistierende PVB19-Virusinfektion** vorliegen.

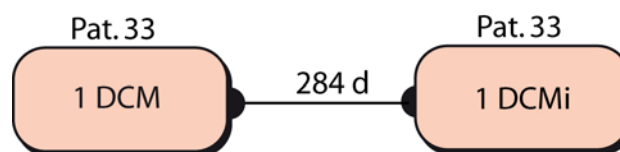
Bei Patient 35 lagen keine Angaben zur quantitativen Viruslast vor. Er hatte bei der Erstbiopsie eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 im Buffy-coat. Bei der k-EMB fand sich eine alleinige HHV6-Belastung im Buffy-coat, jedoch nicht im Plasma. Angaben zum NYHA-Index oder zur Ejektionsfraktion fehlten.

#### 5.2.3.4 Dilatative Kardiomyopathie n=1 (Pat. 33)

##### **Histologie: dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation (DCM) (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieses Patienten ist in **Abbildung 33** dargestellt.

**Abbildung 33: Verlauf Gruppe 2 DCM n=1**



Bei **Patient 33** fand sich in der k-EMB wiederum eine Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 bei vorliegender **DCMi**. Die quantitative PVB19-Viruslast wurde nicht erhoben. Blutbefunde konnten wegen fehlender Daten bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: negativ in Buffy-coat und Plasma). Angaben zum NYHA-Index oder zur Ejektionsfraktion lagen nicht vor. Aufgrund der Histologie kann vermutet werden, dass eine **latente PVB19-Infektion** durch Reaktivierung zu einer chronischen Myokarditis mit Fibrose (DCMi) wurde.

#### 5.2.4 Gruppe 3 (PVB19-, HHV6+) n=6

Bei allen Patienten dieser Gruppe verlor sich die HHV6-Infektion in der k-EMB. Bei 1 Patient (Pat. 41) gab es zudem eine Neuinfektion mit PVB19.

##### 5.2.4.1 Akute Myokarditis

##### **Histologie: aktive Myokarditis (Erstbiopsie)**

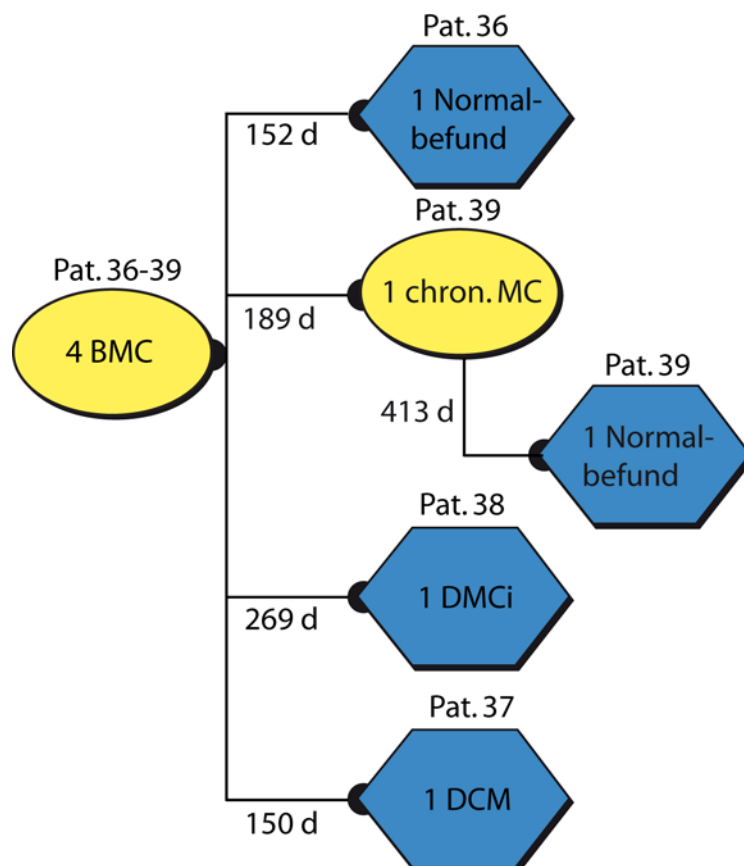
Kein Patient dieser Gruppe hatte bei der Erstbiopsie eine aktive Myokarditis.

### 5.2.4.2 Chronisch aktive Myokarditis ohne Fibrose n=4 (Pat. 36-39)

#### Histologie: borderline Myokarditis (Erstbiopsie)

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 34** dargestellt.

**Abbildung 34: Verlauf Gruppe 3 borderline Myokarditis n=4**



Bei diesen Patienten lag in den k-EMBs keine Virusbelastung durch HHV6 mehr vor.

Bei **Patient 36** lag bei der Verlaufskontrolle einen histologischen **Normalbefund** vor. Die quantitative Viruslast wurde nicht erhoben. Die Blutbefunde waren wieder negativ. Der NYHA-Index konnte wegen fehlender Angaben bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: NYHA I). Die Ejektionsfraktion stieg von 48% auf 76%. Es handelt sich hier um eine **abgeheilte HHV6-assoziierte Myokarditis**.

Bei **Patient 37** fand sich bei der k-EMB eine **DCM**. Es gab keine Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast. Die Blutbefunde waren wieder negativ. Der NYHA-Index fehlte. Die Ejektionsfraktion konnte wegen fehlender Informationen bei der k-EMB nicht verglichen werden (EB: EF 42%).

**Patient 38** war bei der k-EMB an einer **DCMi** erkrankt. Angaben zur q-PCR lagen nicht vor. Erneut waren die Blutbefunde negativ. Es gab keine Informationen zu NYHA-Index und Ejektionsfraktion.

**Patient 39** hatte bei der ersten k-EMB noch eine Belastung mit HHV6. Es lag eine **chronische HHV6-Myokarditis** vor. Es fanden sich keine Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast. Die Blutbefunde waren abermals negativ. Der NYHA-Index stieg von III auf II, die Ejektionsfraktion stieg von 60% auf 66%. Bei der letzten k-EMB fand sich keine molekularpathologisch nachweisbare Virusbelastung durch PVB19 und/oder HHV6. Es lagen keine Informationen zur quantitativen PVB19-Viruslast vor. Die Blutbefunde waren erneut negativ. Es gab keine Angaben zu NYHA-Index und Ejektionsfraktion. Es handelt sich hier um eine **abgeheilte HHV6-assoziierte Myokarditis**.

#### 5.2.4.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=1 (Pat. 41)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi) (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieses Patienten ist in **Abbildung 35** dargestellt.

**Abbildung 35: Verlauf Gruppe 3 DCMi n=1**



**Patient 41** hatte in der k-EMB eine Neuinfektion mit PVB19. HHV6 war nicht mehr nachweisbar. Es lag eine **DCM** vor. Es gab keine Daten zur quantitativen

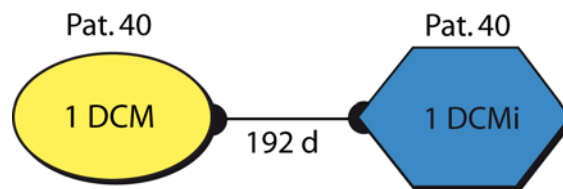
PVB19-Viruslast. Die Doppelbelastung mit PVB19 und HHV6 im Buffy-coat fand sich auch bei der k-EMB. NYHA-Index und Ejektionsfraktion waren nicht angegeben.

#### 5.2.4.4 Dilatative Kardiomyopathie n=1 (Pat. 40)

##### **Histologie: dilatative Kardiomyopathie ohne Inflammation (DCM) (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieses Patienten ist in **Abbildung 36** dargestellt.

**Abbildung 36: Verlauf Gruppe 3 DCM n=1**



Bei **Patient 40** lag in der k-EMB keine Virusbelastung mehr vor. Es wurde eine **DCMi** diagnostiziert. Es gab keine Angaben zur quantitativen PVB19-Viruslast. Die HHV6-Belastung im Buffy-coat bei der Erstbiopsie war bei der k-EMB nicht mehr vorhanden. Der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion konnten durch fehlende Informationen bei der Erstbiopsie nicht verglichen werden (k-EBM: NYHA: II, EF: 35%). Die zunächst **HHV6-positive DCM** hat sich zu einer **HHV6-negativen DCMi** entwickelt.

#### 5.2.5 Gruppe 4 (PVB19-, HHV6-) n=8

Alle Patienten hatten auch bei der k-EMB keine Virusbelastung vorliegen.

##### 5.2.5.1 Akute Myokarditis n=0

##### **Histologie: aktive Myokarditis (Erstbiopsie)**

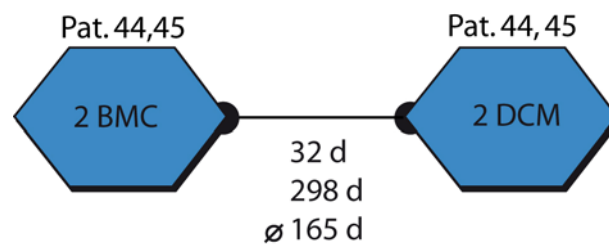
Kein Patient dieser Gruppe hatte bei der Erstbiopsie eine aktive Myokarditis.

### 5.2.5.2 Chronisch aktive Myokarditis ohne Fibrose n=2 (Pat. 44, 45)

#### Histologie: borderline Myokarditis (Erstbiopsie)

Der Krankheitsverlauf dieser Patienten ist in **Abbildung 37** dargestellt.

**Abbildung 37: Verlauf Gruppe 4 BM n=2**



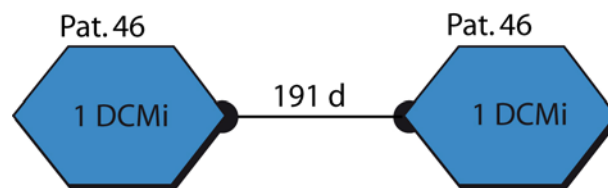
Bei den **Patienten 44 und 45** fand sich in der k-EMB wiederum keine Virusbelastung. Es gab keine Informationen zur quantitativen Viruslast. Bei der Erstbiopsie lagen keine Blutbefunde vor, bei der k-EMB waren die Blutbefunde negativ. Bei Patient 44 lagen keine Angaben zum NYHA-Index vor, die Ejektionsfraktion war wegen fehlender Angaben bei der Erstbiopsie nicht vergleichbar (k-EMB: EF 18%). Bei Patient 45 konnten der NYHA-Index und die Ejektionsfraktion wegen fehlender Informationen bei der Erstbiopsie nicht verglichen werden (k-EMB: NYHA IV, EF: 20%). Beide waren an einer virusnegativen **DCM** erkrankt.

### 5.2.5.3 Chronisch aktive Myokarditis mit Fibrose n=1 (Pat. 46)

**Histologie: dilatative Kardiomyopathie mit Inflammation (DCMi) (Erstbiopsie)**

Der Krankheitsverlauf dieses Patienten ist in **Abbildung 38** dargestellt.

**Abbildung 38: Verlauf Gruppe 4 DCMi n=1**



**Patient 46** hatte in der k-EMB wiederum keine Virusbelastung bei vorhandener **DCMi**. Es lagen keine Daten zur quantitativen PVB19-Viruslast vor. Die Blutbefunde waren wie bei der Erstbiopsie negativ. Es gab keine Angaben zum NYHA-Index und zur Ejektionsfraktion. Es wurde die Diagnose einer virusnegativen DCMi gestellt.

### 5.2.5.4 Dilatative Kardiomyopathie

**Histologie: dilatative Myokarditis ohne Inflammation (DCM) (Erstbiopsie)**

Kein Patient dieser Gruppe hatte eine DCM.

## 6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus einem Gesamtkollektiv von insgesamt 4241 Patienten konnten 49 Patienten ausgewählt werden, bei denen zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufes eine oder mehrere konsekutive Endomyokardbiopsien vorlagen. Die Herzmuskelbiopsien wurden mit routinehistologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Methoden untersucht. Die histologische Einteilung der Myokarditiden erfolgte anhand der Dallas-Klassifikation (Erstbiopsie: aktive Myokarditis, borderline Myokarditis ohne Fibrose, borderline Myokarditis mit Fibrose (DCMi); konsekutive Biopsien: chronische (ongoing) mit oder ohne Fibrose (DCMi), abheilende (healing), abgeheilte (healed) Myokarditis). Die immunhistologischen Untersuchungen waren notwendig, um die Entzündungsreaktion im Herzen besser zu charakterisieren. Die molekularen Techniken (n-PCR, q-PCR) dienten dem Nachweis von genetischen Sequenzen kardiotoxischer Viren, speziell von PVB19 und HHV6. Die q-PCR wurde genutzt, um den Typus der PVB19-Virusinfektion (akut, persistierend, latent) zu charakterisieren. Soweit wie möglich wurden klinische Informationen (Zeitdauer der Erkrankung, NYHA, LVEF) berücksichtigt und der neuen klinisch-pathologischen Einteilung der Myokarditiden nach Baughman (fulminante, akute, chronisch aktive Myokarditis) zugeordnet. Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchung war ein positiver oder negativer molekularpathologischer Nachweis von PVB19- und/oder HHV6-genetischen Sequenzen in der ersten Herzmuskelbiopsie, der zu einer Einteilung in 4 Patientengruppen führte (**Tabelle 14-Tabelle17**).

Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen ergaben nach der Dallas-Klassifikation hierzu die dargestellten Diagnosen in **Tabelle 14**.



**Tabelle 14: Histologische Klassifikation der Myokarditiden nach Dallas (Erstbiopsie)**

Patienten n=49	Gruppe 1 PVB19+/HHV6- n=28	Gruppe 2 PVB19+/HHV6+ n=7	Gruppe 3 PVB19- /HHV6+ n=6	Gruppe 4 PVB19- /HHV6- n=8
Aktive Myokarditis n=4	3	1	0	0
Borderline Myokarditis ohne Fibrose n=16	8	2	4	2
DCMi n=15	11	2	1	1
DCM n=5	3	1	1	0
Andere n=9	3	1	0	5

Aufgrund der quantitativen PCR erfolgte die Einteilung des Typus der Virusinfektionen. Sie konnte nur für PVB19-positive Patienten vorgenommen werden, da für HHV6-Infektionen keine q-PCR-Ergebnisse vorhanden waren. Nicht bei allen PVB19-positiven Patienten wurden q-PCR-Befunde erhoben. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 15** ersichtlich.

**Tabelle 15: Typisierung der PVB19-Virusinfektion aufgrund der q-PCR (Erstbiopsie)**

Patienten q-PCR n=11	Gruppe 1 PVB19+/HHV6- n=10	Gruppe 2 PVB19+/HHV6+ n=1	Gruppe 3 PVB19- /HHV6+ n=0	Gruppe 4 PVB19- /HHV6- n=0
Akute Virusinfektion n=2	2	?	0	0
Persistierende Virusinfektion n=8	7	1	?	?
Latente Virusinfektion n=1	1	?	?	0

?: Informationen nicht ausreichend für eine sichere Aussage

Aufgrund zusätzlicher klinischer Informationen konnten diese molekularpathologischen und histologischen Befunde der klinisch-pathologischen Klassifikation der Myokarditiden nach Baughman zugeordnet werden. Nicht bei allen Patienten waren klinische Informationen angegeben, so dass nur ein Teil der Patienten hier erfasst werden konnte (**Tabelle 16**).

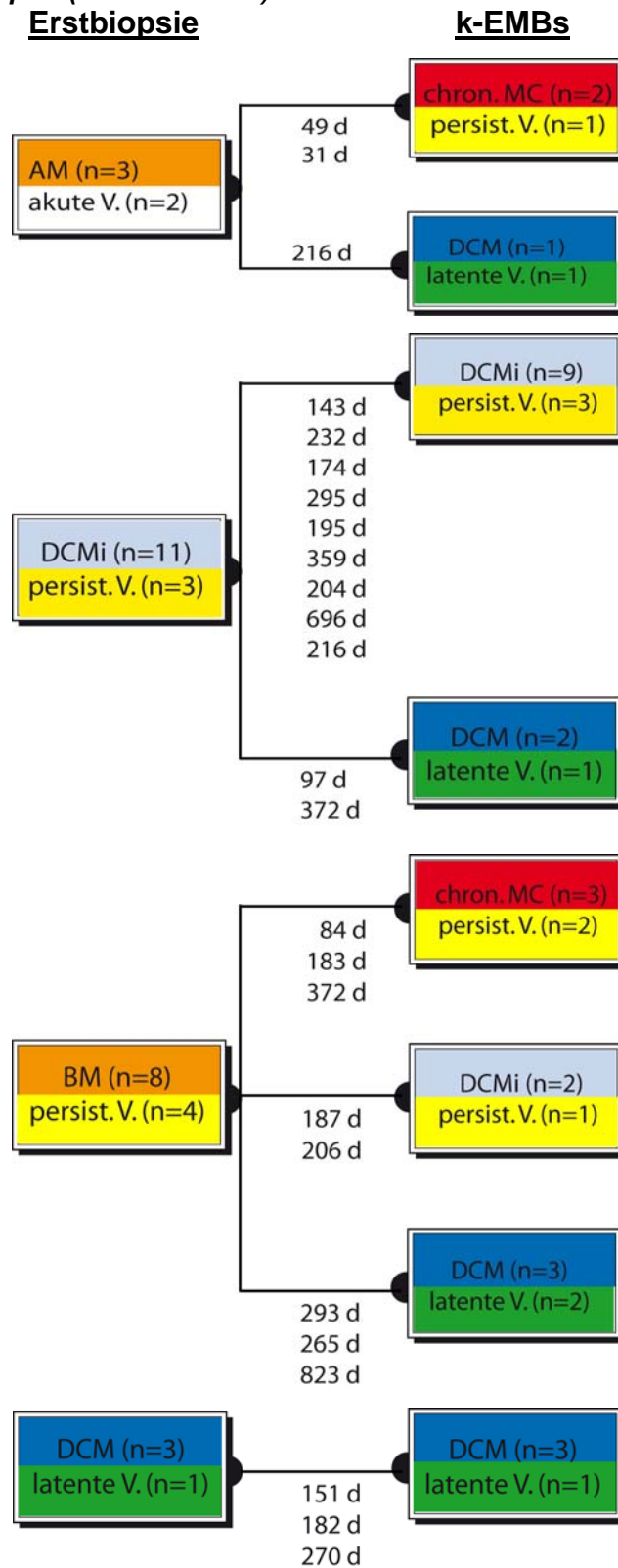
**Tabelle 16: Klinisch-pathologische Einteilung der Myokarditiden nach Baughman. Pat. mit kompletten klinischen Daten**

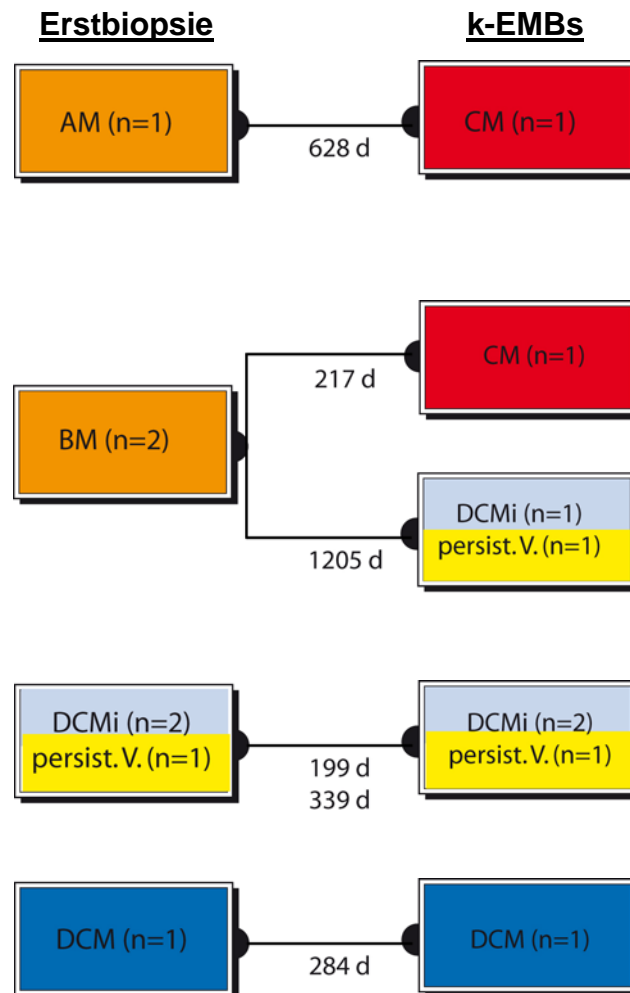
Patienten Baughman n=17	Gruppe 1 PVB19+/HHV6- n=12	Gruppe 2 PVB19+/HHV6+ n=4	Gruppe 3 PVB19- /HHV6+ n=1	Gruppe 4 PVB19- /HHV6- n=0
Fulminante Myokarditis n=0	0	0	0	0
Akute Myokarditis n=1	1	?	0	0
Chron. aktive Myokarditis ohne Fibrose (BM) n=5	3	2	?	?
Chron. aktive Myokarditis mit Fibrose (DCMi) n=10	7	2	1	?
Chron. aktive Myokarditis mit Fibrose (DCM) n=1	1	?	?	0

?: klinische Informationen nicht ausreichend für eine sichere Aussage

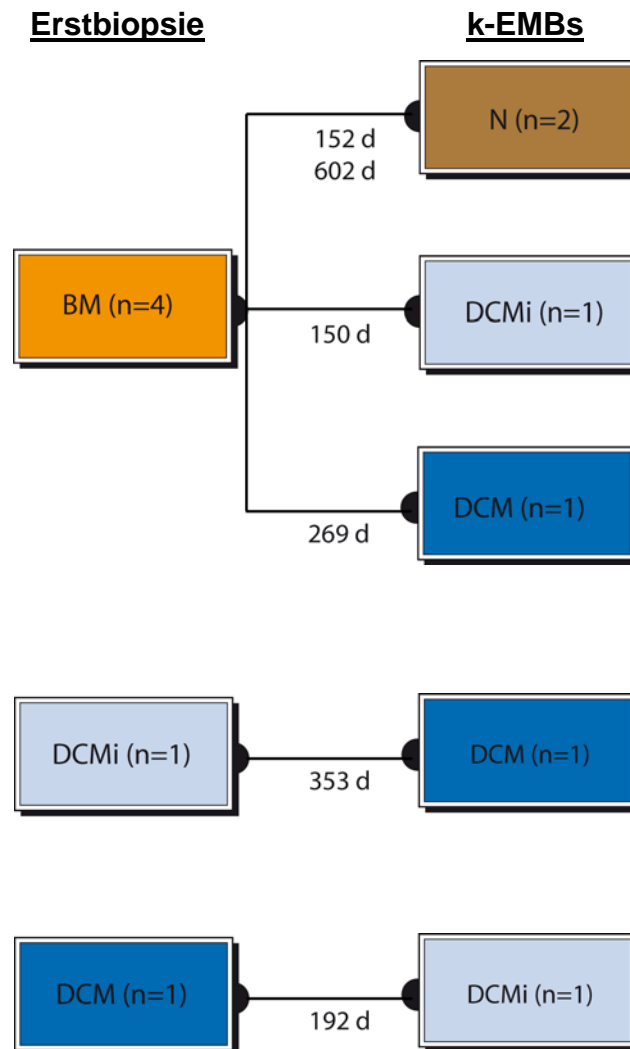
Die Ergebnisse der **konsekutiven Biopsien** (Zeitintervall, histologische Klassifikation nach Dallas-Kriterien und Typisierung der Virusinfektionen) sind für die Gruppen 1-3 in den **Abbildungen 39-41** dargestellt. Die Erklärungen zu den Abkürzungen finden sich auf Seite 116.

**Abbildung 39: Gruppe 1 (PVB19+/HHV6-) Verlauf Erstbiopsie**



**Abbildung 40: Gruppe 2 (PVB19+/HHV6+) Verlauf**

Der Typus der Virusinfektion bezieht sich lediglich auf PVB19, da keine quantitative PCR bei HHV6 durchgeführt wurde.

**Abbildung 41: Gruppe 3 (PVB19-/HHV6+) Verlauf**

Aufgrund der nicht durchgeführten quantitativen PCR kann eine Typisierung der Virusinfektion nicht vorgenommen werden.

**AM:** aktive Myokarditis

**BM:** borderline Myokarditis ohne Fibrose

**DCMi:** borderline Myokarditis mit Fibrose

**DCM:** dilatative Kardiomyopathie

**V.:** Virusinfektion

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass bei den Patienten mit PVB19-positiven Erstbiopsien (n=35, n=28 Gruppe 1; n=7, Gruppe 2) in 94,2% der Fälle (n=27, 96,4% Gruppe1; n=6, 85,7% Gruppe2) auch in den k-EMBs ein positiver PVB19-Nachweis geführt werden konnte. Morphologisch handelte es sich in den k-EMBs um chronische Myokarditiden (n=3 Gruppe 1, n=1 Gruppe 2) oder eine DCMi (n=11 Gruppe 1, n=4 Gruppe 2) im Sinne einer chronisch persistierenden PVB19-Infektion gekennzeichnet durch eine verminderte PVB19-Viruslast und reduzierte Entzündungsreaktionen. Auffällig ist, dass es zu einer Zunahme der Fibrosierung in Form einer Remodellierung des Myokards kommt. Bei den Erstbiopsien hatten n=17 Patienten eine DCMi oder DCM (n=14 Gruppe 1, n=3 Gruppe 2), bei den k-EMBs lag die Zahl bei n=24 Patienten (n=20 Gruppe 1, n=4 Gruppe 2), was einer Steigerung um 41,2% (42,9% Gruppe1, 33,3% Gruppe 2) entspricht.

Bei n=3 Fällen (n=3 Gruppe 1, n=0 Gruppe 2) mit einer DCM in den Erstbiopsien und k-EMBs fehlte die Entzündungsreaktion. Die Viruslast war zudem hier gering, so dass von einer latenten Infektion gesprochen werden kann.

Auffällig bei den Patienten mit HHV6-Infektionen in den Erstbiopsien (Gruppe 2, Gruppe 3) ist, dass eine HHV6-Persistenz in den k-EMBs nur bei vorhandener PVB19-Infektion besteht. Von n=13 Patienten (n=7 Gruppe 2, n=6 Gruppe 3) haben in den k-EMBs lediglich n=5 Patienten, die alle der Gruppe 2 angehören, abermals eine HHV6-Infektion. Bei einer alleinigen HHV6-Infektion in den Erstbiopsien war diese in allen Fällen, unabhängig vom vorhandenen morphologischen Befund, in den k-EMBs nicht mehr nachweisbar. Eine Einteilung nach dem Typus der Virusinfektion (akut, persistierend oder latent) erfolgte hier nicht, da keine quantitativen PCR-Untersuchungen durchgeführt wurden.



## 7 Diskussion

Nach dem PVB19 und HHV6 u. a. als kardiotope Viren identifiziert wurden, die in der Lage sind eine Myokarditis auszulösen, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, den Verlauf einer durch diese beiden Viren ausgelösten Herzmuskelentzündung mit morphologischen und molekularpathologischen Methoden zu verfolgen unter Einbeziehung – soweit vorhanden – klinischer Parameter. Klinisch als auch pathomorphologisch werden die verschiedenen Verlaufsformen der Myokarditis immer noch nach der 1987 publizierte Dallas-Klassifikation eingeteilt, die seinerzeit auf der Basis von histologischen Routinefärbungen entwickelt worden war (119). Die Berücksichtigung klinischer Informationen bei der histologischen Beurteilung der Endomyokardbiopsien war nicht vorgesehen bzw. nicht erwünscht. In den letzten Jahren kam nun zunehmend Kritik an der Dallas-Klassifikation auf. In einer kürzlich von Baughman publizierten Arbeit wurde deshalb moniert, dass heute gängige immunhistologische Methoden eingesetzt werden sollten zur besseren Charakterisierung des entzündlichen Exzidates, molekularpathologische Techniken sollten genutzt werden zur ätiologischen Abklärung der Myokarditis, z. B. virale Ätiologie, klinische Informationen, z. B. Infektanamnese, Beginn der kardialen Erkrankung, Ausmaß der Herzinsuffizienz, sollten die Gesamtbeurteilung des Krankheitsbildes abrunden (8).

Bei Durchsicht der PVB19- und HHV6-assoziierten Literatur fällt auf, dass es praktisch keine Informationen gibt über den Typ der Virusinfektion (akut, persistierend, latent) bei viral bedingten entzündlichen Herzmuskelerkrankungen. Deshalb wurde erstmalig in dieser Arbeit die quantitative PCR eingesetzt zur Beurteilung der Viruslast in den Endomyokardbiopsien, unter Berücksichtigung der Ergebnisse zusätzlich untersuchter Blutproben der biopsierten Patienten. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden in Relation gesetzt zu den histologischen und

immunhistologischen sowie klinischen Befunden. Hinsichtlich der nur für PVB19 bestimmten quantitativen Viruslast in den Endomyokardbiopsien fällt auf, dass die Viruslast auf den ersten Blick relativ gering erscheint ( $10^1$  bis  $10^5$  PVB19 genome equivalent/  $\mu\text{g}$  myokardiale DNA), es muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Viruslast in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Material bestimmt wurde. Es ist bekannt, dass durch die Formalinfixierung des Gewebes die Anzahl detektierbarer viraler Genome um ein Faktor  $10^2$  bis  $10^3$  reduziert wird, d. h. dass in nativen, nicht fixierten Endomyokardbiopsien mit einer Viruslast zwischen  $10^3$  bis  $10^8$  PVB19 Genom-equivalenten gerechnet werden kann, eine kritische Viruslast, die potentiell in der Lage ist, einen Gewebeschaden herbeizuführen (11).

Weiterhin auffallend in der vorliegenden Arbeit ist die geringe Anzahl von konsekutiven Endomyokardbiopsien. Aus einem Gesamtkollektiv von 4241 Patienten wurden nur bei 49 Patienten konsekutive Biopsien zum Monitoring des kardialen Erkrankungsbildes durchgeführt. Die geringe Anzahl der konsekutiven Biopsien reichte nicht aus, um das Ergebnis einer statistischen Auswertung zuzuführen. Hinsichtlich der Gründe für die geringe Anzahl von konsekutiven Biopsien ist nach Durchsicht der Literatur folgendes auszuführen: Aufgrund der von Mason et al. 1995 durchgeführten Therapiestudie zur Myokarditis mit sehr inhomogenen und enttäuschenden Ergebnissen, nahm die Begeisterung der Kliniker deutlich ab, das Krankheitsbild durch konsekutive Endomyokardbiopsien zu kontrollieren (76). Zum Zweiten ist festzuhalten, dass bei der aktuellen gesundheitspolitischen Situation aus Kostengründen konsekutive Endomyokardbiopsien fast nicht mehr durchgeführt werden. Zum Dritten muss aufgeführt werden, dass auch die „compliance“ der Patienten für einen zweiten invasiven Eingriff aus wissenschaftlichen Gründen deutlich abgenommen hat.

Ordnet man die in der vorliegenden Arbeit zusammengetragenen histologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Befunde in Kombination mit den klinischen Informationen in die nach Baughman vorgenommene neue klinisch-pathologische Klassifikation der Myokarditiden ein, ergeben sich interessante und in der Literatur bisher nicht mitgeteilte Befunde: Eine akute PVB19-assoziierte Myokarditis scheint, insbesondere im Erwachsenenalter ein seltenes Ereignis zu sein. Interessant für die akute PVB19-assoziierte Myokarditis sind pathogenetische Befunde, die kürzlich von Bültmann et al. publiziert wurden (11, 12, 13). Es konnte mithilfe der radioaktiven in situ-Hybridisierung gezeigt werden, dass die Zielzellen der Parvoviren nicht die Herzmuskelzellen sind, sondern die Endothelien im Bereich von Kapillaren und postkapillären Venolen. Die Infektion der Endothelzellen ging einher mit einer verstärkten Expression von E-Selectin als morphologisches Äquivalent einer endothelialen Dysfunktion, die ihrerseits charakterisiert war durch eine verstärkte Adhärens und Penetration von T-Lymphozyten in angrenzendes myokardiales Gewebe mit sekundären, nicht Virus-assoziierten Schädigungen der Herzmuskelzellen. Somit ist die PVB19-assoziierte akute Myokarditis pathogenetisch abzugrenzen von Enterovirus-assoziierten Myokarditiden, in denen die Herzmuskelzellen Zielzellen der Infektionen sind mit Zerstörung dieser Zellen durch einem Enterovirus-assoziierten zytopathischen Effekt (13). Das Konzept der PVB19-assoziierten endothelialen Dysfunktion wurde kürzlich durch in vitro-Experimente unterstützt, in denen bei Endothelzellkulturen gezeigt werden konnte, dass es durch das PVB19 Capsid-Protein VP1 zu einem verstärkten Calciumeinfluss in die Endothelzellen kam, vermittelt durch eine Stimulation der Phospholipase A2-Aktivität (107). Die hohe Viruslast im Herzen reflektiert möglicherweise die hohe Anzahl von Endothelzellen in dem engmaschigen Kapillar- und Venolenmaschenwerk des Herzens, wodurch aufgrund der Virus-assoziierten endothelialen Dysfunktion die Vulnerabilität des Herzmuskelparenchyms durch Parvoviren bestimmt wird. Aus klinischer Sicht ist interessant, dass die akute

PVB19-assoziierte Myokarditis einen Herzinfarkt vortäuschen kann, offensichtlich bedingt durch die Virus-induzierte endotheliale Dysfunktion in der mikrozirkulatorischen koronaren Peripherie mit sekundären Herzmuskelzellnekrosen (55, 56, 61).

Die Hauptmasse der hier untersuchten Patienten zeigte bereits bei der Erstbiopsie eine chronisch-aktive Myokarditis, klinisch charakterisiert durch einen schleichenden Krankheitsbeginn bei zumeist positiver Infektanamnese. Morphologisch lag eine Borderline Myokarditis vor, die immunhistologisch charakterisiert war durch eine erheblich über die Norm vermehrte Anzahl von aktivierten immunkompetenten interstitiellen Makrophagen. Die quantitative PCR zeigt einen mittleren Grad einer Virusreplikation, die offensichtlich in der Lage ist, eine chronische Entzündung nicht nur auszulösen, sondern auch zu unterhalten. Im Moment ist unklar, in welchen myokardialen Gewebebestandteilen sich das Parvovirus-B19-Genom verbirgt. Die viralen Strategien, in einem Gewebe zu persistieren bei gleichzeitig geringer Virusreplikation, sind zur Zeit weitgehend unbekannt, die angeborenen bzw. erworbenen immunologischen Faktoren, die verantwortlich sind für einen resistenten Phänotyp einer Virusinfektion, sind nur teilweise identifiziert worden (4,10, 34, 122). Bei Durchsicht der Literatur fällt auf, dass die immunhistologische Analyse des entzündlichen Exsudates bei einer Myokarditis sich hauptsächlich beschränkt auf den Nachweis von T-Lymphozyten und deren Subtypen, es gibt praktisch keine Informationen über die Bedeutung der Makrophagen bei einer derartigen Virusinfektion, insbesondere über ihr Potential als Antigen-präsentierende oder Cytokin-produzierende Zellen. Unter dem Aspekt der Antigenpräsentation wurde kürzlich von Szalay et al. eine Arbeit publiziert, in der in einem Maus-Modell Pathomechanismen der Coxsackie-Virus-B3-induzierten chronischen Myokarditis untersucht wurden (107). Es konnte gezeigt werden, dass die chronisch-aktive Myokarditis assoziiert war mit einer verstärkten Bildung und Aktivität von myokardialen Immunproteasomen, die allerdings nicht zu einer effizienten Viruselimination

führte. Im gleichen Maus-Modell wurde die Beziehung einer Makrophagen-abhängigen Induktion der Nitrit-Oxyd-Synthase (iNOS)-mRNA Expression untersucht in Beziehung zur Sekretion von Interferon-Gamma und Interleukin-10. Es konnte gezeigt werden, dass bei der chronischen Coxsackie-Virusinfektion eine verzögerte und auch geringere Interferonsekretion einsetzte bei gleichzeitig nachweisbarer, hochgradig verminderter Interleukin-10-Produktion. Diese experimentellen Ergebnisse unterstützen und erklären auch teilweise klinische Befunde bei Patienten mit chronisch-aktiver PVB19-Myokarditis, bei denen im Serum ein deutlich verminderter Interferonspiegel entdeckt wurde bei gleichzeitig negativem Nachweis von Interleukin-10 (107). Basierend auf diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die fehlende regulatorische Interleukin-10-Produktion zu einer unkontrollierten iNOS-mRNA-Expression in aktivierten Makrophagen führt, die letztlich einmündet in einen chronischen myokardialen Schaden, der morphologisch charakterisiert ist durch eine zunehmende Zerstörung des Myokards im Sinne einer Remodellierung des Myokards, erkenntlich an einer zunehmenden DCM-ähnlichen interstitiellen Fibrose.

Dieses pathogenetische Konzept einer persistierenden PVB19-Infektion findet Unterstützung durch die Untersuchung der Konsekutivbiopsien der PVB19-positiven Patienten, bei denen wiederum eine chronisch persistierende Virusinfektion gefunden wurde, morphologisch charakterisiert durch eine chronische Myokarditis, die in den Konsekutivbiopsien zusätzlich begleitet war durch eine zunehmende interstitielle Fibrose des Myokards im Sinne einer Remodellierung. Interessant für dieses pathogenetische Konzept sind auch radiologische und klinische Befunde, die kürzlich von Mahrholdt et al. publiziert wurden (69, 68). Es konnte gezeigt werden, dass basierend auf kardialen kernspintomographischen Untersuchungen eines Teils der auch in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Patienten es zu einer verstärkten späten Gadoliniumaufnahme kam, bevorzugt im Myokard der lateralen Wand des linken Ventrikels und zu einem geringeren Grade auch im rechtsventrikulären Septum. Gezielte Endomyokardbiopsien aus diesen Regionen zeigten

histomorphologisch das Bild einer Borderline-Myokarditis im Sinne einer chronisch-aktiven Myokarditis. Bei diesen Patienten wurden auch kernspintomographische Verlaufskontrollen des Krankheitsbildes durchgeführt, bei denen basierend auf den Erstbefunden gezeigt werden konnte, dass die Langzeitprognose der PVB19-assoziierten Myokarditis abhängig war vom Ausmaß der initialen Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion, dem Anstieg des enddiastolischen Volumens und dem quantitativen Ausmaß der Gadoliniumanreicherung im ventrikulären Septum (68, 69).

Interessant hinsichtlich des Typus der Virusinfektion waren Befunde bei Patienten mit initial morphologisch diagnostizierter dilatativer Kardiomyopathie. Hier lagen sowohl in der Erstbiopsie als auch in den Konsekutivbiopsien geringe Viruslasten im Myokard vor bei fehlender begleitender Entzündungsreaktion. Dieser Befund wird als latente PVB19-Virus-Infektion interpretiert, offensichtlich im Sinne einer ausgebrannten PVB19-Infektion in einem Herzen mit morphologischem Zeichen eines „end stage heart disease“. Hinsichtlich der HHV6-assoziierten Myokarditiden bleibt folgendes festzuhalten: Eine akute HHV6-assoziierte Myokarditis scheint – auch bei Durchsicht der Literatur – ein sehr seltenes Ereignis zu sein. Eine chronisch-aktive Myokarditis, wie sie bei einem Teil der hier untersuchten Patienten vorgelegen hat, ist in der Literatur bisher nicht dokumentiert. Insgesamt gibt es im Vergleich zu Enterovirus-assoziierten und Parvovirus-B19-assoziierten Myokarditiden kein einheitliches ätiologisches und pathogenetisches Konzept für die Entstehung von HHV6-assoziierten entzündlichen Herzerkrankungen. Auffallend in dem hier vorliegenden Material ist die Tatsache, dass bei initial positiven HHV6-Myokarditiden das Virus im Krankheitsverlauf eliminiert wird. Interessant ist die hohe Koinzidenz von HHV6 bei PVB19-positiven Endomyokardbiopsien. Hier scheint das HHV6-Virus länger zu persistieren. Ätiologische und pathogenetische Konzepte für diese interessanten Befundkonstellationen sind aus der Literatur nicht abfragbar. Da bei HHV6-positiven Patienten keine Bestimmung der quantitativen Viruslast durchgeführt wurde, können –

vergleichbar zur PVB19-Infektion – ebenfalls keine ätiologischen und pathogenetischen Konzepte angeboten werden.

## 8 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgelegten histologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Befunde zur Charakterisierung einer PVB19- und/oder HHV6-assoziierten Myokarditis lassen für die initialen und konsekutiven Endomyokardbiopsien folgende Schlussfolgerungen zu:

1. In Bestätigung der Literatur sind sowohl PVB19 als auch HHV6 als kardiotope Viren einzuordnen, die in der Lage sind eine Myokarditis auszulösen.
2. Eine akute PVB19-assoziierte Myokarditis ist ein seltenes Ereignis, histologisch und molekularpathologisch charakterisiert durch eine hohe Viruslast in Begleitung einer ausgeprägten Entzündung mit Destruktion von Herzmuskelzellen.
3. Die Hauptmasse der PVB19-positiven Patienten präsentierte sich bereits bei der Erstbiopsie mit einer chronisch-aktiven Myokarditis, offensichtlich entstanden auf dem Boden einer chronisch-persistierenden Virusinfektion, die in der Lage ist – basierend auf den Ergebnissen der konsekutiven Biopsien – eine chronische Myokarditis auszulösen.

4. Im Verlauf der chronischen Myokarditis kommt es in einem hohen Prozentsatz zu einer zunehmenden interstitiellen Fibrose des Myokards im Sinne einer Remodellierung, teilweise mit morphologischen Veränderungen im Sinne einer beginnenden dilatativen Kardiomyopathie.
5. Für die HHV6-assoziierte Myokarditis reichen die vorliegenden Befunde dieser Arbeit nicht aus, um ein ähnliches pathogenetisches Konzept darzustellen. Interessant allerdings ist zum einen die hohe Koinzidenz von Parvovirus-B19- und HHV6-Infektionen und zum Zweiten die Beobachtung, dass bei alleiniger HHV6-Infektion diese Viren in konsekutiven Biopsien nicht mehr nachweisbar sind, offensichtlich bedingt durch eine erfolgreiche Eliminierung des Erregers durch körpereigene Abwehrmechanismen, die für die PVB19-Infektion aus bisher unbekanntem Gründen nicht erfolgt.



## 9 Zusammenfassung

### **Ausgangsposition und Ziele der vorliegenden Arbeit:**

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass PVB19- und HHV6-Viren nicht nur Auslöser harmloser Kindererkrankungen sind, sondern darüber hinaus auch als kardiotope Krankheitserreger in Betracht zu ziehen sind, die eine Myokarditis auslösen können. Bei kritischer Literaturanalyse der durch diese beiden Viren ausgelösten entzündlichen Herzerkrankungen fällt auf, dass speziell unter morphologischen und auch molekularpathologischen Aspekten die jeweiligen Krankheitsbilder nur sehr inkonsequent beschrieben wurden, zum Teil mit inhomogenen und widersprüchlichen Resultaten. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass speziell unter morphologischen als auch molekularpathologischen Aspekten keine Informationen über den Krankheitsverlauf dieser beiden viralen Herzerkrankungen vorliegen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, anhand von Endomyokardbiopsien (Erstbiopsie und Konsekutivbiopsie) die Manifestation und den Verlauf der durch diese beiden Viren ausgelösten entzündlichen Kardiomyopathien besser zu charakterisieren.

### **Material und Methodik:**

Als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit dienten 86 formalinfixierte und paraffineingebettete Endomyokardbiopsien (Erstbiopsien und Konsekutivbiopsien) von insgesamt 49 Patienten. Die Herzmuskelbiopsien wurden mit routinehistologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Methoden untersucht. Die histologische Einteilung der Myokarditiden erfolgte anhand der Dallas-Klassifikation (Erstbiopsie: aktive Myokarditis, Borderline Myokarditis ohne Fibrose, Borderline Myokarditis mit Fibrose; konsekutive Biopsien: chronische Myokarditis ohne oder mit Fibrose, abheilende und abgeheilte Myokarditis). Zusätzlich durchgeführte

immunhistologische Untersuchungen waren notwendig, um die Entzündungsreaktion im Herzen besser zu charakterisieren. Die nested-PCR diente dem Nachweis von viralen genetischen Sequenzen von PVB19 und/oder HHV6 in den Endomyokardbiopsien. Die quantitative PCR wurde genutzt, um den Typus der PVB19-Virusinfektion (akut, persistierend, latent) zu charakterisieren. Soweit wie möglich wurden klinische Informationen (Zeitdauer der Erkrankung, NYHA, LVEF) berücksichtigt und der neuen klinisch-pathologischen Einteilung der Myokarditiden nach Baughman (fulminante, akute, chronisch aktive Myokarditis) zugeordnet.

### **Ergebnisse:**

Aufgrund der Ergebnisse der nested-PCR in den Erstbiopsien konnte folgende Gruppeneinteilung vorgenommen werden:

Gruppe 1: PVB19-positive/HHV6-negative Patienten (n = 28);

Gruppe 2: PVB19-positive/HHV6-positive Patienten (n = 7);

Gruppe 3: PVB19-negative/HHV6-positive Patienten (n = 6);

Gruppe 4: PVB19-negative/HHV6-negative Patienten. (n = 8).

Unter Berücksichtigung der histologischen, immunhistologischen und molekular-pathologischen Befunde sowie unter Berücksichtigung klinischer Formationen wurde in Gruppe 1 bei 3 Patienten eine akute Myokarditis diagnostiziert, verursacht durch eine akute PVB19-Infektion. Bei 19 Patienten lag eine chronisch persistierende PVB19-Infektion vor im Sinne einer chronisch aktiven Myokarditis, die im Krankheitsverlauf mit einer zunehmenden Remodellierung des Myokards im Sinne einer beginnenden DCM führte. Für die Gruppe 2 manifestierte sich die Virus-assoziierte Herzmuskelerkrankung in der Erstbiopsie weitgehend als eine chronisch aktive Myokarditis. Auch hier war in den Konsekutivbiopsien ein deutlich ausgeprägter Trend zu einer Remodellierung des Myokards zu erkennen. Bei Gruppe 3 war auffallend, dass im Krankheitsverlauf es zu einer Eliminierung des HHV6-Virus in den Myokardbiopsien kam. Bei Gruppe 4 dokumentierte die Histologie und

Immunhistologie bei negativem Virusnachweis eine Borderline Myokarditis mit teilweiseem Übergang in eine Virus-negative chronische Myokarditis.

**Zusammenfassung:**

Aufgrund der sehr konsequent durchgeführten histologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Untersuchungen der Endomyokardbiopsien von insgesamt 49 Patienten mit Konsektivbiopsien bleibt folgendes festzuhalten:

PVB19-assoziierte entzündliche Kardiomyopathien sind charakterisiert durch eine chronisch persistierende Virusinfektion, bei der es im Krankheitsverlauf zu einer zunehmenden Remodellierung des Myokards kommt im Sinne einer DCM-ähnlichen interstitiellen Fibrose. Die pathogenetischen Überlegungen zur Entstehung der akuten und chronischen PVB19-assoziierten Myokarditis werden ausführlich diskutiert. Für die HHV6-assoziierten entzündlichen Kardiomyopathien bleibt zu bemerken, dass es bei alleiniger HHV6-Infektion des Myokards im Krankheitsverlauf zu einer Eliminierung des pathogenen Virus kommt. Weiterhin auffallend ist eine hohe Koinzidenz von PVB19- und HHV6-Infektionen, deren Ätiologie und Pathogenese bisher im Dunkeln bleibt.

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Abdel-Haq NM; Asmar BI (2004)  
Human herpesvirus 6 (HHV6) infection.  
Indian Journal Pediatr.; 71(1): 89-96
- [2] Aberle SW; Mandl CW; Kunz C; Popow-Kraupp T (1996)  
Presence of Human Herpesvirus 6 Variants A and B in Saliva and  
Peripheral Blood Mononuclear Cells of Healthy Adults.  
Journal Of Clinical Microbiology, 34(12): 3223-3225
- [3] Araujo: F; Koch MC; Monteiro F; Araujo AR (1999)  
Parvovirus B19 infection.  
Acta Med Port.; 12(4-6): 195-202
- [4] Arbeitskreis Blut des Robert Koch Institutes (1998)  
Stellungnahme des Arbeitskreises Blut: Parvovirus B19 [online].  
31. Sitzung des Arbeitskreises Blut am 2. Dezember 1998  
[www.rki.de/GESUND/AKBLUT/BLUT.HTM?/GESUND/AKBLUT/STEL  
L/ST03\\_4.HTM&1](http://www.rki.de/GESUND/AKBLUT/BLUT.HTM?/GESUND/AKBLUT/STEL<br/>L/ST03_4.HTM&1)
- [5] Baasner A; Dettmeyer R; Graebe M; Rissland J; Madea B (2003)  
PCR-Based Diagnosis of Enterovirus and Parvovirus B19 in Paraffin-  
Embedded Heart Tissue of Children with Suspected Sudden Infant  
Death syndrome.  
Laboratory Investigation; 83(10): 1451-1455
- [6] Baboonian C; Treasure T (1997)  
Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart  
disease.  
Heart; 78: 539-43
- [7] Barah F; Vallely PJ; Chiswick ML; Cleator GM; Kerr JR (2001)  
Association of human parvovirus B19 infection with acute  
meningoencephalitis.  
Lancet; 358; 729-730
- [8] Baughman KL (2006)  
Diagnosis of Myocarditis. Death of Dallas Criteria  
Circulation; 113: 593-595

- [9] Braun DK; Dominguez G; Pellett PE (1997)  
Human Herpesvirus 6.  
Clinical Microbiology Reviews; 10(3): 521-567
- [10] Brown KE; Young NS (1997)  
Parvovirus B19 in human disease.  
Annu. Rev. Med.; 48: 59-67
- [11] Bültmann BD; Klingel K; Sotlar K; Bock CT; Baba HA; Sauter M; Kandolf R (2003)  
Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease.  
Hum. Pathol.; 34: 8-17
- [12] Bültmann BD; Klingel K; Sotlar K; Bock CT; Kandolf R (2002)  
Parvovirus B19: a pathogen responsible for more than hematologic disorders.  
Virchows Arch.; 442(1): 8-17
- [13] Bültmann BD; Sotlar K; Klingel K (2004)  
Parvovirus B19.  
N. Engl. J. Med.; 350: 2006-2007
- [14] Caforio AL; Goldman JH; Haven AJ; Baig KM; McKenna WJ (1996)  
Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives.  
Int. J. Cardiol.; 54(2): 157-63
- [15] Calabrese F; Thiene G (2003)  
Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects.  
Cardiovascular Research; 60: 11-25
- [16] Calabrese F; van der Wal AC; Levi M (2003)  
Infection and inflammation in the cardiovascular system.  
Cardiovascular Research; 60: 1-4
- [17] Campadelli-Fiume G; Mirandola P; Menotti L (1999)  
Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen.  
Emerg. Infect. Dis.; 5(3): 353-66
- [18] Caruso A; Favilli F; Rotola A; Comar M; Horejsh D; Alessandri G; Grasse M; Di Luca D; Fiorentini S (2003)  
Human Herpesvirus-6 Modulates RANTES Production in Primary Human Endothelial Cell Cultures.  
Journal of Medical Virology; 70: 451-458

- [19] Caruso A; Rotola A; Comar M; Favilli F; Galvan M; Tosetti M; Campello C; Caselli E; Alessandri G; Grassi M; Garrafa E; Cassai E; Di Luca D (2002)  
HHV-6 Infects Human Aortic and Heart Microvascular Endothelial Cells, Increasing Their Ability to Secrete Proinflammatory Chemokines. *Journal of Medical Virology*; 67: 528-533
- [20] Caserta MT; Mc Dermott MT; Dewhurst S; Schnabel K; Carnahan JA; Gilbert L; Lathan G; Lofthus GK; Hall CB (2004)  
Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *The Journal of Pediatrics*; 145: 478-484
- [21] Chow LH; Radio SJ; Sears TD; McManus BM (1989)  
Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. *J. Am. Coll. Cardiol.*; 14: 915-920
- [22] Christin S (2001)  
Diagnostische Wertigkeit von Endomyokardbiopsien am Beispiel der inflammatorischen Kardiomyopathie.  
Inaugural-Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- [23] De Bolle L; Naesens L; De Clercq E (2005)  
Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clin. Microbiology Reviews*; 18: 217-245
- [24] De Bolle L; Van Loon J; De Clercq E; Naesens L (2005)  
Quantitative Analysis of Human Herpesvirus 6 Cell Tropism. *Journal of Medical Virology*; 75: 76-85
- [25] Dewhurst S; McIntyre K; Schnabel K; Hall CB (1993)  
Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J. Clin. Microbiol.*; 31(2): 416-8
- [26] Dockrell DH; Smith TF; Paya CV (1999)  
Human herpesvirus 6. *Mayo Clin. Proc.*; 74(2): 163-70
- [27] Elliot JF; Liu J, Yuan ZN; Bautista-Lopez N; Wallbank SL; Rayner D; Nation P; Robertson MA; Liu G; Kavanagh KM (2003)  
Autoimmune cardiomyopathy and heart block develop spontaneously in HLA-DQ8 transgenic labeta knockout in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 100(23): 13447-52

- [28] Enders G; Dötsch J; Bauer J; Nützenadel W; Hengel H; Haffner D; Schalasta G; Searle K; Brown KE (1998)  
Life-Threatening Parvovirus B19-Associated Myocarditis and Cardiac Transplantation as Possible Therapy: Two Case Reports.  
Clinical Infectious Diseases; 26: 355-8
- [29] Flamand L; Gosselin J; Stefanescu I; Ablashi D; Menezes J (1995)  
Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell-functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation.  
Blood; 85(5): 1263-71
- [30] Gallo P; d'Amati G (2004)  
Cardiomyopathies.  
Cardiovascular Pathology, Hrsg. Silver MD; Gotlieb AI; Schoen FJ, Third Edition.  
New York: Verlag Churchill Livingstone
- [31] Gentile G (2000)  
Post-transplant HHV-6 Diseases.  
Herpes 7:1: 24-27
- [32] Grässl G; Pummerer CL; Horak I; Neu N (1995)  
Induction of Autoimmune Myocarditis in Interleukin-2-Deficient Mice.  
Circulation; 95: 1173-1776
- [33] Günzburg WH (2005)  
Homepage des Forschungsinstitutes für Virologie und Biomedizin [online].  
<http://www.vu-wien.ac.at>
- [34] Haller OA; Mertens TH; Klenk HD (2004)  
Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten, Leitlinien der Gesellschaft für Virologie [online]  
2. Auflage München, Jena: Verlag Urban und Fischer
- [35] Hauck AJ, Kearney DL, Edward WD (1989)  
Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error.  
Mayo. Clin. Proc.; 64: 1235-1245
- [36] Heegaard ED; Brown KE (2002)  
Human Parvovirus B19.  
Clinical Microbiology Reviews; 15(3): 485-505

- [37] Hübl W (2004)  
PCR-Polymerase Chain Reaction [online].  
[www.med4you.at/laborbefunde/techniken/lbef\\_pcr.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/lbef_pcr.htm)  
Download vom 28.12.2004
- [38] Hueffer K; Truyen U; Parrish CR (2004)  
Evolution und Wirtswechsel des Caninen Parvovirus: Molekulare Grundlagen der Entstehung eines neuen Virus.  
Berl. Münsch. Tierärztl. Wschr.; 117: 130-135
- [39] Hufnagel G; Pankuweit S; Portig I; Schönian U [2004]  
Akut- und chronisch entzündliche Erkrankungen des Myokards [online].  
[www.uni-marburg.de/herzzentrum/hzb6.htm](http://www.uni-marburg.de/herzzentrum/hzb6.htm)
- [40] Inoue N; Dambaugh TR; Pellett PE (1993)  
Molecular biology of human herpesviruses 6A and 6B  
Infect Agents Dis.;2(6): 343-60
- [41] Izumi T; Takehana H; Matsuda C; Yokoyama H; Kohno K; Suzuki K; Inomata T (2000)  
Experimental Autoimmune Myocarditis and Its Pathomechanism.  
Herz; 25 (3): 274-278
- [42] Jordan JA; Huff D; DeLoia JA (2001)  
Placental Cellular Immune Response in Women Infected with Human Parvovirus B19 during Pregnancy.  
Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology; 8(2): 288-292
- [43] Jung EG (Hrsg.); Bahmer FA; Bofanovsky A; Boonen H; Froesewitte U; Girbig P; Grimm M; Herz E; Hofmann H; Miller X; Moll I; Rauterberg A; Voigtländer V; Weiß J (1998) Dermatologie Duale Reihe.  
Hippokrates-Verlag, Stuttgart
- [44] Kandolf R (2004)  
Virusätiologie der inflammatorischen Kardiomyopathie.  
Dtsch. Med. Wochenschr., 129, 2187-2192
- [45] Kasahara H; Itoh M; Sugiyama T; Kido N; Hayashi H; Saito H; Tsukita S; Kato N  
Autoimmune Myocarditis Induced in Mice by Cardiac C-Protein.  
J. Clin. Invest.; 94: 1026-1036



- [46] Kaufmann B; Simpson AA; Rossmann MG (2004)  
The structure of human parvovirus B19.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 101(32): 11628-11633
- [47] Kawai C (1999)  
From Myocarditis to Cardiomyopathy: Mechanisms of Inflammation  
and Cell Death. Learning from the Past for the Future  
Circulation; 99, 1091-1100
- [48] Kawai S; Shimizu M; Okada R; Ih S (1987)  
A morphological Analysis of Chronic Myocarditis.  
Jpn. Circ. J.; 51: 1385-1392
- [49] Kaya Z (2005)  
Die Bedeutung des Immunsystems in der Pathogenese der  
Myokarditis und dilatativen sowie ischämischen Kardiomyopathie  
[online].  
Forschungsbericht der Universität Heidelberg.  
[www.klinikum.uni-heidelberg.de/index](http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/index)
- [50] Kazak I (2002)  
Th1-Th2-Zytokine bei entzündlicher Herzmuskelerkrankung.  
Inaugural-Dissertation, Universität Heidelberg [online].  
[www.diss.fu-berlin.de/2002/70](http://www.diss.fu-berlin.de/2002/70)
- [51] Kerr JR (2000)  
Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease.  
Ann. Rheum. Dis.; 59: 672-683
- [52] Kerr JR; Barah F; Matthey DL; Laing I; Hopkins SJ; Hutchinson IV;  
Tyrrell DA (2001)  
Circulating tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma are  
detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and  
are associated with prolonged and chronic fatigue.  
J. Gen. Virol.; 82: 3011-9
- [53] Kishore J; Kapoor A (2000)  
Erythrovirus B19 infection in humans.  
Indian J. Med. Res.; 112: 149-64
- [54] Klingel K; Hohenadl C; Canu A; Albrecht M; Seemann M; Mall G;  
Kandolf R (1992)  
Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent  
heart muscle infection: Quantitative analysis of virus replication, tissue  
damage and inflammation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 89: 314-318

- [55] Klingel K; Sauter M; Bock TC; Szalay G; Schnorr JJ; Kandolf R (2004)  
Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy.  
*Med. Microbio. Immunol.*; 193: 101-107
- [56] Klingel K; Selinka HC; Sauter M; Bock TC; Szalay G; Kandolf R (2002)  
Molecular mechanism in enterovirus and parvovirus B19 associated  
myocarditis and inflammatory cardiomyopathy.  
*European Heart Journal Supplements*; 4 (Supplement I), I8-I12
- [57] Knowlton KU, Badroff C (1999)  
The Immune System in Viral Myocarditis: Maintaining the Balance.  
*Circ. Res.*; 85: 559-561
- [58] Koch WC (2001)  
Fifth (human parvovirus) and sixth (herpes virus 6) diseases.  
*Curr. Opin. Infect. Dis.*; 14: 343-356
- [59] Krueger GR; Ablashi DV (2003)  
Human herpesvirus-6: a short review of its biological behaviour.  
*Intervirology*; 46: 257-69
- [60] Ku L; Feiger J; Taylor M; Mestroni L (2003)  
Familial Dilated Cardiomyopathy.  
*Circulation*; 108: 118-121
- [61] Kühl U; Pauschinger M; Bock T; Klingel K; Schwimmbeck CPL;  
Seeberg B; Krautwurm L; Poller W; Schultheiss H-P; Kandolf R (2003)  
Parvovirus B19 Infection Mimicking Acute Myocardial Infarction.  
*Circulation*; 108: 945-950
- [62] Kühl U; Pauschinger M; Noutsias M; Seeberg B; Bock T; Lassner D;  
Poller W; Kandolf R; Schultheiss HP (2005)  
High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the  
myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction.  
*Circulation*; 111: 887-93
- [63] Kurtzmann GJ; Cohen BJ; Field AM; Oseas R; Blaese RM; Young NS  
(1989)  
Immune Response to B19 Parvovirus and an Antibody Defect in  
Persistent Viral Infection.  
*The Journal of Clinical Investigation*; 84: 1114-1123
- [64] Lamparter S; Schoppet M; Pankuweit S; Maisch B (2003)  
Acute Parvovirus B19 infection associated with myocarditis in an  
immunocompetent adult.  
*Human Pathology*; 34: 725-728

- [65] Leslie K; Blay R; Haisch C; Lodge A; Weller A; Huber S (1989)  
Clinical and Experimental Aspects of Viral Myocarditis.  
Clinical Microbiology Reviews; 2: 191-203
- [66] Liao L; Sindhvani R; Leinwand L; Diamone B;; Factor S (1993)  
Cardiac Alpha-Myosin Heavy Chains Differ in Their Induction of  
Myocarditis.  
J. Clin. Invest.; 92: 2877-2882
- [67] Lotze U; Egerer R; Tresselt C; Glück B; Dannberg G; Stelzner A;  
Figulla HR (2004)  
Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of  
adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.  
Med. Microbiol. Immunol.;193(2-3): 75-82. Epub. 2003
- [68] Mahrholdt H; Goedecke C; Wagner A; Meinhardt G; Athanasiadis A;  
Vogelsberg H; Fritz P; Klingel K; Kandolf R; Sechtem U (2004)  
Cardiovascular Magnetic Resonance Assessment of Human  
Myocarditis.  
Circulation; 109: 1250-1258
- [69] Mahrholdt H; Wagner A; Deluigi CC; Kispert E; Hager S; Meinhardt G;  
Vogelsberg H; Fritz P; Dippon J; Bock CT; Klingel K; Kandolf R;  
Sechtem U (2006)  
Presentation, Patterns of Myocardial Damage, and Clinical Course  
of Viral Myocarditis  
Circulation; 114: 1581-1590
- [70] Maisch B (1998)  
Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC Task Force.  
Mehr Fragen als Antworten?  
Med. Klin.; 93: 199-209
- [71] Maisch B; Portig I; Ristic A; Hufnagel G; Pankuweit S (2000)  
Definition der entzündlichen Kardiomyopathien (Myokarditis): Auf dem  
Weg zu einem Konsens. Ein Statusreport  
Herz 25: 200-209
- [72] Maisch B; Ristia AD; Hufnagel G; Pankuweit S (2002)  
Pathophysiology of viral myocarditis. The role of humoral immune  
response.  
Cardiovascular Pathology; 11: 112-122

- [73] Maron BJ; Towbin JA; Thiene G; Antzelevitch Ch; Corrado D; Arnett D; Moss AJ; Seidmann CE; Young JB (2006)  
Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies  
*Circulation*; 113: 1807-1816
- [74] Martin AB; Webber S; Fricker FJ et al. (1994)  
Acute Myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children.  
*Circulation*; 90: 330-339
- [75] Mason JW (2003)  
Myocarditis and dilated cardiomyopathy: An inflammatory link.  
*Cardiovascular Research*; 60: 5-10
- [76] Mason JW; O`Connell JB; Herskowitz A et al. (1995)  
A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis.  
*N. Engl. J. Med.*; 333: 269-275
- [77] McLaughlin L; Zhu G; Musini M; Ley-Ebert C; Stuart WD; Florio CJ; Groen PA; Witt SA; Kimball TR; Witte DP; Harmony JAK; Aronow BJ (2000)  
Apolipoprotein J/ clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis.  
*J. Clin. Invest.*; 106: 1105-1113
- [78] Mestroni L; Rocco C; Gregari D; Sinagra G; Di Lenarda A; Miodic S; Vatta M; Pinamonti B; Muntoni F; Caforio AL; McKenna WJ; Giacca M; Camerini (1999)  
Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity.  
*J. Am. Coll. Cardiol.*; 34(1): 181-90
- [79] Michels VV; Moll PP; Rodeheffer RJ; Miller FA Jr; Tajik AJ; Burnett Jr; Driscoll DJ; Thibodeau SN; Ansari AA; Herskowitz A (1994)  
Circulating heart autoantibodies in familial as compared with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy.  
*Mayo. Clin. Proc.*; 69(1): 24-7
- [80] Modrow S (2001)  
Parvovirus B19: Ein Infektionserreger mit vielen Erkrankungsbildern.  
*Dtsch. Ärzteblatt*; 24: 1620-1624
- [81] Modrow S (2004)  
Untersuchung zur Zellspezifität des humanen Parvovirus B19 [online].  
[www.uni-regensburg.de/Universitaet/Forschungsbericht/Med/mikro/prof4.html](http://www.uni-regensburg.de/Universitaet/Forschungsbericht/Med/mikro/prof4.html)  
Forschungsbericht der Universität Regensburg 2000-2003

- [82] Modrow S; Dorsch S; Spall T; Möbs M; Netuschil N; Eichinger C (2003)  
Die Funktion der VP1-unique region im Kapsidprotein VP1 des humanen Parvovirus B19 für Zelltropismus, Pathogenese und Immunabwehr [online].  
www.uni-regensburg.de/Universitaet/Forschungsbericht/Med/mikro/prof4.html  
Forschungsbericht der Universität Regensburg 2000-2003
- [83] Modrow S; Knöll A; Plentz A; Raab U; Beckenlehner K; Herrmann A (2003)  
Assoziation der Parvovirus B19-Infektion mit rheumatischen Erkrankungen des Kindesalters [online].  
www.uni-regensburg.de/Universitaet/Forschungsbericht/Med/mikro/prof4.html  
Forschungsbericht der Universität Regensburg 2000-2003
- [84] Mohan SB; Parker M; Wehbi M; Douglass P (2002)  
Idiopathic dilated cardiomyopathy: A common but mystifying cause of heart failure.  
Cleveland Clinic Journal of Medicine; 59 (5): 481-487
- [85] Naegeli B (2004)  
Myokarditis: Diagnostik und Verlauf.  
Kardiovaskuläre Medizin; 7: 248-257
- [86] Neu N; Rose NR; Beisel KW; Herskowitz A; Gurri-Glass G; Craig SV (1987)  
Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice.  
J. Immunol.; 139 (11): 3630-6
- [87] Norbeck O; Tolfvenstamm T; Shields LE; Westgren M; Brodilen K (2004)  
Parvovirus B19 capsid protein VP2 inhibits hematopoiesis in vitro and in vivo: implications for therapeutic use.  
Exp. Hematol., 32: 1082-1087
- [88] Noutsias M; Pauschinger M; Kuhl U; Schultheiss HP (2002)  
Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie. Neue Wege in Diagnostik und Therapie.  
MMW Fortschr. Med.; 144 (14): 36-40
- [89] Noutsias M; Pauschinger M; Kühl U; Schultheiss HP (2003)  
Inflammatorische Kardiomyopathie: Aktuelle Aspekte in der Pathogenese, Diagnose und immunmodulatorischen Therapie.  
Cardiovasc 2003; 3 (2): 34-41 (2003)

- [90] Novatec Immundiagnostica GmbH [2004]  
Produktinformation zu Parvovirus B19: igG-ELISA (rekombinant)  
[online]  
www.novatec-id.com
- [91] O`Connell JB (1987)  
The Role of Myocarditis in End-Stage Dilated Cardiomyopathy.  
Texas Heart Institute Journal; 14: 268-275
- [92] Orita M; Suzuki Y; Sekiya T; Hayashi K (1992)  
Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA-  
polymorphisms using the polymerase chain reaction.  
Science; 257: 967-971
- [93] Osterziel KJ; Scheffold T; Pierrot A; Dietz R (2001)  
Genetics of dilated cardiomyopathy.  
Z. Kardiol.; 90(7): 461-9
- [94] Pankuweit S; Moll R; Baandrup U; Portig I; Hufnagel G; Maisch B  
(2003)  
Prevalence of the Parvovirus B19 Genome in Endomyocardial Biopsy  
Specimens.  
Human Pathology; 34: 497-503
- [95] Penninger JM; Pummerer C; Liu P; Neu N; Bachmaier K (1997)  
Cellular and molecular mechanisms of murine autoimmune  
myocarditis.  
APMIS.; 105(1): 1-13
- [96] Prezioso PJ; Cangiarella J; Lee M; Nuovo GJ; Borokowsky W; Orlow  
SJ; Greco MA (1992)  
Fatal disseminated infection with human herpesvirus-6.  
J. Pediatr.; 120(6): 921-3
- [97] Rohayem J; Dinger J; Fischer R; Klingel K; Kandolf R; Rethwilm A  
(2001)  
Fatal Myocarditis Associated with Acute Parvovirus B19 and Human  
Herpesvirus 6 Coinfection.  
Journal of Clinical Microbiology; 39(12) 4585-4587
- [98] Rose NR; Beisel KW; Herskowitz A; Neu N; Wolfgram LJ; Alvarez R;  
Traystman MD; Craig SW (1987)  
Cardiac myosin and autoimmune myocarditis.  
Ciba Found Symp.; 129: 3-24

- [99] Sabella C; Goldfarb J (1999)  
Parvovirus B19 infections.  
Am. Fam. Physician.; 60(5) :1455-60
- [100] Sauvant G; Bossart W; Kurrer MO; Follath F (2000)  
Diagnose und Verlauf bei Myokarditis: eine Erhebung in den  
Medizinischen Kliniken des Universitätsspitals Zürich im Zeitraum von  
1980-1998  
Schweiz Med. Wochenschr.; 130: 1265-1271
- [101] Schowengerdt KO; Ni J; Denfield SW; Gajarski RJ; Bowles NE;  
Rosenthal G; Kearney DL; Price JK; Rogers BB; Schauer GM;  
Chinnock RE; Towbin JA (1997)  
Association of Parvovirus B19 Genome in Children With Myocarditis  
and Cardiac Allograft Rejection.  
Circulation; 96: 3549-3554
- [102] Schultheiß HP; Pauschinger M; Kühl U. (1998)  
Pathogenese der entzündlichen Kardiomyopathie.  
Med. Klin.; 93: 229-235
- [103] Schwimmbeck PL; Rohn G; Wrusch A; Schulze K; Doerner A; Kühl U;  
Tschoepe C; Pauschinger M; Schultheiss HP (2000)  
Enteroviral and Immune Mediated Myocarditis in SCID mice.  
Herz; 25 (3): 240-244
- [104] Sol N; Le Junter J; Vassias I; Freyssinier JM; Thomas A; Prigent AF;  
Rudkin BB; Fichelson S; Morinet F (1999)  
Possible Interactions between the NS-1 Protein and Tumor Necrosis  
Factor Alpha Pathways in Erythroid Cell Apoptosis Induced by Human  
Parvovirus B19.  
Journal of Virology; 73 (10): 8762-8770
- [105] Spranger S ; Ivandic M ; Spranger S ; Pfaller-Spranger M [2004]  
Müdigkeitssyndrom (CFS= Chronique Fatigue Syndrome) [online]  
[www.ingolab.de/Igel/Muedigkeitssyndrom.html](http://www.ingolab.de/Igel/Muedigkeitssyndrom.html)
- [106] Stefan A; Menotti L; Campadelli-Fiume G (1999)  
The Biology and Natural History of Two Emerging Pathogens: Human  
Herpesviruses 6 and 7.  
Herpes 6:3: 78-81
- [107] Szalay G; Sauter M; Hald J; Weinzierl A; Kandolf R; Klingel K (2006)  
Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in  
ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders.  
Am. J. Pathol.; 169: 2085-2093

- [108] Taylor MRG; Carniel E; Mestroni L (2003)  
Familial dilated cardiomyopathy [online].  
Orphanet encyclopedia  
[www.orpha.net/data/patho/GB/uk-FDCardiomyopathy](http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-FDCardiomyopathy)
- [109] Thorley-Lawson DA; Gross A (2004)  
Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas.  
N. Engl. J. Med.; 350, 1328-1337
- [110] Towbin JA (1993)  
Molecular genetic aspects of cardiomyopathy.  
Biochem. Med. Metab. Biol.; 49(3): 285-320
- [111] Truyen U (1999)  
Charakterisierung eines neuen Genotyps des caninen Parvovirus und seine weltweite Ausbreitung [online].  
Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V., Bonn  
Abschlussbericht Projekte 1999
- [112] Truyen U (2000)  
Canine Parvovirus [online].  
Recent Advances in Canine Infectious Diseases.  
International Veterinary Information Service  
[www.ivis.org/advances/Infect\\_Dis\\_Carmichael/truyen/ivis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/truyen/ivis.pdf)
- [113] van Elsacker-Niele AM; Kroes AC (1999)  
Human parvovirus B19: relevance in internal medicine.  
Neth. J. Med.; 54(6): 221-30
- [114] von Baehr V [2004]  
Labordiagnostik chronisch persistierender Virusinfektionen [online].  
[www.fatigatio.de/29/](http://www.fatigatio.de/29/)
- [115] von Baehr V; von Baehr R (2000)  
Zelluläre Immunologie [online].  
[www.verein-cfs.ch/dokumente/wissen/..%5Cmedizinische\\_fachpublikationen%5Ccf\\_s02200.htm](http://www.verein-cfs.ch/dokumente/wissen/..%5Cmedizinische_fachpublikationen%5Ccf_s02200.htm)
- [116] Waring Mark (2004)  
Myokarditis (Herzmuskelentzündung) [online]  
Homepage des Deutschen Medizin-Netzes  
<http://www.medizin-netz.de/icenter/myokarditis.htm>



- [117] Wilke A; Kaiser A; Ferency I; Maisch B (1996)  
Alkohol und Myokarditis.  
Herz; 21: 248-257
- [118] Winsconsin Viral Research Group [2004]  
Ltd. About HHV-6  
[www.wisconsinlab.com](http://www.wisconsinlab.com)
- [119] Winters GL; McManus BM (2004)  
Myocarditis.  
Cardiovascular Pathology, Hrsg. Silver MD; Gotlieb AI; Schoen FJ,  
Third Edition  
New York: Verlag Churchill Livingston
- [120] Yoshikawa T; Ihira M; Suzuki K; Suga S; Kito H; Iwasaki T; Kurata T;  
Tanaka T; Saito Y; Asano Y (2001)  
Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6  
infection.  
J. Clin. Pathol.; 54(10): 792-5
- [121] Young NS (1995)  
B19 Parvovirus.  
Baillieres Clin. Haematol.; 8(1): 25-56
- [122] Zerbini M; Gallinella G; Cricca M; Bonvicini F; Musiani M (2002)  
Diagnostic procedures in B19 infection.  
Pathol. Biol. (Paris); 50(5): 332-8

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. D. Bültmann für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung vor allem in der Endphase dieser Arbeit.

Mein Dank gilt dem Institut für molekulare Pathologie, hier besonders Prof. Dr. R. Kandolf, für die Überlassung molekularbiologischer Befunde.

Ein herzliches Dankeschön an das Sekretariat von Prof. Dr. B. D. Bültmann für die Geduld und Unterstützung.

Ein Dankeschön an Herrn R. Lambrecht für die Hilfe bei EDV-Problemen und der Bereitstellung von histologischen Abbildungen.

Desweiteren danke ich Herrn Sascha Tachlinski für die Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit.

## Lebenslauf

- 01.08.1974 Andrea Barbara Schwarzmaier,  
geboren in Böblingen als viertes Kind  
von Prof. Dr. Walter Schwarzmaier und  
Sigrid Schwarzmaier, geb. Wurster
- 1980-1985 Grundschule Königsknoll, Sindelfingen  
1985-1994 Stiftsgymnasium Sindelfingen,  
Abschluss Abitur
- 1995-1997 Ausbildung zur MTAR,  
Katharinenhospital Stuttgart
- 1997-2002 Studium der Zahnheilkunde an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
Examen 22. November 2002
- 29.09.1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
29.03.2000 Zahnärztliche Vorprüfung  
22.11.2002 Zahnärztliche Prüfung
- ab 01.02.2003 Ausbildungsassistentin in der Zahnarztpraxis  
Dr. A. Altvater, Sindelfingen
- seit 01.04.2005 Gemeinschaftspraxis für spezialisierte Zahnärzte  
zusammen mit Dr. A. Altvater, Sindelfingen