

Aus der Medizinischen Klinik u. Poliklinik, Innere Medizin III

Medizinische Fakultät, Fachbereich 4

Universitätsklinikum des Saarlandes

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Böhm

**Prognoseprädiktoren bei Patienten mit Verdacht auf
Myokarditis -
Stellenwert von klinischen und histologischen
Parametern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2012

vorgelegt von

Thomas Müller

geboren am 02.12.1968 in Paderborn

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Symbole	IV
1. Zusammenfassung	1
1.1. Zusammenfassung	
1.2. Abstract	
2. Einleitung	5
2.1. Ätiologie und Pathogenese der Myokarditis	
2.2. Grenzen der nichtinvasiven Myokarditisdiagnostik	
2.3. Diagnostik der Myokarditis anhand von Myokardbiopsien	
2.3.1. Die Dallas-Klassifikation	
2.3.2. Das Problem des „Sampling-Errors“	
3. Material und Methoden	15
3.1. Patientenevaluation	
3.2. Studienprotokoll	
3.3. Nichtinvasive Untersuchungsmethoden	

- 3.3.1. Klinisch-chemische Laborparameter und Virusserologie
- 3.3.2. Echokardiographie
- 3.3.3. Kardiale Magnetresonanztomographie
- 3.4. Invasive Untersuchungsmethoden
 - 3.4.1. Herzkatheteruntersuchung und Endomyokardbiopsie
 - 3.4.2. Aufarbeitung der Endomyokardbiopsien
 - 3.4.2.1. Histologie
 - 3.4.2.2. Immunhistologie
 - 3.4.2.3. Molekularbiologische Diagnostik
- 3.5. Endpunkte
- 3.6. Statistik

4. Ergebnisse

28

- 4.1. Patientencharakteristika
- 4.2. Ergebnisse der Endomyokardbiopsien
- 4.3. Medikamentöse Therapie
- 4.4. Nachbeobachtung
- 4.5. Prognoseprädiktoren

5. Diskussion

45

- 5.1. Stellenwert der klinischen Parameter zur Prognoseabschätzung bei Verdacht auf Myokarditis
- 5.2. Stellenwert der Endomyokardbiopsie zur Prognoseabschätzung bei Verdacht auf Myokarditis

- 5.2.1. Bedeutung der lichtmikroskopischen Beurteilung der Myokardbiopsien gemäß der Dallas-Kriterien
- 5.2.2. Bedeutung immunhistochemischer Methoden in der Beurteilung von Endomyokardbiopsien
- 5.2.3. Prognostische Relevanz des endomyokardbiopsischen Virusnachweises

6. Literaturverzeichnis	53
7. Danksagung	70
8. Lebenslauf	72

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
AHA	American Heart Association
ASE	American Society of Echocardiography
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Isoenzym MB der Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECLIA	Elektrochemolumineszenz Immuno Assay
EDV	Enddiastolisches Volumen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EIA	Enzyme Immuno Assay
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
ESC	European Society of Cardiology
ESV	Endsystolisches Volumen
F	French (1 French = 1/3 mm)
FS	Verkürzungsfraktion
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
g/l	Gramm pro Liter
gRE	global Relative Enhancement
HASTE	Half-Fourier Single-Shot Turbo-Spin-Echo
H.-E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HTX	Herztransplantation

HR	Hazard Ratio
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IR-Sequenz	Inversion-Recovery-Sequenz
KI	Konfidenzintervall
LGE	Late Gadolinium Enhancement
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MRT	Magnetresonanztomographie
NYHA	NewYork Heart Association
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVB19	Parvovirus B19
RNA	Ribonukleinsäure
STIR	Short-Tau-Inversion-Recovery
µl	Mikroliter

1. Zusammenfassung:

1.1. Zusammenfassung:

Einleitung: Eine viral bedingte Myokarditis kann durch Autoimmunreaktionen und Entzündung zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen. Prädiktoren zur Abschätzung des klinischen Verlaufs sind bislang noch nicht definiert worden. Ziel dieser Studie war die Identifizierung prognoserelevanter Faktoren bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Myokarditis, denen endomyokardiale Biopsien entnommen wurden.

Methodik: Zwischen 1994 und 2007 wurden 181 Patienten mit klinischem Verdacht auf viral bedingte Myokarditis über einen mittleren Zeitraum von 59 Monaten beobachtet. Die Patienten wurden anamnestiziert und körperlich sowie echokardiographisch untersucht. Nach koronarangiographischem Ausschluss einer relevanten koronaren Herzerkrankung wurden bei allen Patienten Endomyokardbiopsien entnommen, die mittels histologischer (Dallas Kriterien) und immunhistologischer Methoden untersucht wurden. Zum Nachweis intramyokardialen Virusgenoms wurden molekularbiologische Techniken eingesetzt. Primärer Endpunkt der klinischen Nachverfolgung war die Zeit bis zum kardial bedingten Tod oder zur Herztransplantation.

Ergebnisse: Bei 69 Patienten (38%) waren die Dallas Kriterien positiv. Immunhistologische Zeichen einer Entzündung fanden sich bei 91 Probanden (50%). Genomsequenzen von fünf verschiedenen Virusspezies wurden bei 79 Patienten nachgewiesen (44%). Während der Nachbeobachtungszeit erreichten 40 Patienten (22%) den primären Endpunkt. Nach der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurden drei unabhängige Prädiktoren identifiziert: eine

fortgeschrittene Herzinsuffizienz im NYHA- Stadium III oder IV zum Zeitpunkt der Diagnose (Hazard ratio (HR) 3,2; 95% KI 1,36 bis 7,57; $p=0,008$), der immunhistologische Nachweis von entzündlichen Infiltraten im Myokard (HR 3,46; 95% KI 1,39 bis 8,62; $p= 0,008$) und als protektiver Prädiktor die Therapie mit Beta-Rezeptor-Antagonisten (HR 0,43; 95% KI 0,21 bis 0,91; $p=0,027$). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, der linksventrikuläre enddiastolische Druck und der enddiastolische Dimensionsindex erwiesen sich lediglich in der univariaten, nicht aber in der multivariaten Analyse als prädiktiv. Weder die Dallas Kriterien noch der Nachweis von viralen Genomanteilen hatte eine signifikante prognostische Relevanz.

Schlussfolgerung: Bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Myokarditis sind eine fortgeschrittene NYHA-Funktionsklasse, immunhistologische Zeichen der Entzündung und das Fehlen einer Betablockertherapie mit einer schlechten Prognose verbunden. Die Kombination dieser Prädiktoren ermöglicht es, Hochrisikopatienten mit klinischem Verdacht auf Myokarditis zu identifizieren. Dagegen ist weder die alleinige lichtmikroskopische Beurteilung von Endomyokardbiopsien gemäß den Dallas-Kriterien noch der qualitative Nachweis von Virusgenom zur Risikostratifikation geeignet.

1.2 Abstract

Predictors of Outcome in Patients with Suspected Myocarditis

Introduction: Viral myocarditis triggering autoimmune reaction and inflammation can lead to dilated cardiomyopathy. Predictors of clinical outcome have not been defined so far. The objective of this study was the identification of prognostic indicators in patients with suspected myocarditis who underwent endomyocardial biopsy.

Methods: Between 1994 and 2007 one hundred eighty-one consecutive patients with clinically suspected viral myocarditis were enrolled and followed up for a mean of 59 months. All patients underwent history taking, physical examination and echocardiography. Relevant coronary artery disease was excluded by means of coronary angiography. In endomyocardial biopsies inflammation was analyzed by histological (Dallas criteria) and immunohistological methods. Intramyocardial virus genome was detected by molecular biological techniques. The primary clinical endpoint was time to cardiac death or heart transplantation.

Results: In 69 of the patients (38%) Dallas criteria were positive. Immunohistological signs of inflammation were shown in 91 individuals (50%). Genomes of five different cardiotropic virus species were detected in 79 subjects (44%). During follow up 40 patients (22%) reached the primary endpoint. According to multivariate Cox-regression analysis three independent predictors were identified for the primary endpoint, namely NYHA class III or IV (hazard ratio (HR) 3.2; 95% CI 1.36 to 7.57; $p=0.008$, immunohistological evidence of inflammatory infiltrates in the myocardium (HR 3.46, 95% CI 1.39 to 8.62; $p=0.008$) as well as beta blocker therapy (HR 0.43, 95% CI 0.21 to 0.91; $p=0.027$). Left ventricular ejection fraction, left ventricular enddiastolic pressure

and left ventricular enddiastolic dimension index were predictive only in univariate but not in multivariate analysis. Neither the Dallas criteria nor the detection of viral genome per se were predictors of outcome.

Conclusion: For patients with suspected myocarditis advanced NYHA functional class, immunohistological signs of inflammation and the lack of beta blocker therapy are related to poor outcome. Combination of these predictors helps to identify populations at high risk with suspected myocarditis. However, neither examination of endomyocardial biopsies according to the histological Dallas criteria nor the qualitative detection of viral genome contributes to risk stratification.

2. Einleitung

2.1. Ätiologie und Pathogenese der Myokarditis

Der Begriff „Myokarditis“ wurde im Jahr 1837 von Sobernheim eingeführt (Sobernheim, 1837). Er beschreibt eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskels, die in unterschiedlichem Umfang die Myozyten, das interstitielle und perivaskuläre Bindegewebe sowie Koronararteriolen, Kapillaren und - selten - die großen epikardialen Herzkranzgefäße einbezieht (Strauer et al., 2001, Schwarzkopf et al., 1997.). Nachdem im 20. Jahrhundert zunächst im Rahmen autoptischer Studien eine überraschend hohe Prävalenz der Myokarditis nachgewiesen wurde (Saphir, 1941), stellte die Entwicklung der Endomyokardbiopsie einen Meilenstein in der intravitalen histologischen Diagnose der Erkrankung dar (Fenoglio et al., 1983).

In der aktuellen Definition und Klassifikation der Kardiomyopathien der American Heart Association (AHA) wird die Myokarditis oder inflammatorische Kardiomyopathie in der Gruppe der primären Kardiomyopathien berücksichtigt (Maron et al., Circulation 2006).

Das klinische Bild einer Myokarditis bietet ein Spektrum von klinisch inapparenten bis hin zu fulminant akuten und chronischen Verläufen. Hierbei kommt es zumeist zu einem fokalen, selten diffusen Befall eines Ventrikels oder beider Ventrikel. Verschiedene Mechanismen können den entzündlichen Prozess auslösen, die sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: Nichtinfektiöse und infektiöse Erkrankungen.

Die nichtinfektiöse Herzmuskelentzündung kann direkt toxisch bedingt sein, zum Beispiel durch Alkohol, Kokain, Zytostatika (Schoppet et al., 2001; Rump et al., 1995; Zuppinger et al., 2007), oder im Rahmen einer hypersensitiven Reaktion auf Medikamente, zum Beispiel Antibiotika, Sulfonamide (Billingham

et. al., 1997), Neuroleptika (Killian et al., 1999), Antidepressiva (Ansari et al., 2003) oder bei systemischen Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses (Frustraci et al., 1996), Sklerodermie (Clemson et al., 1992), Zöliakie (Frustraci et al., 2002) oder bei Morbus Whipple (Gordon et al., 2004) auftreten.

Die infektiöse Myokarditis kann durch Bakterien (Wasi et al., 2003), Pilze (Nosanchuk, 2002), Parasiten (Franco-Paredes et al., 2007) und Viren (Pauschinger et al., 2004) verursacht werden; während das Protozoon *Trypanosoma cruzi*, Erreger der Chagas-Krankheit, häufigste Ursache für eine Myokarditis weltweit ist (Marin-Neto et al., 2007), werden in Europa und den USA die meisten Herzmuskelentzündungen durch Viren hervorgerufen. Das Spektrum der Viren, welche eine Myokarditis auslösen können, ist groß. Neben der Gruppe der Enteroviren (Coxsackie A und B, Echoviren) sind Adenoviren, das Epstein-Barr-Virus, der Typ 6 des Humanen Herpesvirus und das Parvovirus B19 wichtige Vertreter der kardiotropen Viren (Kühl et al., 2005).

Angesichts der Variabilität der möglichen klinischen Manifestationen und damit verbunden der schwierigen Diagnostik der Myokarditis sind genaue Daten zur Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung nicht bekannt. Ergebnisse aus unselektionierten Autopsiestudien belegen eine Prävalenz zwischen 1% (Gravanis et al., 1991) und 10% (Kereiakes et al., 1984). Ist das Patientengut jedoch klar definiert, wie zum Beispiel junge Erwachsene, die an einem plötzlichen Herztod starben, steigt die Prävalenz auf 9% (Fabre et al., 2005) bis 12% (Doolan et al., 2004).

Fulminante Verläufe der Myokarditis treten vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern auf, chronische Verläufe sind hier selten (Canter, 2005). Deren Häufigkeit steigt in der Gruppe der Jugendlichen und Erwachsenen. (Herskowitz et al., 1993).

Die Virusmyokarditis kann als voranschreitende Krankheit betrachtet und in drei nacheinander ablaufende Stadien eingeteilt werden:

In der ersten Phase kommt es zunächst zu einer myokardialen Verletzung (Mason et al., 2003). Im Tiermodell wurden in dieser Phase zwei mögliche Schädigungsmechanismen identifiziert: Direkte Myozytolyse als Folge der intrazellulären Virusreplikation (Chow et al., 1992) und zytotoxische Effekte vermittelt durch das zelluläre und humorale Immunsystem (Binah et al., 2002). Im Rahmen der physiologischen Immunantwort zur Viruselimination kommt es zur Zerstörung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+). Zytokine wie zum Beispiel Interleukin 1 und 2, Tumor Nekrose Faktor und Interferon- γ tragen ebenfalls sowohl zur Überwindung der Infektion als auch zur zellulären Schädigung bei. Es wird zudem vermutet, dass durch Perforine aus Lymphozyten und Serinesterasen in den Zielzellen Apoptose eingeleitet wird (Binah et al., 2002). Während dieser Phase läuft bei den meisten Patienten eine limitierte Immunreaktion ohne Symptome der Herzinsuffizienz ab und die initiale Verletzung kann ausheilen. Selten kann es im Rahmen einer unkontrollierten Immunreaktion zu einem fulminanten klinischen Verlauf mit akuter Herzinsuffizienz kommen (Dec et al., 1985).

Bei einem Teil der Patienten entwickelt sich als Resultat einer Autoimmunität eine zweite Phase der Myokarditis. Möglicherweise durch persistierende Viren (Huber et al., 1994) oder molekulare Mimikry bedingt (Gauntt et al., 1995) kann es zu einer anhaltenden Aktivität des humoralen und zellulären Immunsystems kommen. Durch Infiltrate immunologisch kompetenter Zellen im Myokard kann es zu dauerhaften Schäden kommen (Knowlton et al., 1999). Als Ausdruck der Aktivierung des humoralen Immunsystems wurden verschiedenste kardiale Autoantikörper nachgewiesen, zum Beispiel Antisarkolemm- und Antimyosinantikörper sowie Antikörper gegen mitochondriale Proteine und Membranrezeptoren (Caforio et al., 2007). Während dieser zweiten Erkrankungsphase zeigen sich häufig Symptome der Herzinsuffizienz als Folge erheblicher Myokardschädigung.

In der dritten Phase der Erkrankung kann es als Endstadium durch Remodeling zum morphologischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie kommen (Mason et al., 2003). Ob dieser Prozess durch die initiale (Wessely et al., 1998) oder persistierende Virusinfektion (Kearny et al. 2001) moduliert wird, wird zurzeit noch diskutiert. In der dritten Phase der Erkrankung zeigen sich häufig Symptome einer schweren Herzinsuffizienz (Schwartzkopf et al., 1995).

Nach dem heutigen Erkenntnisstand sind Verlauf und Prognose einer Myokarditis nur schwer einzuschätzen. Wie bereits angeführt, kann die Erkrankung sowohl klinisch inapparent oder oligosymptomatisch oder auch akut fulminant oder chronisch progredient verlaufen. Bislang liegen Daten lediglich zur bioptisch nachgewiesenen Myokarditis vor, die eine transplantationsfreie 5-Jahresüberlebensrate von 56% bis 65% zeigen (Magnani et al. 2006; Pulerwitz et al. 2004).

2.2. Grenzen der nichtinvasiven Myokarditisdiagnostik

Die Diagnostik der Myokarditis wird durch das Fehlen pathognomonischer Leitsymptome erschwert. Gelegentlich berichten die Patienten über grippeähnliche Prodromi wie Fieber, Myalgien, Gastroenteritis oder Husten (Feldmann and McNamara, 2000). Zudem können Müdigkeit, Schwäche und eine Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit bis zur Ruhedyspnoe auftreten (Kearney et al., 2001). Daneben kommt es gelegentlich zu Palpitationen oder thorakalen Missempfindungen (Kühl et al., 2003). Die klinische Symptomatik korreliert allerdings nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung nach histopathologischen Kriterien (Dec et al., 1985).

Elektrokardiographisch können bei der Myokarditis ST-Strecken- oder T-Wellenalterationen sowie atrioventrikuläre oder intraventrikuläre Leitungsstörungen als typische aber unspezifische Befunde auftreten. Zudem

lassen sich häufig supraventrikuläre oder ventrikuläre Extrasystolen nachweisen (Celik et al., 2006). Als Ursachen für einen plötzlichen Herztod kommen sowohl ventrikuläre Tachykardien als auch ein kompletter atrioventrikulärer Block in Frage (Zeppenfeld et al., 2006; Xanthos et al., 2006).

Die Echokardiographie liefert bei der Myokarditis ebenfalls keine spezifischen Befunde. Zu Beginn der Erkrankung sind sowohl die Dimensionen der Herzhöhlen als auch die ventrikuläre Funktion häufig normal. Bei fortschreitender Dauer oder akuten Verläufen können regionale oder globale Störungen von diastolischer oder systolischer ventrikulärer Funktion, Änderungen von Myokardtextur oder Wanddicke, Dilatation der Herzhöhlen, intracavitäre Thromben oder Perikardergüsse auftreten (Felker et al., 2000, Lieback et al. 1996, Pinamonti et. al., 1998) .

Mittels der Indium-111-Antimyosinszintigraphie können Myozyten detektiert werden, die durch einen Schaden ihres Sarkolemmes intrazelluläres Myosin im Extrazellulärraum exponieren. Da durch diese Methode allerdings nur unspezifisch Myokardnekrosen, nicht jedoch die Ätiologie des Zellschadens nachgewiesen wird, konnte sich das Antimyosinszintigramm nicht als richtungsweisende Untersuchungsmethode etablieren (Dec et al., 1990, Janzen et al. 2000, Kühl et al 1998).

Auch die laborchemische Diagnostik, insbesondere die Virusserologie, vermag weder im akuten noch chronischen Stadium der Myokarditis einen richtungsweisenden Befund zu liefern. Ein vierfacher Anstieg der virusneutralisierenden Antikörpertiter im Serum während des Krankheitsverlaufs sowie ein hoher Anteil von virusspezifischen Immunglobulin-M-Antikörpern im Serum mögen einen Hinweis auf eine akute virale Infektion bieten (Libby et al., 2007), treten allerdings nur selten auf (Janzen et al., 2001, Mahfoud et al., 2011). Eine Lokalisation der Infektion ist selbst bei positiven Virusantikörpertitern nicht möglich. Häufig werden im Rahmen der Erkrankung eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins oder erhöhte

Leukozytenzahlen gefunden, normale Werte schließen eine Myokarditis jedoch nicht aus (Janzen et al., 2000, Mahfoud et al., 2011). Erhöhte Werte für kardiale Troponine und das Isoenzym MB der Kreatinkinase finden sich allgemein bei jeder akuten Myokardnekrose und sind ebenfalls unspezifisch für eine Myokarditis (Arai, 2007)

Mittels kontrastmittelverstärkter kardialer Magnetresonanztomographie können bei der Myokarditis sowohl regionale Motilitätsstörungen als auch globale Funktionseinbußen oder Vergrößerungen der Herzhöhlen nachgewiesen werden. Typischerweise findet sich in betroffenen Muskelarealen ein erhöhtes global Relative Enhancement (gRE) als Zeichen einer myokardialen Hyperämie und erhöhter Kapillarpermeabilität sowie ein erhöhtes Late Gadolinium Enhancement (LGE) als Zeichen einer irreversiblen myokardialen Verletzung (Abdel-Aty et al., 2005, Yelgec et al., 2007).

2.3. Diagnostik der Myokarditis anhand von Endomyokardbiopsien

Bei klinischem Verdacht auf Vorliegen einer Myokarditis ist zur Diagnosesicherung eine Endomyokardbiopsie notwendig. Aktuelle Leitlinien der zuständigen Fachgesellschaften, American Heart Association (AHA) und European Society of Cardiology (ESC), sind kürzlich neu abgefasst und veröffentlicht worden (Cooper et al. 2007).

Das allgemeine Komplikationsrisiko im Rahmen der Myokardbiopsie wird zwischen < 1% und 6% (Fowles et al., 1982; Deckers et al., 1992, Yilmaz et al., 2010) angegeben. Ernste Komplikationen wie Perikardtamponade, Ventrikelperforation oder Tod treten mit einer Häufigkeit von 0,5 % deutlich seltener auf.

2.3.1 Die Dallas-Klassifikation

Nachdem sich bei der histologischen Diagnostik der Myokarditis anhand von Myokardbiopsien eine hohe Interobservervariabilität gezeigt hatte, wurde 1987 von Aretz die bis heute gültige Dallas-Klassifikation anhand von lichtmikroskopischen Kriterien eingeführt (Aretz et al., 1987). Hierdurch sollte eine weitgehend einheitliche Beurteilung der histologischen Veränderungen im Myokardgewebe erzielt werden.

Mittels der Dallas-Kriterien wird die Diagnose einer akuten Myokarditis bei gleichzeitigem Nachweis von Myokardnekrosen und entzündlichem Infiltrat gestellt. Angesichts der eindeutigen Demarkierung der Nekroseareale in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) ist bei der akuten Myokarditis die Diagnose sicher zu stellen und unterliegt lediglich einer geringen Interobservervariabilität. Allerdings beträgt die histologisch fassbare Phase der akuten Myokarditis nur drei bis vier Tage (Kawai et al, 1999).

Die Borderline-Myokarditis wird gemäß den Dallas-Kriterien durch das alleinige Vorliegen eines entzündlichen Infiltrats ohne Myokardnekrose definiert. Eine genaue Diagnosestellung in dieser Phase der Myokarditis mit Identifizierung und Quantifizierung der verschiedenen, das Gewebe infiltrierenden Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen ist nach alleinigen lichtmikroskopischen Kriterien schwierig und erhöht die Interobservervariabilität beträchtlich. Zudem trägt dieser Umstand zu einer Häufung falsch negativer Befunde bei. So konnte im Rahmen einer der größten bisher durchgeführten Interventionsstudien bei lediglich 214 (9,6%) der biopsierten 2233 Patienten mit Verdacht auf Myokarditis die Diagnose anhand der Dallas-Kriterien bestätigt werden; davon betrug der Anteil der Patienten mit Borderline-Myokarditis nur 0,5% (12) (Hahn et al. 1995).

Eine Verbesserung der Sensitivität im Rahmen der histologischen Myokarditisdiagnostik wurde durch den Einsatz von immunhistochemischen Techniken erreicht. In einer Studie mit einem vergleichbaren Kollektiv von insgesamt 176 Patienten wurden nach lichtmikroskopischen Kriterien 14 (8%) Fälle einer Borderline-Myokarditis gefunden, nach Einsatz immunhistochemischer Färbungen erhöhte sich der Anteil auf 67 (38%) (Kühl et al. 1995). Gemäß der Konsensuskonferenz von Marburg 2000 (Maisch et al., 2000) wird analog zu den Dallas Kriterien eine akute Myokarditis bei Vorliegen einer Myokardnekrose und eines entzündlichen Infiltrats mit ≥ 14 Leukozyten/mm² diagnostiziert; eine chronische Myokarditis wird durch ein entzündliches Infiltrat mit ≥ 14 Leukozyten/mm² ohne Myokardnekrose definiert.

Die Wertigkeit molekularbiologischer Diagnostik mit der Möglichkeit des Virusgenomnachweises bei Verdacht auf Myokarditis wird derzeit kontrovers beurteilt. So wurde im Rahmen einer Studie an 77 Patienten mit linksventrikulärer Funktionsstörung von einer besseren Prognose bei Nachweis von Enterovirus berichtet (Figulla 1995), bei einer weiteren Studie an 120 Patienten mit ungeklärter Kardiomyopathie war der gleiche Befund mit einer ungünstigen Prognose behaftet (Why et al., 1994). Eine neuere Untersuchung an 197 Patienten mit ätiologisch unklarer linksventrikulärer Funktionseinschränkung zeigte zwar 91 (46%) viruspositive Befunde, ein prognostischer Trend hinsichtlich linksventrikulärer Funktion oder Überleben ließ sich aber nicht ableiten (Kuethe et al., 2007).

2.3.2 Das Problem des „Sampling Errors“

Ein weiteres Problem bei der Endomyokardbiopsie stellt der „Sampling Error“ dar. Dieser ist dadurch bedingt, dass die Entzündungsreaktion im Myokard meist

fokal und nicht generalisiert abläuft und von der Biopsie möglicherweise nicht erfasst wird. Wie bereits 1989 mittels Biopsiestudien an postmortalen Herzen gezeigt werden konnte, liegt die Trefferquote einer einzelnen Myokardbiopsie in der Diagnostik der Myokarditis bei lediglich 25%. Auf der Basis statistischer Hochrechnungen wäre eine unter klinischen Gesichtspunkten unververtretbare Anzahl von 17 Biopsien notwendig, um eine Myokarditis in 80% der Fälle zu diagnostizieren. (Hauck et al., 1989; Chow et al., 1989).

Um den „Sampling Error“ zu reduzieren, ist vor der Biopsie eine Bildgebung des Herzens mittels Echokardiographie oder kardialer Magnetresonanztomographie sinnvoll, mittels derer anhand von regionalen Motilitätsstörungen oder Signalanreicherungen verdächtige Myokardregionen identifiziert werden können. Durch eine gezielte Biopsie dieser Regionen kann die Sensitivität der Endomyokardbiopsie erhöht werden (Marholdt et al. 2004).

2.4 Fragestellungen der Arbeit

Die Myokarditis ist für etwa zwei Drittel aller Fälle mit dilatativer Kardiomyopathie verantwortlich. Diese stellt den häufigsten Grund für eine Herztransplantation dar und ist für einen erheblichen Anteil der kardialen Mortalität verantwortlich (Maron et al., 2006). Klinik und Verlauf der Herzmuskelentzündung können erheblich variieren von fulminanten Verläufen mit kardiogenem Schock bis zur kompletten Ausheilung. Eine prognostische Evaluation von Endomyokardbiopsien anhand von lichtmikroskopischen, immunhistochemischen und mikrobiologischen Kriterien im Zusammenhang mit klinischen und linksventrikulären funktionellen Parametern ist bislang nicht erfolgt.

Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Studie bearbeitet:

1. Ist die Begutachtung der Endomyokardbiopsie mittels immunhistochemischer Methoden der Begutachtung mittels Lichtmikroskopie gemäß den Dallas Kriterien in der Diagnostik und Prognoseabschätzung der Myokarditis überlegen?
2. Welchen prognostischen Wert hat der Nachweis von Virusgenom im Herzmuskel von Patienten mit Verdacht auf Myokarditis?
3. Welchen prognostischen Wert haben klinische Zeichen der Herzinsuffizienz und morphologische und funktionelle Parameter des linken Ventrikels bei Patienten mit Verdacht auf Myokarditis?
4. Ist die Durchführung einer Endomyokardbiopsie zur Prognoseabschätzung bei Verdacht auf Myokarditis notwendig?

3. Material und Methoden

3.1 Patientenevaluation

In die Studie wurden insgesamt 181 Patienten mit dem klinisch begründeten Verdacht auf Myokarditis eingeschlossen, nachdem eine relevante koronare Herzerkrankung angiographisch ausgeschlossen worden war. Alle Patienten wurden körperlich untersucht und anamnestiziert.

Der Verdacht auf Vorliegen einer Myokarditis war definiert durch eine typische Anamnese mit stattgehabter fieberhafter Infektion von Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt oder Atemwegen sowie durch eine oder mehrere der folgenden Konditionen:

- Einschränkung der regionalen oder globalen linksventrikulären systolischen Pumpfunktion unklarer Genese
- Vorliegen eines Perikardergusses
- Ventrikuläre Tachykardien oder Kammerflimmern unklarer Genese
- Erhöhung der myokardialen Nekrosemarker im Serum

Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Evaluation im kardiogenen Schock befanden und eine Therapie mit Katecholaminen benötigten, wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

3.2. Studiendesign und Endpunkte

Die Studie wurde als prospektive longitudinale Beobachtung konzipiert. Alle sechs Monate war eine Vorstellung der Probanden in der Herzinsuffizienzambulanz vorgesehen. Patienten mit eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion erhielten eine leitliniengerechte medikamentöse Behandlung. Im Rahmen der Vorstellungstermine wurden die Patienten erneut körperlich untersucht und anamnestiziert. Weitere Folgeuntersuchungen wie Echokardiographie oder die Bestimmung von klinisch-chemischen Laborparametern erfolgten nach Einschätzung des behandelnden Arztes.

Primärer Endpunkt der Studie war die Kombination aus kardial bedingtem Tod oder Herztransplantation. Als sekundäre Endpunkte wurden einerseits Tod aus beliebiger Ursache oder Herztransplantation und andererseits die Gesamtsterblichkeit untersucht.

3.3. Nichtinvasive Untersuchungsmethoden

3.3.1 Klinisch-chemische Laborparameter und Virusserologie

Als Entzündungsparameter wurden in der vorliegenden Arbeit die Leukozytenzahl und das C-reaktive Protein (CRP) im Serum bestimmt. Aus venösem Vollblut wurde durch eine elektronische Zählung mit Hilfe des Blutzellgerätes Sysmex XE 2001 (Sysmex, Frankfurt) die Leukozytenzahl bestimmt. Der Normwert liegt bei 5000 – 10000 Leukozyten/ μ l. Zu erhöhten Leukozytenzahlen kann es bei lokalen oder generalisierten Entzündungen kommen; bei bestimmten infektiösen Erkrankungen wie Typhus abdominalis,

Brucellose, aber auch bei einer foudroyant verlaufenden Sepsis oder Viruserkrankungen wie Influenza und Masern kann es zu einer Leukopenie kommen.

Die Messung des C-reaktiven Proteins erfolgte mittels Immunturbidimetrie im Serum. Der Normwert liegt bei < 3 g/l. Als „Akutphaseprotein“ tritt es vermehrt bei akut entzündlichen Prozessen und in der aktiven Phase chronisch-entzündlicher Erkrankungen auf (Thomas, 1998).

Eine Bestimmung der myokardialen Nekrosemarker Kreatininkinase, des Isoenzym Kreatininkinase-MB sowie des Troponin-T wurde ebenfalls durchgeführt. Als signifikant für das Vorliegen eines myokardialen Zelluntergangs gelten für die Kreatininkinase Werte über 190 U/l mit einem Anteil des Isoenzym Kreatininkinase-MB von 6 – 20% sowie ein Troponin-T-Wert über 0,1 ng/ml. Kreatininkinase, Kreatininkinase-MB sowie Troponin-T werden bei der Nekrose von Kardiomyozyten aus diesen freigesetzt und sind dann im Serum in erhöhter Konzentration als myokardiale Nekrosemarker messbar (Collinson et al., 2001).

Die Messung der Kreatininkinase sowie des Isoenzym Kreatininkinas-MB erfolgte aus Plasma als enzymatischer UV-Test (Modular-P-Gerät, Roche). Troponin-T-Werte wurden aus Serum mittels Elektrochemilumineszenz Immunoassay (ECLIA) (Modular Analytics E170, Roche) bestimmt.

Zudem erfolgte eine serologische Diagnostik zur Bestimmung spezifischer Antikörper gegen kardiotope Viren. Die Konzentrationen der Antikörper wurden quantitativ in Titerstufen angegeben. Des Weiteren wurde eine Differenzierung in die Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM vorgenommen. Der Nachweis von IgM, in einigen Fällen auch von IgA spricht für eine frische virale Infektion, für die Reaktivierung einer latenten Infektion oder für eine Reinfektion. Ein IgG-Titer deutet auf eine stattgehabte Infektion mit dem betreffenden Virus oder eine zuvor erfolgte Impfung hin. Beweisend für eine frische Infektion gilt die Serokonversion im zeitlichen Verlauf.

Antivirale Antikörper wurden mit folgenden Testverfahren nachgewiesen: Antikörper gegen Coxsackieviren der Untergruppen B1-B5 wurden mittels Neutralisationstests für jeden Subtyp getrennt ermittelt. Als Nachweismethode für Antikörper gegen die ECHO-Virusgruppe und Adenoviren wurde mit entsprechenden Antigenen eine Komplementbindungsreaktion durchgeführt (Virion GmbH, München).

Die serologische Enterovirusdiagnostik beinhaltet weiterhin den Nachweis von IgM und IgA mittels Enzyme-Immuno-Essay (EIA) (Genozyme-Virotech, Rüsselsheim). In diesem Test sind Antigene von Coxsackievirus-B5 und Echovirus 30 enthalten.

3.3.2 Echokardiographie

Vor gefäßinvasiver Diagnostik wurde in der vorliegenden Arbeit eine Echokardiographie nach den Kriterien der American Society of Echocardiography (ASE) mit zweidimensionaler Echokardiographie, M-Mode- und Dopplermessung sowie Farbdoppleruntersuchung durchgeführt (Henry, 1980). Diese Untersuchungsmethoden erbringen Informationen über die Größe der Herzhöhlen, die Morphologie von Herzmuskel, Herzklappen und Perikard, über die systolische und diastolische Funktion des linken Ventrikels sowie über die Funktion der Herzklappen.

Bei allen Patienten wurden der linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Durchmesser und die Verkürzungsfraction gemessen. Außerdem erfolgte die Beurteilung des linken Ventrikels auf regionale Wandbewegungsstörungen. Größe und Funktion des rechten Ventrikels wurden semiquantitativ bestimmt. Perikardergüsse wurden nach Lokalisation, Ausdehnung und Größe erfasst.

3.4. Invasive Untersuchungsmethoden

3.4.1. Herzkatheteruntersuchung und Endomyokardbiopsie

Vor der Endomyokardbiopsie wurde eine Linksherzkatheteruntersuchung mit Koronarangiographie und Lävokardiographie durchgeführt. Dabei erfolgte nach Lokalanästhesie und Hautinzision mittels Stichlanzette die Punktion zumeist der rechten Arteria femoralis communis mittels einer 18 G-Kanüle. Anschließend wurde über einen J-Draht in Seldinger-Technik eine 7F-Schleuse in das Gefäß eingebracht. Nach Sondierung des linken Ventrikels mit einem Pigtail-Katheter (Cordis Corporation, Miami, FL 33103-5700, FL, USA) wurde zunächst eine Messung des enddiastolischen linksventrikulären Drucks, anschließend eine Lävokardiographie mit einer Kontrastmittelmenge von 40ml und einem Fluss von 14ml/sec. in der 30° RAO-Projektion durchgeführt. Danach erfolgte die selektive Koronarangiographie mit Darstellung der rechten Herzkranzarterie und des linken Koronarsystems über passende Koronarkatheter (in der Regel Judkinskatheter der Größe 4) (Cordis Corporation, Miami, FL 33103-5700, FL, USA).

Im Anschluß an die bildgebende Herzkatheteruntersuchung wurden in den meisten Fällen linksventrikuläre, in einigen Fällen auch rechts- oder biventrikuläre Myokardbiopsien durchgeführt. Zur linksventrikulären Biopsie wurde zunächst die Aortenklappe mittels eines J-Drahtes atraumatisch passiert. Zur rechtsventrikulären Biopsie wurde nach zusätzlicher Einlage einer 7F Gefäßschleuse in die Vena femoralis communis die Tricuspidalklappe antegrad ebenfalls mit Hilfe eines J-Drahts passiert. Im Falle einer biventrikulären Biopsie erfolgte zunächst die rechtsventrikuläre, anschließend die linksventrikuläre Prozedur. Über den ventrikulär liegenden Draht wurde in der

Regel ein rechtskoronarer 7 F Führungskatheter oder in seltenen Fällen ein 7 F Multipurpose-Führungskatheter (Medtronic, Launcher LA7MP, Danvas, MA, USA) , ein 7 F Judkins-R4-Katheter (Medtronic Launcher, LA7JR40, Danvas, MA, USA) oder ein Amplatz-L1-Katheter (Medtronic, LA7AL1, Danvas, MA, USA) in die Kammer eingebracht. Durch den Führungskatheter wurde dann das Biotom (Endo-Flex, H1518.02-A, Vörde) in den Ventrikel eingeführt. Anschließend erfolgte die Entnahme von 2-13 (Median 5) ca. 1-2mm großen Myokardbiopsien, welche umgehend in einem entsprechenden Transportmedium konserviert wurden. Nach Abschluss der Biopsie wurden die Gefäßschleuse(n) entfernt, die arterielle Punktionsstelle entweder mit einem Verschlusssystem (Perclose, Abbot Vascular, Abbot Park, Illinois, USA; Angioseal, St. Jude Medical, St. Paul. MN 55117, USA) verschlossen oder manuell komprimiert. Bei allen Patienten erfolgte die Anlage eines Kompressionsverbandes. Nach Abschluss der Herzkatheteruntersuchung wurde eine echokardiographische Kontrolle zum Ausschluss eines Perikardergusses durchgeführt.

3.4.2 Aufarbeitung der Endomyokardbiopsien

Mindestens ein Endomyokardbiopsat wurde in einer gepufferten 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert, mindestens ein Myokardbiopsat in einem Kryoröhrchen unmittelbar auf Trockeneis gelagert oder in RNAlater fixiert. Die Myokardproben wurden innerhalb von 24 Stunden an das Institut für Pathologie (Prof. Dr. med. Bültmann) und an die Abteilung für Molekulare Pathologie (Prof. Dr. med. Kandolf) der Universität Tübingen versandt. Dort erfolgte die histologische, immunhistologische und molekularbiologische Aufarbeitung der Biopsien.

3.4.2.1 Histologie

Das in Paraformaldehyd fixierte Myokardgewebe wurde in Paraffin eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten. Nach Anfertigung dieser 4 µm dicken Schnitte erfolgten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung, Abb. 2b) sowie eine Masson-Trichrom-Färbung (Abb. 1a, 1b, 2a), anschließend eine lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate. Hier war eine Beurteilung von Myozytenform und -größe sowie der Zellkernmorphologie möglich. Des Weiteren konnte eine Aussage über das Vorliegen von Myokardnekrosen getroffen werden. Ebenso wurden Nachweis oder Fehlen von Infiltraten mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen) beurteilt. Die Einteilung der Befunde erfolgte nach den Dallas-Kriterien. Gemäß dieser Einteilung wird eine akute Myokarditis durch den Nachweis von lymphozytären Infiltraten und Myozytennekrosen definiert. Die Borderline-Myokarditis wird durch den Nachweis entzündlicher Infiltrate ohne Nachweis von Myozytennekrosen charakterisiert. Für die statistische Analyse wurden die Dallas-Kategorien akute (5 Patienten) und Borderline-Myokarditis (64 Patienten) zusammengefasst und als positives Biopsieergebnis gewertet.

3.4.2.2 Immunhistologie

Für die immunhistologische Untersuchung des fixierten Myokardgewebes erfolgte ebenfalls eine Einbettung des Materials in Paraffin und die Anfertigung von 4µm dicken Schnitten mit Hilfe eines Mikrotoms. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Avidin-Biotin Immunperoxidase Methode, entsprechend den Vorgaben des Testkit-Herstellers (Vectastain Elite ABC Kit, Vector, Burlingame, CA, USA), behandelt (Abb. 1c, 2c). Verwendung fanden folgende Antikörper: CD3 zur Detektion von T-Zellen (Novacastra Laboratories,

Newcastle upon Tyne, Großbritannien), PGM1 zur Detektion von Makrophagen (CD68) (DAKO, Glostrup, Dänemark) sowie alpha SM (smooth muscle)–Aktin zur Detektion glatter Muskelzellen und Myofibroblasten sowie HLA-DR- α (DAKO, Hamburg, Germany)

Gemäß der WHO/ISFC Task Force zur Definition und Klassifikation von Kardiomyopathien wurden die Endomyokardbiopsate als entzündlich eingeschätzt, wenn folgende Bedingungen vorlagen: Immunhistochemischer Nachweis von >14 Leukozyten/mm². (CD3⁺ T-Lymphozyten und/oder CD68⁺ Makrophagen) im Myokardgewebe sowie eine verstärkte Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen in antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems oder Endothels (Maron et al., 2006).

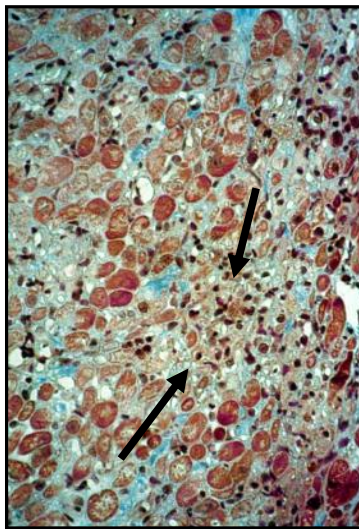


Abb. 1a

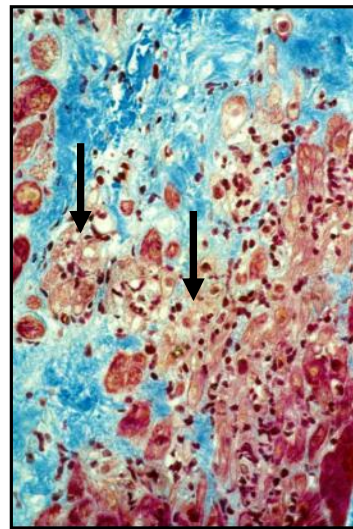


Abb. 1b

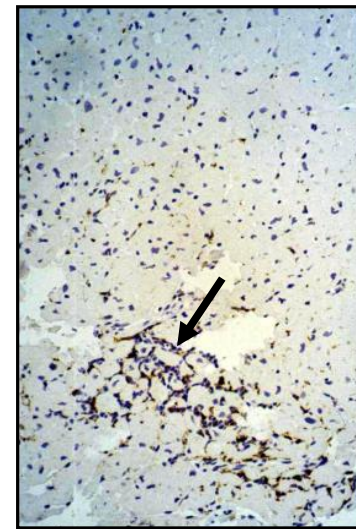


Abb. 1c

Abbildung 1

Histologischer Befund (Abb. 1a und Abb. 1b, Masson-Trichrom-Färbung) eines Myokardbiopsats bei akuter Myokarditis. Es finden sich Myozytolyse (Pfeil) begleitet von mononukleären Zellinfiltraten. Bei der immunhistologischen Untersuchung (Abb. 1c) zeigt sich in der Immunperoxidase-Färbung durch PGM1-Antikörper eine über der Norm liegende Anzahl von Makrophagen.

Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. R. Kandolf überlassen.

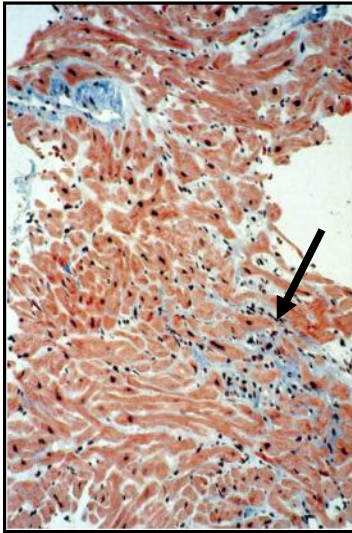


Abb. 2a

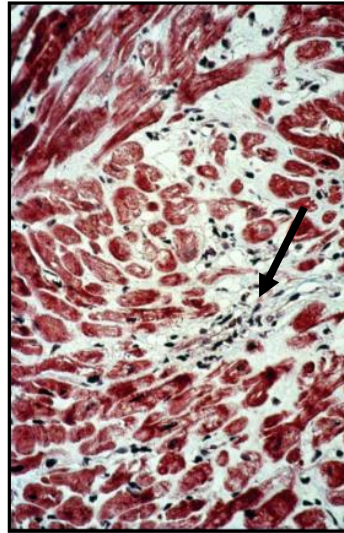


Abb. 2b

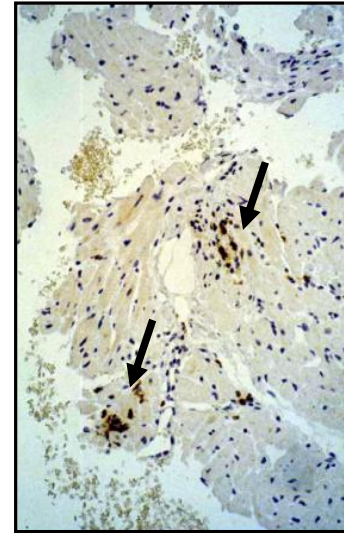


Abb. 2c

Abbildung 2

Histologischer Befund bei chronischer Myokarditis (Abb. 2a Masson-Trichrom-Färbung und Abb. 2b H.E.-Färbung): Myozytolysen lassen sich nicht nachweisen, allerdings vermehrt mononukleäre Zellinfiltrate, insbesondere interstitiell. Bei der immunhistologischen Untersuchung (Abb. 2c) können unter Verwendung von anti-CD3-Antikörpern die mononukleären Zellen als T-Lymphozyten identifiziert werden.

Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. R. Kandolf überlassen.

3.4.2.3 Molekularbiologische Aufarbeitung

Im Rahmen der Studie wurden die Endomyokardbiopsate mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf virales Genom untersucht. Bei der PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Technik, die aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität besonders geeignet ist für den Nachweis viraler Genomsequenzen in kleinen Gewebeproben (Muir, 1993). Das Prinzip der Methode beruht auf einer enzymatischen Amplifikation einer DNA-Sequenz unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide und einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

Bei RNA-Viren muss hierzu nach Extraktion der Nukleinsäuren virale cDNA synthetisiert werden, da nur DNA amplifiziert werden kann. Bei hoher Sensitivität der Methode bedarf es einer strengen Qualitätskontrolle um eine ebenfalls hohe Spezifität zu gewährleisten. Bei der Nested PCR werden Sensitivität u. Spezifität der Methode weiter erhöht, in dem zwei ineinander verschachtelte PCR nacheinander ablaufen.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden mit den tiefgefrorenen (-70°Celsius) Myokardproben Nested-PCR-Untersuchungen auf folgende kardiotope Viren durchgeführt: Vertreter der Enterovirusgruppe (EV) (Coxsackievirus und Echovirus), Adenovirus (ADV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Humanes Herpesvirus 6 (HHV6).

Lag RNA als Ausgangsmaterial vor, erfolgte eine Transkription in cDNA mittels AMV-reverse-Transkriptase gemäß dem Protokoll des Herstellers (AGS, Heidelberg). Dann wurden 0,2mM des Primers benutzt, der als spezifisch für bestimmte Nukleotidsequenzen der jeweiligen nachzuweisenden Viren gilt (z. B. im Falle des Coxsackievirus B3 für die Nukleotide 64-83 (5`CGGTACCTTTGTGCGCCTGT-3`)) (KLUMP et. al.). Die benutzten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die erste PCR wurde mittels der äußeren Primer, die zweite PCR mittels der inneren Primer durchgeführt.

Die enzymatische Amplifikation der cDNA bzw. DNA wurde an einem Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Insgesamt wurden zwei 30 Zyklen-Programme durchlaufen (Denaturierung bei 94 °Celsius über eine Minute, Primeranlagerung (Annealing) bei 56 °Celsius über 30 Sekunden, Extension bei 72 °Celsius über 45 Sekunden). In jedem Probenansatz wurden PCR Puffer (Perkin-Elmer, Weiterstadt), 1,5mM MgCl₂ , 200µM dNTPs/2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Perkin-Elmer, Weiterstadt) zu den 10µl cDNA/DNA Reaktionsflüssigkeit bzw. 5µl des ersten PCR-Produktes zugefügt. Als interne Kontrolle für eine erfolgreiche Isolation von Nukleinsäuren wurde eine weitere PCR auf

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt; GAPDH ist in jeder Zelle in Genomkopie vorhanden. Verwendet wurden spezifische Primer für die Nukleotide 3932-3949 und 4355-4372 der humanen GAPDH-cDNA (Amplifikationsprodukt für mRNA: 248bp). Die Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde durch eine automatische DNA-Sequenzierung überwacht.

Mit Ausnahme einer Gruppe von 35 Probanden, die vor April 1997 in die Studie eingeschlossen worden waren, erfolgte die Aufarbeitung der Endomyokardbiopsien prospektiv.

Virus	Primer-Sequenz			
Parvovirus B 19	1.PCR	AGC ATG TGG AGT GAG GGG GC	20mer	
		AAA GCA TCA GGA GCT ATA CTT CC	23mer	
	2.PCR	GCT AAC TCT GTA ACT TGT AC	20mer	
		AAA TAT CTC CAT GGG GTT GAG	21mer	
	Humanes Herpesvirus 6	1.PCR	TCT CAC AGG CCA GGA CAA TGG ATT ATA TAT	30mer
			TGA GAT CAT TCT CCC GTT CTT GAG GG	26mer
2.PCR		TCC ACT ACT TAA AAC CGA	18mer	
		TGA TGA AGT ATG TGA TAG	18mer	
Ebstein-Barr-Virus	1.PCR	AAG GAG GGT GGT TGG GAA AG	20mer	
		AGA CAA TGG ACT CCC TTA GC	20mer	
	2.PCR	ATC GTG GTC AAG GAG GTT CC	20mer	
		ACT CAA TGG TGT AAG ACG AC	20mer	
Coxsackieviren	1.PCR	CGG TAC CTT TGT GCG CCT GT	20mer	
		GTT CCG CTG CAG AGT TGC CCG	21mer	
	2.PCR	CCC CGG ACT GAG TAT CAA TA	20mer	
		CAG TTA GGA TTA GCC GCA TT	21mer	

Adenoviren	1.PCR	GCC GCA(AG) TGG TCT TAC ATG CAC ATC	24mer
		GGC(AGC) GTG CCG GA(AG)T AGG GT (AC)AA	21mer
	2.PCR	GCC ACC GA(GT)A C(GC)T ACT TCA GCC TG	23mer
		CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT	23mer
GAPDH	1.PCR	GAC AAC AGC CTC AAG ATC ATC	21mer
		GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA	21mer
	2.PCR	AAT GCC TCC TGC ACC ACC	18mer
		ATG CCA GTG AGC TTC CCG	18mer

Tabelle 1

Verwendete Primersequenzen zur Detektion verschiedener Viren sowie des Kontrollgens GAPDH

3.5. Statistik

Um den Zusammenhang zwischen klinischen und hämodynamischen Variablen sowie den Ergebnissen der Endomyokardbiopsien mit dem transplantationsfreiem Überleben zu überprüfen, wurde eine Cox Regressionsanalyse (Proportional Hazards-Methode) durchgeführt. Nach einer zunächst univariaten Berechnung wurden alle Parameter mit einem $p < 0,10$ in einem multivariaten Ansatz untersucht. Hierbei wurden unabhängige Prädiktoren für ein transplantationsfreies Überleben durch einen multivariaten p -Wert $< 0,05$ identifiziert. Als Bestätigungstest wurde ein zweites multivariates Modell mit schrittweiser Vorwärtsregression verwendet. Überlebenskurven der Patienten wurden nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit einem Log-rank-Test verglichen. Zum multiplen paarweisen Vergleich der Überlebenskurven wurde Holms sequentielle Rejektionsprozedur verwendet, um den Typ I-Irrtum zu kontrollieren. Kontinuierliche Variablen wurden zur Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven dichotomisiert und als kategorisch definiert. Um die beobachteten mit den erwarteten Häufigkeiten der dichotomen

Variablen zu vergleichen, wurde ein Fischer-Test verwendet. Die Daten werden mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Das Risiko für Tod und Herztransplantation wird als Hazard Ratio (HR) mit dem 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Alle Analysen wurden mit dem SPSS-Statistikprogramm durchgeführt (Version 15.0, SPSS Inc., Chicago,IL).

4. Ergebnisse:

4.1. Patientencharakteristika

Insgesamt wurden bei 181 Patienten Endomyokardbiopsien durchgeführt. Die Patientencharakteristika zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie sind in Tabelle 2 zusammenfasst:

Parameter	N	Wert
Alter in Jahren	181	42,4 ±15,3
Männliches Geschlecht, n (%)	181	122 (67,4)
Weibliches Geschlecht, n (%)	181	59 (32,6)
NYHA-Klasse I, n (%)	181	39 (21,5)
NYHA-Klasse II, n (%)	181	52 (28,7)
NYHA-Klasse III, n (%)	181	73 (40,3)
NYHA-Klasse IV, n (%)	181	17 (9,4)
LV-enddiastolischer Diameter-Index (mm/m)	169	36,2 ± 6,9
LV-Ejektionsfraktion (%)	179	37,7 ± 18,5
LV-enddiastolischer Druck (mmHg)	158	15,6 ± 7,4
Leukozyten/μl	164	8100 ± 3300
CRP mg/l	149	15,8 ± 23,5
Troponin-T ≥ 0,1 ng/ml, n (%)	29	6 (3,3 %)
CK/CK-MB 6% – 20%, n (%)	127	8 (4,4%)

Tabelle 2 Patientencharakteristika

Mit ± versehene Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. N bezieht sich auf die Anzahl der Patienten, bei denen das entsprechende Merkmal untersucht wurde. NYHA = New York Heart Association, LV = linksventrikulär.

Die untersuchten Patienten waren mit einem mittleren Alter von 42,4 Jahren relativ jung und zum überwiegenden Teil männlich (67,4%). Grund für den Einschluss in die Studie war bei 137 Fällen (75,7%) eine globale linksventrikuläre Dysfunktion. Eine Vergrößerung des linken Ventrikels (definiert als linksventrikulärer enddiastolischer Diameter-Index >35 mm/m) mit eingeschränkter Ejektionsfraktion ($< 45\%$) lag bei 82 (45,3%) Patienten vor, während 55 Personen entweder eine verringerte Ejektionsfraktion ($n = 45$, 24,9%) oder eine Vergrößerung des linken Ventrikels aufwiesen ($n = 10$, 5,5%). Bei 19 Patienten mit globaler linksventrikulärer Dysfunktion lagen als zusätzliche Indikation für eine Myokardbiopsie ventrikuläre Tachykardien ($n = 10$, 5,5%) oder ein Perikarderguss unklarer Genese ($n = 9$, 5,0%) vor. Wegen regionaler Motilitätsstörungen des linken Ventrikels wurden 12 Personen (6,6%) in die Studie eingeschlossen, wegen erhöhter myokardialer Nekrosemarker 8 (4,4%). Zwei Patienten mit erhöhten myokardialen Nekrosemarkern wiesen im Elektrokardiogramm ST-Strecken-Hebungen auf, bei den übrigen 4 Patienten fehlten diese. Bei normaler systolischer linksventrikulärer Funktion wurden insgesamt 12 (6,6%) Patienten wegen anhaltender, einer (0,6%) wegen einer nicht anhaltenden ventrikulären Tachykardie in die Studie eingeschlossen. Ein Perikarderguss unklarer Genese ohne assoziierte linksventrikuläre Dysfunktion lag bei 12 (6,6%) der Patienten vor. Während die Hälfte der Patienten ($n = 91$, 50,3%) nur milde Symptome einer Herzinsuffizienz (NYHA-Klasse I-II) aufwies, zeigte die andere Hälfte erhebliche oder schwere Zeichen einer Herzinsuffizienz (NYHA Klasse III-IV). Ein linksventrikulärer enddiastolischer Druck von 12 mmHg wurde bei 88 (48,6%) Personen überschritten.

4.2. Ergebnisse der Endomyokardbiopsien

Die Grafiken 3 bis 5 bieten eine Zusammenfassung der Biopsiefunde.

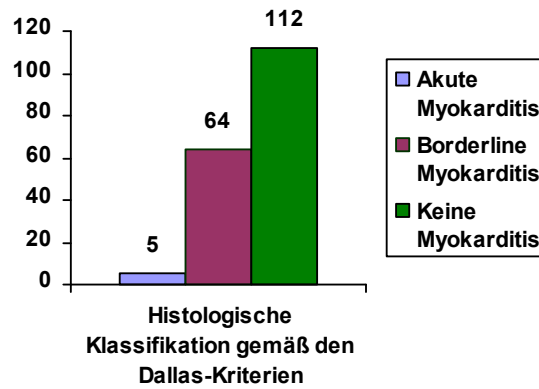


Abbildung 3: Ergebnisse gemäß den Dallas-Kriterien

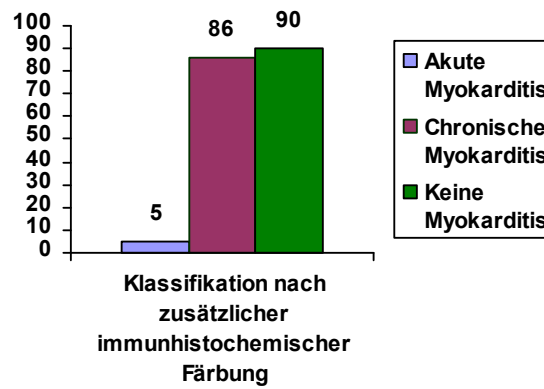


Abbildung 4: Ergebnisse nach zusätzlicher immunohistochemischer Färbung

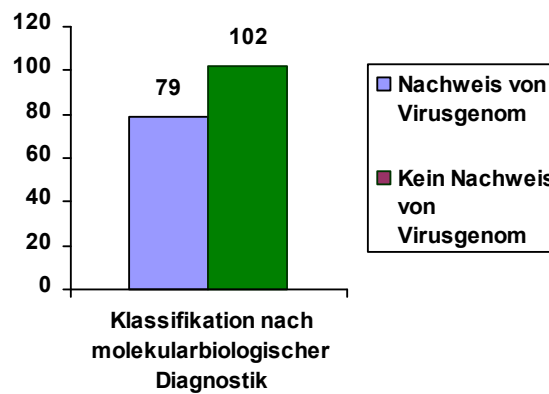


Abbildung 5: Ergebnisse der molekularbiologischen Diagnostik

Bei der histopathologischen Begutachtung der Endomyokardbiopsien fanden sich bei 69 (38,1%) der Patienten positive Befunde gemäß der Dallas-Kriterien, wobei der überwiegende Anteil (n = 64) als Borderline-Myokardits beurteilt wurde. Der Anteil positiver Befunde stieg nach immunhistochemischer Färbung auf insgesamt 91 (50,3%). Virusgenom wurde im Myokard von 79 (43,6%) der Patienten nachgewiesen, wobei in 14 (7,7%) Fällen Doppelinfektionen vorlagen. Im Einzelnen wurden folgende Virusspezies nachgewiesen: Parvovirus B 19 (n = 52, 28,7%), Humanes Herpesvirus Typ 6 (n = 20, 11,0%) Enterovirus-Spezies (n = 11, 6,1%), Ebstein-Barr Virus (n = 6, 3,3%) und Adenovirus (n = 4, 2,2%). Unter den nachgewiesenen Doppelinfektionen stach der Nachweis von Parvovirus B 19 hervor (12 von 14 Fällen). Die häufigste Kombination bei den myokardialen Doppelinfektionen war Parvovirus B 19 mit Humanem Herpesvirus Typ 6 (n = 7, 3,9%).

Die kombinierte Anzahl von Komplikationen nach Herzkatheteruntersuchung und Endomyokardbiopsie betrug 6 (3,3%). Bei fünf Patienten wurde echokardiographisch ein neu aufgetretener Perikarderguss nachgewiesen, der in zwei Fällen mittels Perikardiozentese drainiert werden musste. Ein Patient erlitt eine transitorisch ischämische Attacke (TIA). Alle Komplikationen heilten ohne Residuen aus.

4.3 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der Patienten ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Parameter	N	Wert
β-Blockertherapie, n (%)	181	103 (56,9)
ACE-Hemmer- oder AT1-Blockertherapie, n (%)	181	154 (85,1)
Aldosteronantagonistentherapie	181	69 (38,1)

Tabelle 3 Medikamentöse Therapie (AT1 = Angiotensin1-Rezeptor)

β -Blocker und Aldosteronantagonisten wurden in 57% und 38% der Fälle eingesetzt. Da die Entscheidung für eine Therapie mit Aldosteronantagonisten erheblich von der funktionellen Herzinsuffizienzklassifizierung abhing (57% in der Klasse NYHA III/IV, 20% in der Klasse NYHA I/II) und die Prävalenz der nicht mit ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten behandelten Patienten sehr gering war (15%), wurde nur die β -Blockertherapie in der Endpunktanalyse berücksichtigt.

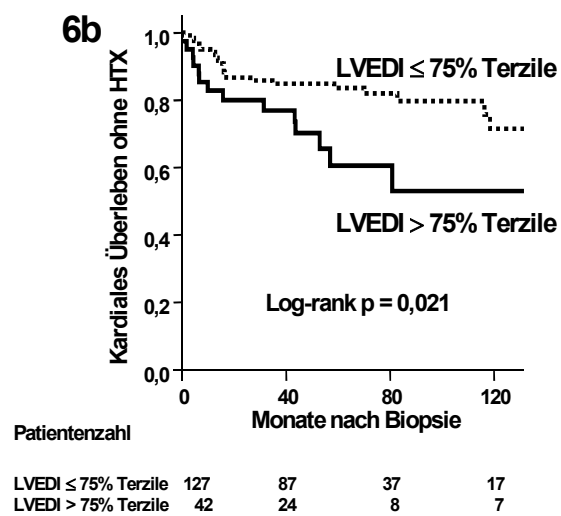
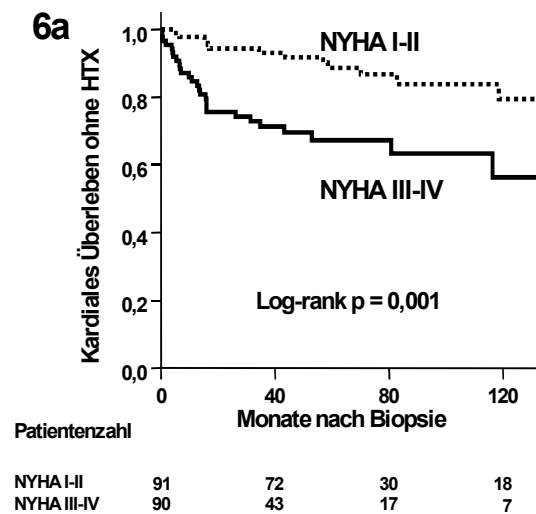
4.4. Nachbeobachtung

Während einer mittleren Nachbeobachtungsperiode von 58,9 Monaten (Medianwert 53,2 Monate) starben insgesamt 37 (20,4%) Patienten, 26 (14,4%) davon aus kardialen Gründen: 13 Patienten (7,2%) erlitten einen plötzlichen Herztod, weitere 13 (7,2%) starben an terminalem Pumpversagen. Gründe für die übrigen Todesfälle waren maligne Tumoren (n = 4, 2,2%), Sepsis (3, 1,7%), Unfall (2, 1,1%), Magenperforation (n = 1) und terminales Leberversagen bei Leberzirrhose (n = 1). Vierzehn (7,7%) Patienten mussten einer Herztransplantation unterzogen werden. Insgesamt 14 Patienten (7,7%) gingen der Nachbeobachtung verloren, da seit dem letzten Patientenkontakt, entsprechend der Studiendefinition, mehr als 12 Monate vergangen waren, ohne dass ein klinischer Endpunkt verifiziert werden konnte.

Der primäre Endpunkt (kardial bedingter Tod oder Herztransplantation) wurde von 40 Personen (22,1%) erreicht, der erste sekundäre Endpunkt (Tod jedweder Ursache oder Herztransplantation HTX) von 51 (28,2%), der zweite sekundäre Endpunkt (Gesamtsterblichkeit) von 37 Patienten (20,4%).

4.5 Prognoseprädiktoren

Für den primären Endpunkt (kardialer Tod und Herztransplantation) untersuchte Prognoseprädiktoren sind in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt:



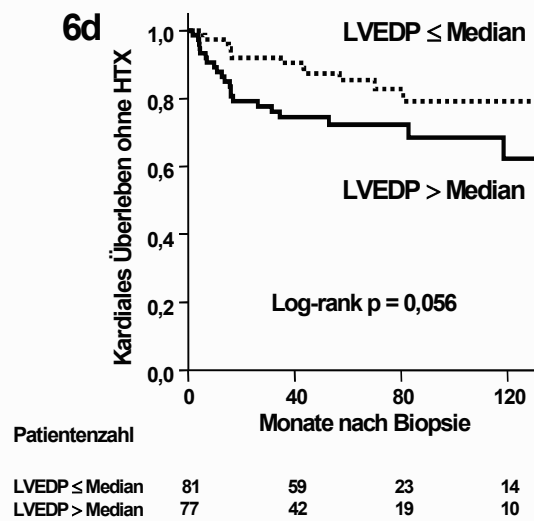
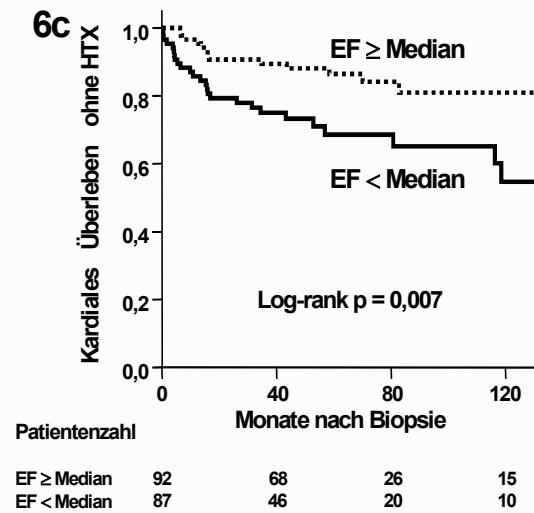
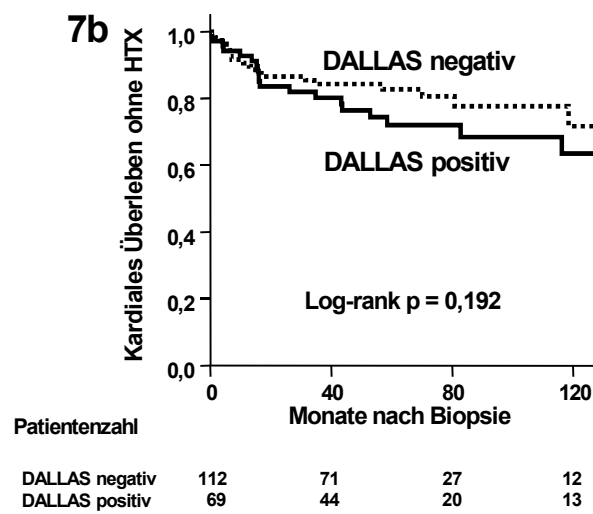
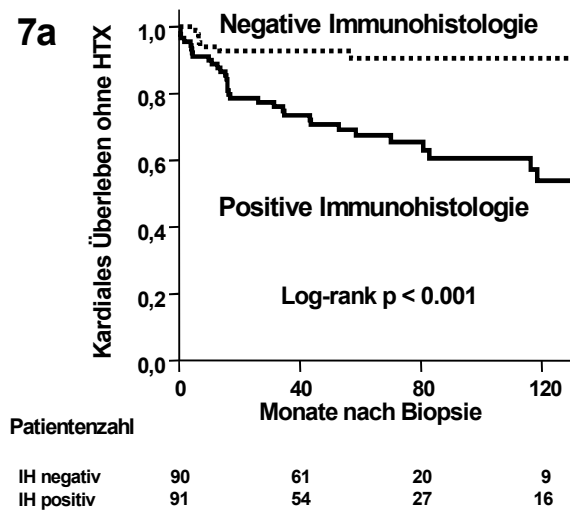


Abbildung 6

Überleben ohne kardialen Tod oder Herztransplantation (HTX) in Abhängigkeit von klinischer Befindlichkeit und linksventrikulärer Funktion zum Zeitpunkt der Endomyokardbiopsie. a: NYHA-Funktionsklasse. b: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser LVEDI (linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser im Verhältnis zur Körpergröße (mm/m)). c: linksventrikuläre Ejektionsfraktion EF. d: linksventrikulärer enddiastolischer Druck LVEDP. Der LVEDI wurde an der 75%-Tertiale (40 mm/m) dichotomisiert, EF und LVEDP am jeweiligen Medianwert (33% u. 14 mmHg).



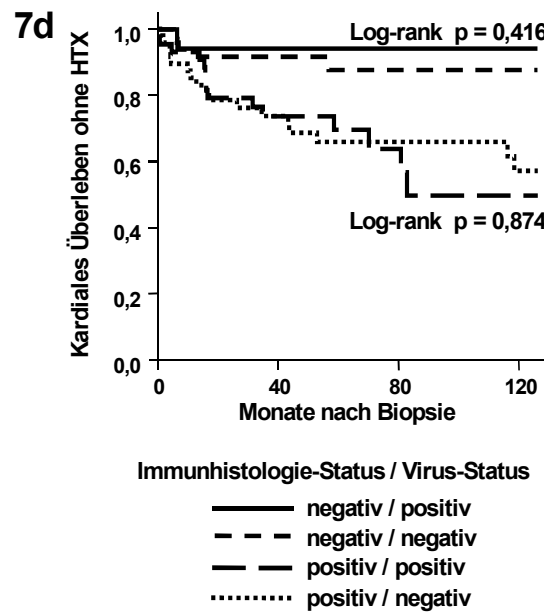
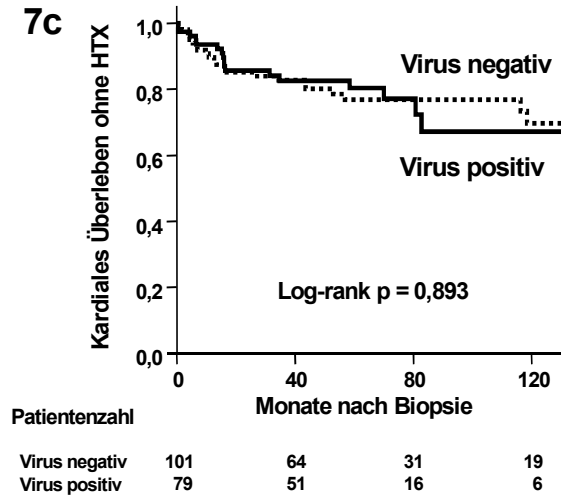


Abbildung 7

Überleben ohne kardialen Tod oder Herztransplantation (HTX) in Abhängigkeit vom Ergebnis der Endomyokardbiopsie. a: immunhistochemische Befunde. b: histopathologische Befunde gemäß den Dallas Kriterien. c: Nachweis von Virusgenom. d: Kombination von immunhistochemischen Befunden und Nachweis von Virusgenom.

Nach univariater Analyse erwiesen sich Herzinsuffizienzklassifikation (6a), enddiastolischer linksventrikulärer Diameter-Index (6b), Ejektionsfraktion (6c), und ein immunhistochemischer Nachweis einer myokardialen Entzündungsreaktion (7a) als signifikante Prognoseprädiktoren für den primären Endpunkt kardialer Tod oder Herztransplantation, während linksventrikulärer enddiastolischer Druck (6d), die Dallaskriterien (7b) und der Nachweis von Virusgenom (7c) keinen signifikanten Einfluss hatten. Unter der Hypothese, dass der Nachweis von Virusgenom in Gegenwart entzündlicher myokardialer Infiltrate im Unterschied zur latenten Viruspersistenz im nicht entzündeten Herz eine klinisch bedeutsame Subgruppe repräsentiert, wurden Patienten mit und ohne Nachweis entzündlicher myokardialer Infiltrate entsprechend dem Nachweis von Virusgenom subklassifiziert. Wie Abbildung 7d zeigt, ergab sich durch den Nachweis von Virusgenom jedoch keine zusätzliche prognostische Information, weder bei Patienten mit noch bei Patienten ohne myokardiale Inflammation.

In Abbildung 8 ist der günstige Einfluss einer β -Blockertherapie auf die Prognose von Patienten mit Verdacht auf Myokarditis dargestellt:

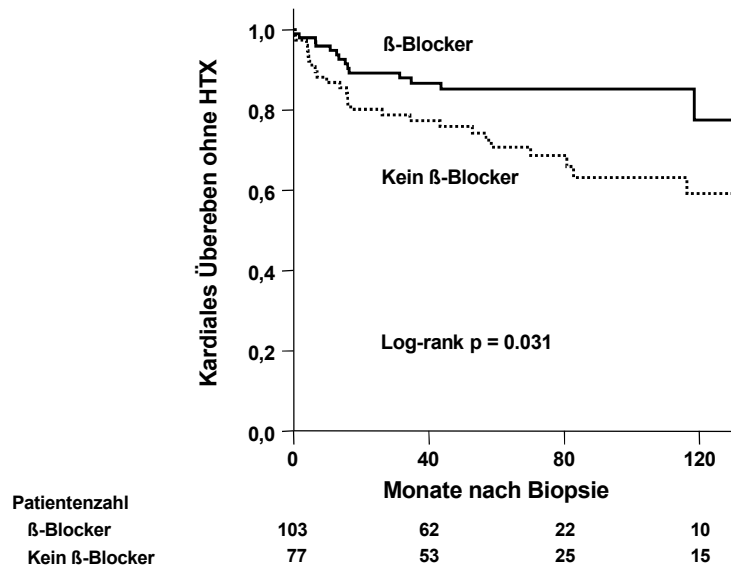


Abbildung 8

Überleben ohne kardialen Tod oder Herztransplantation (HTX) in Abhängigkeit von der Behandlung mit β -Rezeptorantagonisten.

In der nachfolgenden Tabelle 4 wird in der uni- und multivariaten Analyse der Einfluss aller untersuchten Parameter im Hinblick auf die Prognose bezüglich des primären Endpunktes (kardialer Tod oder Herztransplantation) zusammengefasst:

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HAZARD RATIO (95% KI)	P-Wert	HAZARD RATIO (95% KI)	P-Wert
Alter (Jahre)	1,00 (0,98-1,03)	0,693		
Männliches Geschlecht	0,91 (0,48-1,75)	0,782		
NYHA-Klasse III/IV	3,43 (1,73-6,77)	<0,001	3,20 (1,36-7,57)	0,008
LV enddiastolischer Diameter-Index (mm/m)	1,05 (1,01-1,10)	0,027	1,05 (0,97-1,15)	0,207
LV Ejektionsfraktion (%)	0,98 (0,96-1,00)	0,026	1,01 (0,97-1,04)	0,651
LV enddiastolischer Druck (mmHg)	1,05 (1,00-1,09)	0,030	1,00 (0,95-1,05)	0,983
Positive Immunhistologie	4,54 (2,01-10,28)	<0,001	3,46 (1,39-8,62)	0,008
Dallas-positive Histopathologie*	1,51 (0,81-2,80)	0,195		
Nachweis von viralem Genom	0,96 (0,51-1,80)	0,893		
β-Blockertherapie	0,50 (0,26-0,95)	0,034	0,43 (0,21-0,91)	0,027

Nur Variablen mit einem univariaten P-Wert kleiner 0,10 sind in der multivariaten Analyse berücksichtigt worden. Die Hazard Ratio für kontinuierliche Variablen wird wie folgt interpretiert: Bei jedem Anstieg um eine Einheit erhöht sich das Risiko den Endpunkt zu erreichen um den Faktor der berechneten Hazard Ratio. *Akute und Borderline Myokarditis kombiniert. KI = Konfidenzintervall; NYHA = New York Heart Association; LV = linksventrikulär.

Tabelle 4 Hazard Ratio für den primären Endpunkt kardialer Tod oder Herztransplantation

Nach Adjustierung der Kovariaten erwiesen sich nur fortgeschrittene Herzinsuffizienzsymptomatik (NYHA-Klasse III-IV), der immunhistochemische Nachweis einer myokardialen Entzündungsreaktion und eine β-Blockertherapie als signifikante Prädiktoren zur Prognoseabschätzung bei Patienten mit Verdacht auf Myokarditis.

Ein Versuch der Risikostratifizierung für den primären Endpunkt (kardialer Tod oder Herztransplantation) anhand der drei unabhängigen Prädiktoren (NYHA-Klasse, immunhistochemischer Befund, β-Blockertherapie) ist in der Abbildung 9 dargestellt:

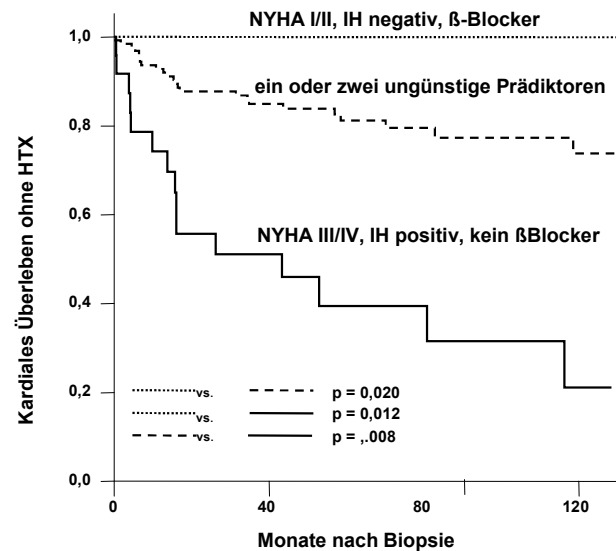


Abbildung 9

Überleben ohne kardialen Tod oder Herztransplantation (HTX) gemäß eines 3-Parameter-Risikostratifikationsmodells unter Berücksichtigung von NYHA-Funktionsklasse, immunhistochemischem Befund der Endomyokardbiopsie und β -Blockertherapie.

Gemäß der Dreifachparameteranalyse haben Patienten mit einer milden Herzinsuffizienzsymptomatik (NYHA-Klasse I bis II), die β -Blocker einnehmen und immunhistologisch keine myokardialen Entzündungszeichen aufweisen eine exzellente Prognose. In den folgenden 5 Jahren wird kein Patient einen kardialen Tod erleiden oder sich einer Herztransplantation unterziehen müssen. Im Gegensatz hierzu liegt für hochsymptomatische Patienten in der NYHA-Klasse III-IV, die keine β -Blocker einnehmen und bei der immunhistologischen Begutachtung eine Entzündungsreaktion im Herzmuskel aufweisen, die Wahrscheinlichkeit bei nur 39% in den nächsten fünf Jahren nicht kardial bedingt zu versterben oder herztransplantiert zu werden. Für die letzte, in der Grafik beschriebene Patientengruppe mit einem oder zwei ungünstigen

Prädiktoren gilt eine mittelmäßige Prognose (kardiales Überleben ohne Herztransplantation mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 81% in einem Zeitraum von 5 Jahren).

In der nachfolgenden Tabelle 5 wird in der uni- und multivariaten Analyse der Einfluss aller untersuchten Parameter im Hinblick auf die Prognose bezüglich des ersten sekundären Endpunktes (Tod aus jedweder Ursache oder Herztransplantation) zusammengefasst.

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HAZARD RATIO (95% KI)	P-Wert	HAZARD RATIO (95% KI)	P-Wert
Alter (Jahre)	1,01 (0,99-1,03)	0,593		
Männliches Geschlecht	0,91 (0,51-1,61)	0,738		
NYHA-Klasse III/IV	3,63 (1,98-6,67)	<0,001	3,83 (1,78-8,25)	0,001
LV enddiastolischer Diameter-Index (mm/m)	1,04 (1,00-1,08)	0,081	1,01 (0,93-1,09)	0,873
LV Ejektionsfraktion (%)	0,98 (0,96-1,00)	0,011	1,00 (0,97-1,03)	0,870
LV enddiastolischer Druck (mmHg)	1,05 (1,01-1,09)	0,010	1,00 (0,96-1,04)	0,948
Positive Immunhistologie	3,95 (1,98-7,89)	<0,001	3,37 (1,52-7,44)	0,003
Dallas-positive Histopathologie*	1,57 (0,90-2,71)	0,110		
Nachweis von viralem Genom	0,80 (0,45-1,41)	0,439		
β-Blockertherapie	0,57 (0,32-1,00)	0,051	0,46 (0,24-0,90)	0,022

Nur Variablen mit einem univariaten P-Wert kleiner 0,10 sind in der multivariaten Analyse berücksichtigt worden. Die Hazard Ratio für kontinuierliche Variablen wird wie folgt interpretiert: Bei jedem Anstieg um eine Einheit erhöht sich das Risiko den Endpunkt zu erreichen um den Faktor der berechneten Hazard Ratio. *Akute und Borderline Myokarditis kombiniert. KI = Konfidenzintervall; NYHA = New York Heart Association; LV = linksventrikulär

Tabelle 5 Hazard Ratio für den ersten sekundären Endpunkt Tod oder Herztransplantation

In der nachfolgenden Tabelle 6 wird in der uni- und multivariaten Analyse der Einfluss aller untersuchten Parameter im Hinblick auf die Prognose bezüglich des zweiten sekundären Endpunktes (Gesamtmortalität) zusammengefasst:

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HAZARD RATIO (95% KI)	P-Wert	HAZARD RATIO (95% KI)	P-Wert
Alter (Jahre)	1,02 (0,99-1,04)	0,227		
Männliches Geschlecht	0,92 (0,47-1,81)	0,811		
NYHA-Klasse III/IV	2,91 (1,48-5,76)	0,002	3,33 (1,63-6,83)	0,001
LV enddiastolischer Diameter-Index (mm/m)	1,02 (0,97-1,08)	0,411		
LV Ejektionsfraktion (%)	0,99 (0,97-1,00)	0,114		
LV enddiastolischer Druck (mmHg)	1,03 (0,98-1,08)	0,208		
Positive Immunhistologie	4,98 (2,08-11,96)	<0,001	5,58 (1,90-16,42)	0,002
Dallas-positive Histopathologie*	1,98 (1,03-3,79)	0,040	0,72 (0,34 -1,53)	0,392
Nachweis von viralem Genom	0,66 (0,33-1,32)	0,236		
β-Blockertherapie	0,44 (0,22-0,88)	0,020	0,42 (0,21-0,87)	0,019

Nur Variablen mit einem univariaten P-Wert kleiner 0,10 sind in der multivariaten Analyse berücksichtigt worden. Die Hazard Ratio für kontinuierliche Variablen wird wie folgt interpretiert: Bei jedem Anstieg um eine Einheit erhöht sich das Risiko den Endpunkt zu erreichen um den Faktor der berechneten Hazard Ratio. *Akute und Borderline Myokarditis kombiniert. KI = Konfidenzintervall; NYHA = New York Heart Association; LV = linksventrikulär

Tabelle 6 Hazard Ratio für den zweiten sekundären Endpunkt Gesamtmortalität

Mit der einen Ausnahme des linksventrikulären Diameter-Indexes erwiesen sich im Hinblick auf den ersten sekundären Endpunkt (Tod aus jedweder Ursache oder Herztransplantation) die gleichen Prädiktoren als signifikant wie im Hinblick auf den primären Endpunkt (Tabelle 4). Im Hinblick auf den zweiten sekundären Endpunkt (Gesamtmortalität) Tod verlor die Ejektionsfraktion ihren prognostischen Wert. Bezüglich aller drei Endpunkte gab es das konsistente Resultat, dass die Detektion einer myokardialen Entzündungsreaktion mittels immunhistochemischer Methoden, Symptome einer erheblichen

Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) und eine Therapie mit β -Blockern als einzige unabhängige Parameter in der multivariaten Analyse ihre prognostische Relevanz behielten. Die zweite multivariate Auswertung mittels schrittweiser konditionaler Vorwärtsregression bestätigte die Ergebnisse der in den Tabellen 4-6 dargestellten Analyse. Für die schrittweise Vorwärtsregression wurden multivariate p-Werte von 0,001 – 0,002 für die NYHA-Klassifikation, 0,002 – 0,007 für die Ergebnisse aus der immunhistologischen Befundung und 0,011 – 0,019 für die β -Blockertherapie erzielt.

Die histopathologische Klassifikation gemäß der Dallas-Kriterien war weder für den primären (Tabelle 4 und Abbildung 7) noch für die sekundären Endpunkte (Tabellen 5 und 6) ein signifikanter Prädiktor. Myokardiale Inflammation korrelierte nicht signifikant mit dem Nachweis von Virusgenom im Myokard. Die Häufigkeit von immunhistologisch nachgewiesenen inflammatorischen Infiltraten war in den viruspositiven und virusnegativen Myokardbiopsien annähernd gleich hoch (53,2% versus 48,5%; $P = 0,552$). Der Nachweis von Virusgenom hatte keine prädiktive Bedeutung für einen der drei Endpunkte (Abbildung 7c - d, Tabellen 4 bis 6).

Bei acht Patienten konnte eine mögliche Kontamination der Proben durch Blutbestandteile nicht sicher ausgeschlossen werden, weil mittels PCR sowohl im Myokard als auch in Leukozyten Genom des jeweiligen Virus nachgewiesen wurde. Allerdings ergab sich nach Ausschluss dieser Patienten von der statistischen Analyse des klinischen Verlaufs keine relevante Änderung ($p = 0,266 - 0,856$ für die univariate Endpunktanalyse).

Zusammengefasst sind Symptome der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz (NYHA-Klassen III bis IV), Nachweis einer myokardialen Inflammation mittels immunhistochemischer Methoden und eine fehlende β -Blockertherapie hochsignifikante Prädiktoren für alle untersuchten Studienendpunkte in der uni- und multivariaten Analyse. Die Kombination aus klinischen, strukturellen und

immunhistologischen Prädiktoren ist in der Lage, Patienten mit sehr schlechter Prognose zu identifizieren.

5. Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Reihe von Kandidatenparametern auf ihre prognostische Relevanz bei vermuteter Myokarditis zu überprüfen. Wie bereits in vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, kann die Herzmuskelentzündung in Abhängigkeit vom primären Krankheitsverlauf zu erheblicher Mortalität und Morbidität führen (Feldmann et al., 2000; Magnani et al., 2006, Pulerwitz et al., 2004). Der klinische Verlauf kann deutlich variieren, von erheblichen Folgen wie Tod oder Herztransplantation bis hin zu kompletter restitutio ad integrum (McCarthy et al, 2000). Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Daten stimmen gut mit vorausgegangenen Untersuchungen überein, in denen sich eine Einjahresmortalität von 15 – 20% fand (McCarthy et al. 2000, Grogan et al. 1995 Pulerwitz et al. 2004). Patienten mit kardiogenem Schock als Folge einer fulminanten Myokarditis waren angesichts der deutlich besseren langfristigen Prognose im Vergleich zu den übrigen Formen der Myokarditis nicht in die Studie eingeschlossen worden (McCarthy et al., 2000). Bislang fehlen verlässliche Prädiktoren zur Prognoseabschätzung bei Verdacht auf eine akute oder chronische Herzmuskelentzündung, so dass es sich diese Studie zur Aufgabe gemacht hat, Ergebnisse aus klinischer Diagnostik und bioptisch gewonnene Befunde mit dem weiteren Verlauf der Patienten zu korrelieren.

5.1. Stellenwert der klinischen Parameter zur Prognoseabschätzung bei Verdacht auf Myokarditis

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Herzinsuffizienzsymptomatik auf den weiteren klinischen Verlauf der Patienten

mit Verdacht auf Myokarditis. Personen in den NYHA-Klassen III – IV waren mit einer deutlich schlechteren Prognose behaftet als solche in den Klassen I – II, was bereits in ähnlicher Weise durch vorausgegangene Studien belegt worden war (Why et al, 1994, Caforio et al, 2007). Diese Prädiktivität zeigte sich sowohl in monovariaten als auch in multivariaten Analysen für alle untersuchten klinischen Endpunkte.

Im Gegensatz hierzu konnte die prognostische Wertigkeit von Parametern der linksventrikulären Größe und Funktion (enddiastolischer Diameterindex, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, Ejektionsfraktion) nur in der univariaten Analyse bestätigt werden. Auch hier erweist sich das Ergebnis als konsistent mit vorausgegangenen Untersuchungen, in den sich der systolische enddiastolische linksventrikuläre Druck beziehungsweise der pulmonalkapilläre Verschlussdruck in den meisten monovariaten, allerdings nur in einigen multivariaten Analysen als prädiktiv erwiesen hatte; für die Ejektionsfraktion konnte nur in monovariaten Untersuchungen ein prädiktiver Stellenwert nachgewiesen werden (Pulerwitz et al., 2004; Why et al., 1994; Caforio et al., 2007, Magnani et al., 2006, Nohria et al., 2003).

Diese Resultate bestätigen die Annahme, dass bei frühen Zeichen der Myokarditis Symptome der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz im Sinne einer hohen NYHA-Klasse der terminalen Herzinsuffizienz oder dem kardialen Tod vorausgehen können (Cooper et al., 2007).

5.2. Stellenwert der Endomyokardbiopsie zur Prognoseabschätzung bei Verdacht auf Myokarditis

Das klinische Erscheinungsbild der Myokarditis ist sehr variabel und reicht von asymptomatischen Abnormalitäten im Elektrokardiogramm bis zur linksventrikulären Dysfunktion mit kardiogenem Schock (Pauschinger et al.,

2006, Maron et al. 2006, Felker et al, 2000). Obwohl der definitive Nachweis einer Myokarditis nur mittels Endomyokardbiopsie möglich ist, hat die Methode wegen der vermeintlich niedrigen Sensitivität („Sampling Error“) und des Komplikationsrisikos bislang keine große Verbreitung in der kardiologischen Praxis gefunden und stellte bislang einen theoretischen „Goldstandard“ dar. Ältere Studien an Patienten mit neu aufgetretener Herzinsuffizienz, in denen ungezielt entnommene Biopsate gemäß den Dallas-Kriterien untersucht wurden und lediglich eine Trefferquote von 10% ergaben, schienen die Einschätzung zu bestätigen (Dec et al, 1985, Felker et al., 2000). Durch den Einsatz von vorgeschalteter bildgebender Diagnostik wie Echokardiographie und kardialer Magnetresonanztomographie konnte die Trefferquote allerdings deutlich gesteigert werden, da nun die gezielte Biopsie auf Inflammation verdächtiger Myokardareale möglich war (Marhold et al., 2004). Auch der Einsatz neuer diagnostischer Techniken wie immunhistochemischer Färbemethoden und der molekularbiologischen Bearbeitung scheint zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der Methode beizutragen (Baughmann et al., 2006, Magnani et al. 2006). Ein systematischer direkter Vergleich hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft dieser unterschiedlichen Untersuchungsmethoden liegt allerdings bislang nicht vor.

5.2.1 Bedeutung der lichtmikroskopischen Beurteilung der Myokardbiopsien gemäß den Dallas-Kriterien:

In der vorliegenden Arbeit wurde bei nahezu allen Patienten (179 von 181) vor der Endomyokardbiopsie eine Bildgebung mittels Echokardiographie oder kardialer Magnetresonanztomographie durchgeführt; in den Fällen, in denen Auffälligkeiten wie regionale Motilitätsstörungen, Wandverdickungen oder Kontrastmittelanreicherungen festgestellt wurden, erfolgte anschließend eine

möglichst gezielte Biopsie der verdächtigen Wandabschnitte. Durch diese Maßnahmen konnte im Rahmen der lichtmikroskopischen Beurteilung gemäß der Dallas-Kriterien in insgesamt 38% der Fälle ein Nachweis von entzündlichen Infiltraten oder Zellnekrosen geführt werden. Hinsichtlich des primären Endpunktes konnte weder in der uni- noch in der multivariaten Analyse eine prädiktive Rolle der Dallas-Kriterien nachgewiesen werden. Lediglich im Trend zeigten Dallas-positive Patienten eine ungünstigere Prognose.

Ursache hierfür ist die ungenügende Sensitivität der lichtmikroskopischen Analyse der konventionell gefärbten Myokardschnitte. Angesichts der sehr geringen Prävalenz von akuten Myokarditiden (3%) im vorliegenden Patientengut und den bekannten Problemen bei der Diagnose der chronischen Myokarditis durch eine erhebliche Interobservervariabilität (Shanes et al. 1987; Mason et al, 1995) muss davon ausgegangen werden, dass die Häufigkeit der Erkrankung anhand der Dallas-Kriterien unterschätzt wurde.

5.2.2. Bedeutung immunhistochemischer Methoden bei der Beurteilung von Endomyokardbiopsien

Wie bereits vorausgegangene Untersuchungen gezeigt haben, kann durch immunhistochemischen Nachweis infiltrierender Entzündungszellen die Sensitivität der Methode im Vergleich zur klassischen lichtmikroskopischen Methode gesteigert werden (Cassling et al. 1985, Kühl et al. 1995, Kühl et al. 1998). Bei der vorliegenden Untersuchung zeigte sich durch immunhistochemischen Nachweis einer Inflammation ein deutlicher Anstieg der positiven Befunde auf 50% im Vergleich zu lediglich 38% nach alleiniger konventioneller Färbung und lichtmikroskopischer Beurteilung der Biopsate.

Die höhere Sensitivität der immunhistochemischen Methoden im Vergleich zur konventionellen histologischen Beurteilung erklärt, dass der immunhistologische Nachweis einer myokardialen Entzündungsreaktion prädiktiv für das Auftreten der drei klinischen Endpunkte war.

5.2.3. Prognostische Relevanz von Virusgenom in Endomyokardbiopsien

Bezüglich der Prädiktivität einer myokardialen Virusinfektion für klinische Ereignisse liegen zurzeit widersprüchliche Informationen vor. Während einige Untersucher der Viruspersistenz eine Bedeutung für die Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion beimessen (Kühl et al., 2005, Caforio et al., 2007), bestätigt die vorliegende Arbeit eine kürzlich veröffentlichte Studie, die keine Korrelation von Virusnachweis und Prognose zeigen konnte (Kuethe et al., 2007)

Neue Daten legen den Verdacht nahe, dass enterovirale Genprodukte wie die Protease 2A zur Entwicklung einer Kardiomyopathie oder linksventrikulären Dysfunktion führen können (Xiong et al., 2007). Inflammation und Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, möglicherweise durch Viren getriggert, sind ausschlaggebende Prädiktoren für eine progrediente linksventrikuläre Fehlfunktion und damit verbunden einer schlechten klinischen Prognose (Magnani et al., 2006; Grogan et al., 1995; Dec. et al., 1985). Es ist begreiflich, dass eine virale Infektion einen Entzündungsprozess im Myokard triggern kann, der die replikative Phase überdauert (Mason et al., 2003). Das heißt, eine viral getriggerte Inflammation kann ohne Viruspersistenz zur Herzinsuffizienz und einer schlechten Prognose führen. Diese Überlegung wird gestützt durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die eine schlechte Prognose für Patienten mit nachgewiesener myokardialer Entzündungsreaktion auch ohne gleichzeitigen Virusnachweis zeigt.

Im Hinblick auf mögliche antivirale oder immunsuppressive Therapiestrategien erscheint es wichtig, zwischen chronisch aktiver viraler Myokarditis, definiert als Virusinfektion des Myokards mit Nachweis einer zellulären Inflammation, einer postviralen Autoimmunität und einer harmlosen Viruspersistenz ohne begleitende Entzündungsreaktion zu unterscheiden (Magnani et al., 2006; Mason et al., 1995, Baughman, 2006).

Hervorzuheben ist, dass der Nachweis von Virusgenom im Myokard nicht per se mit einer Inflammation und einer aktiven Virusreplikation verbunden ist. Bislang wurde nur in wenigen Studien der Versuch unternommen, zwischen aktiver viraler Infektion und latenter Viruspersistenz zu unterscheiden, indem die Viruslast quantifiziert oder Minus-Strang-RNA, die replikative Intermediärform von Enteroviruspezies, nachgewiesen wurde (Pauschinger et al., 1999; Klingel et al., 1992; Klingel et al., 2003). Studien, die die prognostische Relevanz der myokardialen Viruslast im Myokard bestätigen, liegen nicht vor. Die vorliegenden Daten von Patienten mit aktiver enteroviraler Replikation unterstützen weder die Vermutung einer verstärkten Inflammation noch einer schlechteren Prognose im Vergleich zu virusnegativen Patienten (Pauschinger et al., 1999; Fujioka et al., 2000; Kuethe et al., 2007).

5.3. β -Blockertherapie bei Verdacht auf Myokarditis

Bei einer sympatiktönen Aktivierung des autonomen Nervensystems kann es durch Stimulation von Inflammation und Apoptose zur Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion und somit zu einer Verschlechterung der klinischen Prognose kommen (Murray et al., 2000; Wang et al., 2005, Communal et al., 1999, Kaye et al., 1995). β -Blocker können Morbidität und Mortalität der Herzinsuffizienz verbessern und sind Bestandteil der aktuellen Leitlinien zu Behandlung der Herzinsuffizienz bei eingeschränkter systolischer Funktion

(Dickstein et al., 2008). Klinische Studien zum Einsatz dieser Substanzen bei der Behandlung der Myokarditis fehlen, im Mausmodell konnte jedoch bei erhöhter Zytokinexpression durch eine β -Blockade die Inflammation reduziert und die Prognose verbessert werden (Nishio et al., 2003, Shioi et al., 1996).

In der vorliegenden Untersuchung wurde der erwartete prognostische Benefit einer β -Blockertherapie bei Verdacht auf Myokarditis bestätigt, wohingegen der Verzicht auf diese medikamentöse Therapieoption, insbesondere bei Patienten mit erheblicher Herzinsuffizienzsymptomatik, mit einer schlechten Prognose behaftet war. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dieser Arbeit nicht um eine Interventionsstudie sondern um eine retrospektive Beobachtung handelt und weiter Bedarf für randomisierte β -Blockerstudien zur Behandlung der Myokarditis besteht, insbesondere bei Patienten mit hohem Risiko.

5.4. Schlussfolgerung

Angesichts der weiterentwickelten Möglichkeiten in der bildgebenden Diagnostik (Marholdt et al., 2004) ist es von Interesse, die Rolle der Endomyokardbiopsie in der Diagnostik und Prognoseabschätzung der Myokarditis neu zu definieren (Pauschinger et al., 2006 Cooper et al., 2007). Die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der immunhistologische Nachweis einer inflammatorischen Reaktion, mit oder ohne Nachweis von Virusgenom, auch bei negativen Dallas-Kriterien verlässlich Patienten mit einem erhöhten Risiko für einen kardial bedingten Tod oder eine Herztransplantation identifizieren kann. Insbesondere die Subgruppe von Patienten mit kombinierten Risikofaktoren wie positivem immunohistochemischem Befund, fortgeschrittener Herzinsuffizienzsymptomatik und fehlender β -Blockertherapie ist mit einer erheblich gesteigerten Mortalität

behaftet. Angesichts des wichtigen Beitrags, den die immunhistochemische Beurteilung leistet, erscheint eine Myokardbiopsie zur Risikostratifikation bereits im frühen Stadium sinnvoll. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen diesbezüglich die aktuellen Empfehlungen von AHA/ACC und ESC (Cooper et al., 2007).

6. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Aty H, Boye P, Schulz-Menger (2005) J Diagnostic performance of cardiovascular magnetic resonance imaging in patients with suspected acute myocarditis: comparison of different approaches.
J Am Coll Cardiol. 45(11):1815-22
2. Ansari A, Maron BJ, Berntson DJ (2003) Drug-Induced Toxic Myocarditis
Tex Heart Inst J 30(1):76-79
3. Arai AE (2007) False positive or true positive troponin in patients presenting with chest pain but “normal” coronary arteries: lessons from cardiac MRI.
Eur Heart J 28(10):1175-1177
4. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD (1987) Myocarditis. A histopathologic definition and classification.
Am J Cardiovasc Pathol 1:3-14
5. Baughman KL (2006) Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria.
Circulation 113:593-595

6. Billingham ME (1987) Pharmacotoxic myocardial disease: an endomyocardial study. Myocarditis and related disorders: Proceeding of the International Symposium on Cardiomyopathy and Myocarditis. Springer, Tokyo, Japan
7. Binah O (2002) Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology.
J Mol Cell Cardiol 34:1147-1161
8. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A (2007) A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis.
Eur Heart J 28:1326-33
9. Canter CE (2005) Therapy for pediatric myocarditis. Curr Treat Options.
Cardiovasc Med 7(5):411-417
10. Cassling RS, Linder J, Waller BF (1985) Quantitative evaluation of inflammation in biopsy specimens from idiopathically failing or irritable hearts: experience in 80 pediatric and adult patients
Am Heart J 110(4):713-20
11. Celik T, Selimov N, Isik E (2006) Prognostic significance of electrographic abnormalities in diphtheric myocarditis after hospital discharge: a long term follow up.
Ann noninvasive Electrocardiol. 11(1):28-33

12. Collinson PO, Boa FG, Gaze DC (2001) Measurement of cardiac troponin.
Ann Clin Biochem 38:423-449
13. Communal C, Singh K, Sawyer DB et (1999) Opposing effects of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors on cardiac myocytes apoptosis. Role of a pertussin toxin-sensitive G-protein.
Circulation 100:2210-2212
14. Chow L, Beisel KW, McManus BM (1992) Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency.
Lab. Invest 66:24-31
15. Chow L, Radio S, Sears T (1989) Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis.
J Am Coll Cardiol 14:915-920
16. Clemson BS, Miller WR, Feriss JA (1992) Acute Myocarditis in fulminant systemic sclerosis.
Chest 101(3):872-874
17. Cooper LT, Baughman KL, Feldman M (2007) The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease. A scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Circulation 116:2216-2233

18. Dec GW, Palacios IF, Fallon JT (1985) Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome.
N Eng J Med 31:885-90
19. Dec GW, Palacios I, Haber E (1990) Antimyosin antibody cardiac imaging: Its role in the diagnosis of myocarditis.
J Am Coll Cardiol 16(1):97-104
20. Deckers JW, Hare JM, Baugham K (1992) Complications of transvenous right ventricular endomyocardial biopsy in adult patients with cardiomyopathy: a seven-year survey of 546 consecutive diagnostic procedures in a tertiary referral center.
J Am Coll Cardiol 19:43-47
21. Dickstein K, Cohen-Solol A, Filippatos G (2008) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.
Eur. Heart J 29:2388-2442
22. Doolan A, Langlois N, Semsarian C (2004) Causes of sudden cardiac death in young americans.
Med J Aust 180(3):110-112
23. Fabre A, Sheppard MN (2005) Sudden death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death.
Heart 92(3):316-320
24. Feldman AM, McNamara D (2000) Myocarditis.
N Engl J Med 343:1388-1398

25. Felker GM, Thompson RE, Hare JM (2000) Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy.
N Eng J Med 342:1077-1084
26. Fenoglio JJ, Ursell PC, Weiss MB (1983) Diagnosis and Classification of myocarditis by endomyocardial biopsy.
N Eng J Med 308:12-18
27. Figulla HR, Stille-Siegener M, Kreuzer H (1995) Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: a benign disease compared with idiopathic dilated cardiomyopathy.
J Am Coll Cardiol. 25(5):1170-1175
28. Fowles RE, Mason JW (1982) Endomyocardial biopsy.
Ann Intern Med. 97(6):885-894
29. Franco-Paredes C, Roupale N, Hurts JW (2007) Cardiac manifestations of parasitic infections: Overview and immunopathogenesis.
Clin.Cardiol. 30(4):195-199
30. Frustraci A, Cuoco L, Gasbarrini G (2002) Celiac Disease associated with autoimmune Myocarditis.
Circulation 105(22):2611-2618

31. Frustraci A, Gentiloni N, Caldarulo M (1996) Acute Myocarditis and left ventricular Aneurysms as Presentations of Systemic Lupus Erythematoses.
Chest 109(1):282-284
32. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A (2000) Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.
J Am Coll Cardiol 36:1920-1926
33. Gauntt Cj, Arizpe HM, Higdon AL (1995) Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis.
J Immunol 154:2983-2995
34. Gordon RY, Blumberg E., Fyfe B (2004) Whipple pancarditis as a rare case of heart failure.
Ann Intern Med 140(8):6734-6744
35. Gravanis MB, Sternby NH (1991) Incidence of myocarditis. A 10-year autopsy study from Malmö, Sweden.
Arch Pathol Med 115(4):390-399
36. Grogan M, Redfiel MM, Bailey KR (1995) Long-Term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy.
J Am Coll Cardiol 26:80-94

37. Hahn EA, Hartz VL, Mason JW (1995) The myocarditis treatment trial: Design, methods and patient enrolment.
Eur Heart J 16Suppl.0:162-167
38. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards W (1989) Evaluation of post-mortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error.
Mayo Clinic Proc 63:1235-1245
39. Henry WL, DeMaria A, Gramiak R (1980) Report of the American Society of Echocardiography Committee on nomenclature and standards in two-dimensional echocardiography.
Circulation 62: 212
40. Herskowitz A, Campbell S, Baughmann KL (1993) Demographic features and prevalence of idiopathic myocarditis in patients undergoing endomyocardial biopsy.
Am J Cardiol. 71(1):982-986
41. Huber SA, Pfaeffle B (1994) Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3.
J Virol 68:5126-5132
42. Janzen I, Gärtner B, Schwaab B (2001) Vergleich der Virusserologie mit dem Nachweis von Virusgenom in Endomykardbiopsien bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Myokarditis unter besonderer Berücksichtigung von Parvovirus B19.
Z Kardiol.2001;90,Suppl. 2, II/7

43. Janzen I, Hellwig D, Schwaab B (2000) Indium-111 Antimyosinszintigraphie bei klinischem Verdacht auf Myokarditis im Zeitalter molekularbiologischer Diagnostik.
Z Kardiol Suppl. 6,VI/33
44. Kawai C (1999) From myocarditis to cardiomyopathy: mechanism of inflammation and cell death: Learning from the past for the future.
Circulation 99:1091-1100
45. Kaye DM, Leftkovits J, Jennings GL (1995) Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart.
J Am Coll Cardiol 26:1257-1263
46. Kearney MT, Cotton JM, Shah AM (2001) Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management.
Postgrad Med J. 2001;77(903):4-10
47. Kereiakes DJ, Parmley WW (1984) Myocarditis and Cardiomyopathy.
Am Heart J 108:1318-1326
48. Killian JG, Kerr K, Lawrence C (1999) Myocarditis and cardiomyopathy associated with clozapine.
Lancet 354:1841-1845

49. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger L, Böhm M (2008) Predictors of Outcome in Patients with suspected Myocarditis.
Circulation 118:639-648
50. Klingel K, Hohenadl C, Canu A (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
51. Klingel K, Schnorr JJ, Sauter M (2003) β 2-microglobulin-associated regulation of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic coxsackievirus myocarditis.
Am J Pathol 162:1709-1720
52. Klump WM, Bergmann I, Müller BC, Ameis C, Kandolf R (1990) Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus strand RNA synthesis.
J Virol 64:1573-1583
53. Knowlton KU, Badorff C (1999) The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance.
Circ res 85(6):5559-5561

54. Kühl U, Lauer B, Schultheiss HP (1998) Antimyosin scintigraphy and immunohistological analysis of endomyocardial biopsy in patients with clinically suspected Myocarditis – evidence of myocardial cell damage and inflammation in the absence of histologic signs of myocarditis.
J Am Coll Cardiol. 32:1371-1376
55. Kühl U, Noutsias M, Schultheiss HP (1995) Immunochemistry in dilated cardiomyopathy.
Eur Heart J 16 Suppl 0:100-106
56. Kühl U, Pauschinger M, Kandolf R (2003) Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction.
Circulation 108:945-950
57. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B (2005) Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction.
Circulation 112:1965-1970
58. Kuethe F, Siquusch HH, Hilbig K (2007) Detection of viral genome in the myocardium: lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy.
Am Heart J 153:850-858
59. Libby P, Bonow R, Mann D (eds) (2007) Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8th ed. Saunders, Philadelphia

60. Lieback E, Hardouin I, Hetzer R (1996) Clinical value of echocardiographic tissue characterization in the diagnosis of myocarditis.
Eur heart J 17(1):135-142
61. Mahfoud F, Gärtner B, Kindermann M (2011) Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility?
Eur heart J 32(7):897-903
62. Magnani JW, Dec GW (2006) Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment.
Circulation 113:876-90
63. Magnani JW, Danik HJS, Dec GW (2006) Survival in biopsy-proven myocarditis: A long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical and hemodynamic predictors.
Am Heart J 151:463-470
64. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A (2004) CMR assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology.
Circulation 109:1250-1258
65. Maisch B, Portig I, Pankuweit S (2000) Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus.
Herz 3:200-209
66. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Simoes MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease.

67. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G (2006) Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention.
Circulation 113:1807-1816.
68. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Simoes MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease.
Circulation 115(9):1109-1123
69. Mason JW (2003) Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link.
Cardiovasc Res 60:5-10
70. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A (1995) A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators.
N Engl J Med 333:269-75
71. McCarthy III RE, Boehmer JP, Hruban RH (2000) Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis.
N Engl J Med 342:690-695

72. Murray DR, Prabhu SD, Chandrasekar B (2000) Chronic β -adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression.
Circulation 101:2338-2341
73. Muir P, Kandolf R (1993) The laboratory diagnosis of enterovirus-induced heart disease. In: Benatvala, JE (ed): Viral infections of the heart.
Holder & Stoughton, London, pp210-229
74. Nishio R, Shioi T, Sasayama S (2003) Carvedilol increases the production of interleukin-12 and interferon-gamma and improves the survival in mice infected with the encephalomyocarditis virus.
J Am Coll Cardiol 41:340-345
75. Nohria A, Tsang SW, Fang JC (2003) Clinical assessment identifies hemodynamic profiles that predict outcomes in patients admitted with heart failure.
J Am Coll Cardiol 41:1797-1804
76. Nosanchuk JD (2002) Fungal myocarditis.
Front Biosci. 2002; 7:423-438
77. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP (2004) Viral heart disease: molecular diagnosis, clinical prognosis and treatment strategies.
Med Microbiol Immunol. 193(2-3):65-69

78. Pauschinger M, Doerner A, Kühl U (1999) Enteroviral RNA Replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis.
Circulation 99:889-895.
79. Pauschinger M, Noutsias M, Lassner D (2006) Inflammation, ECG-Changes and pericardial effusion. Whom to biopsy in suspected myocarditis?
Clin Res Cardiol 95:1-15
80. Pinamonti B, Alberti B, Camerini F (1998) Echocardiographic findings in myocarditis.
Am J Cardiol. 62(4):285-291
81. Pulerwitz TC, Cappola MD, Felker M (2004) Mortality in primary and secondary myocarditis.
Am Heart J 147:746-750
82. Rump AF, Theisohn M, Klaus W (1995) Pathophysiology in cocaine cardiotoxicity.
Forensic Sci Int 180(2):129-135
83. Saphir O (1941) Myocarditis: A general view, with analysis of two hundred and forty cases.
Arch Pathol. 32:1000-1051
84. Schoppet M, Maisch B (2001) Alcohol and the heart.
Herz 2001 26(5):345-352

85. Schwartzkopf B, Klein RM, Strauer BE (1997) Diagnostik und Therapie der Myokarditis.
Internist 36:469-483
86. Shanes JG, Billingham ME, Ferrans VJ (1987) Interobserver Variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results.
Circulation 75(2):401-5
87. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S (1996) Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice.
Circulation 94:2930-2937.
88. Sobernheim JF (1837) Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf Pathologische Anatomie. A. Hirschwald, Berlin
89. Strauer BE, Kandolf R, Mall G (2001) Update 2001: Myokarditis – Kardiomyopathie.
Med. Klin 96:608-625
90. Thomas L (1998) Labor und Diagnose.
5. Auflage TH-Books-Verlagsgesellschaft, Frankfurt
91. Wang JF, Meissner A, Malek (2005) Propranolol ameliorates and epinephrine exacerbates progression of acute and chronic viral myocarditis.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:H1577-1583

92. Wasi F, Shuter J (2003) Primary bacterial infection of the myocardium.
Front Biosci. 228-231
93. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ (1994) Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.
Circulation 89:2582-2589
94. Wessely R, Henke A., Knowlton KU (1998) Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a Myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes.
Circulation 98(5):450-457
95. Xanthos T, Lelovas P, Kouskouni E (2006) Lyme carditis : complete atrioventricular dissociation with need for temporary pacing.
Hellenic J Cardiol 2006 ; 47(5);313-316
96. Xiong D, Yajima T, Lim BK (2007) Inducible cardiac-restricted expression of enteroviral protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy.
Circulation 115:94-102
97. Yelgec NS, Dymarkowski S, Bogaert J (2007) Value of MRI in patients with a clinical suspicion of acute myocarditis.
Eur Radiol 17(9):2211-2217

98. Yilmaz A, Kindermann I, Sechtem U (2010) Comparative Evaluation of Left and Right Ventricular Endomyocardial Biopsy
Circulation 122:900-909
99. Zeppenfeld K, Blom NA, Schlij MJ (2007) Incessant ventricular tachycardia in fulminant lymphocytic myocarditis: Evidence for Origin in the Purkinje system and successful treatment with ablation.
Heart Rhythm. 4(1) 88-91
100. Zuppinger C, Timolati F, Suter T (2007) Pathophysiology and diagnosis of drug induced cardiomyopathy.
Cardiovasc Toxicol 7(2):61-66

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Böhm gebührt an erster Stelle mein herzlicher Dank. Er betreute meine wissenschaftliche und klinische Arbeit mit stetiger Hilfsbereitschaft und motivierender Unterstützung.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. M. Kindermann möchte ich für die freundschaftliche und ausdauernde Betreuung, für seine kritische Aufgeschlossenheit und humorvolle Diskussionsbereitschaft sowie sein persönliches Interesse am Entstehen dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Dr. I. Kindermann für die unermüdliche und freundschaftliche Unterstützung insbesondere bei Themensuche und Patientenrekrutierung sowie die sehr lehrreichen Gespräche über das Thema Myokarditis.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. R. Kandolf u. Fr. PD Dr. med. K. Klingel von der Abteilung für Molekulare Pathologie der Universität Tübingen für die molekularbiologische Untersuchung der Endomyokardbiopsien .

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. B. Bültmann vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen für die histologische und immunhistologische Begutachtung der Endomyokardbiopsien bedanken.

Herrn. Dr. med. G. Schneider und dem übrigen Personal der Abteilung für Radiodiagnostik, Arbeitsgruppe Kernspintomographie sei für die zeitnahe Durchführung der kernspintomographischen Untersuchungen der Patienten gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Leitern des Herzkatheterlabors, Herrn Dr. med. B. Hennen und Herrn Prof. Dr. med. B. Scheller sowie allen dort tätigen Mitarbeitern für Ihre Hilfe, ohne die die kurzfristige Durchführung von Herzkatheteruntersuchungen und Myokardbiopsien nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls sei dem Pflegepersonal und den ärztlichen Kollegen aller Stationen der Klinik für die Mitbetreuung der Studienpatienten gedankt.

Bedanken möchte ich mich zuletzt besonders auch bei meiner Frau Elke für ihre unermüdliche motivierende Unterstützung.

8. Lebenslauf:

Name: Thomas Müller
 Geburtsdatum: 02.12.1968
 Geburtsort: Paderborn
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung: 1975 -1979 St. Stephanus Grundschule Paderborn
 1979 -1988 Gymnasium Theodorianum Paderborn
 31.05.1988 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 1988 -1990 St. Johannisstift Krankenhaus Paderborn

Studium: WS 1990/91 Studium der Humanmedizin an der
 medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
 23.03.1995 Ärztliche Vorprüfung
 23.03.1995 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 10.09.1997 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 04.11.1998 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruf: 15.11.1998 -15.05.2000 Tätigkeit als Arzt im Praktikum an
 der Medizinischen Universitäts- und Poliklinik,
 Innere Medizin III Homburg/Saar
 16.05.2000 Approbation als Arzt
 16.05.2000 -15.03.2008 Tätigkeit als Assistenzarzt
 an der Medizinischen Universitäts- und Poliklinik,

Innere Medizin III Homburg/Saar

04.10.2005 Facharztprüfung für Innere Medizin

04.12.2007 Facharztprüfung für Kardiologie

Seit 16.03.2008 Oberarzt in der Abteilung für Innere Medizin
des Diakonissen-Stiftungs-Krankenhauses Speyer