

Aus der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

DIE BEDEUTUNG EINER PARVOVIRUSINFEKTION
BEI EINER MYOKARDITIS

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Saskia Schlieker
aus Berlin

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

I Abstract	I
Abstract Deutsch	I
Abstract English	III
II Tabellenverzeichnis	IV
III Abbildungsverzeichnis	IV
IV Abkürzungsverzeichnis	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Virusarten	1
1.2 Mögliche Behandlungsoptionen	2
1.3 Das Parvovirus	3
1.3.1 Aufbau des Virus und Funktion seiner Strukturproteine	3
1.3.2 Epidemiologie	5
1.3.3 Diagnostik	5
1.3.4 Organmanifestationen	6
1.3.5 Auswirkungen auf die Wirtszelle	6
1.4 Myokarditis	8
1.4.1 Prozesse auf Zellebene	8
1.4.2 Epidemiologie	10
1.4.3 Verlauf und Prognose	11
1.4.4 Symptome	12
1.4.5 Diagnostik	12
1.4.6 Therapie Myokarditis	13
1.5 Fragestellung	15
2. METHODIK	17
2.1 Diagnostik	18
2.2 Therapie Patientenkollektiv	19
2.3 Untersuchung der Gewebeproben	20
2.3.1 Histologie	20
2.3.2 Immunhistologie	21
2.3.3 Extraktion und Detektion von Virusgenomen	22
2.3.4 Extraktion und Detektion von B19V-mRNA	24
2.4 Statistische Analyse	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs - Ausgangssituation	27
3.2. Untersuchungsergebnisse	30
3.2.1 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion	30
3.2.1.1 LVEF – Patienten gesamt	31
3.2.1.2 LVEF – B19V-positive versus virusnegative Patienten	31

3.2.2 LVEDD und LVESD	36
3.2.3 B19V-DNA und B19V-mRNA-Kopienanzahl	38
3.2.3.1 B19V-DNA-Kopienanzahl	38
3.2.3.2 B19V-mRNA-Kopienanzahl	39
3.2.4 Histologische und immunhistologische Auswertung	40
3.2.5 Leitsymptome	42
3.2.6 NYHA-Klassifikation	44
3.2.7 Medikation	45
4. DISKUSSION	47
4.1 Diskussion Methodik	48
4.1.1 Patientenkollektiv	48
4.1.2 Diagnostik	48
4.1.3. Endomyokardbiopsie	49
4.1.4 Sampling Error	49
4.1.5 Einteilung der Untersuchungsgruppen – molekularbiologische Auswertung	50
4.1.6 Histologische und immunhistologische Auswertung	51
4.1.7 Limitationen	52
4.2 DISKUSSION ERGEBNISSE	53
4.2.1 Ausgangssituation	53
4.2.2 Myokardiale Entzündung	54
4.2.3 Beurteilung der Herzfunktion anhand der LVEF	55
4.2.4 B19V-DNA-Kopien	58
4.2.5 Bedeutung der Viruslast für eine Myokarditis/dilatative Kardiomyopathie	60
4.2.6 B19V-mRNA-Kopien	62
4.3 Conclusio Fragestellung	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
Literatur	67
Eidesstattliche Versicherung	79
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	79
Lebenslauf	80

I Abstract

Abstract Deutsch

Einleitung:

Parvovirus B19 (B19V) ist das qualitativ am häufigsten nachgewiesene virale Genom im Myokard [1,2]. Die Prävalenz des B19V ist, aufgrund einer lebenslangen Persistenz [3-5] sowie der hohen Durchseuchungsrate [6,7], hoch.

Die Bedeutung des B19V bei der Entität der Myokarditis wird kontrovers diskutiert. Bisher konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem myokardialen Nachweis von B19V-DNA und einer Myokarditis hergestellt werden [8].

Bei einer anhaltenden myokardialen Entzündung ohne vorliegendes Virusgenom wird eine immunsuppressive Therapie empfohlen [9-11]. Es liegen antivirale Behandlungsstudien vor, die sich vornehmlich mit der Therapie von Adeno- und/oder Enteroviren induzierten Kardiomyopathien durch INF- β beschäftigen [12-15]. Für das B19V existieren unter Erprobung stehende Therapieansätze mit INF- β [12,13,16]. Wie sich B19V unter Immunsuppression verhält, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Für Menschen mit myokardial vorliegendem B19V, die an einer progredienten Myokarditis erkrankt sind, gibt es bisher keine spezifische Therapie.

In der hiesigen retrospektiven Beobachtungsanalyse wurden sowohl Daten B19V-positiver als auch virusnegativer Patienten/-innen, die im Rahmen einer Myokardistherapie immunsuppressive Medikamente erhielten, retrospektiv ausgewertet.

Methodik:

52 Patienten/-innen mit Myokarditis (32 B19V-positiv und 20 virusnegativ) wurden einmal vor und einmal nach sechsmonatiger immunsuppressiver Therapie mit Prednisolon und Azathioprin endomyokardial biopsiert und klinisch untersucht. Die Biopsieergebnisse und klinischen Parameter beider Zeitpunkte wurden miteinander verglichen und mittels SPSS statistisch ausgewertet.

Ergebnisse:

Die sechsmonatige immunsuppressive Therapie führte sowohl bei den B19V-positiven als auch virusnegativen Patienten/-innen zu besseren klinischen

Parametern (u.a. signifikanter Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion). Es konnte kein signifikanter Anstieg der Viruslast verzeichnet werden.

Schlussfolgerung:

Anscheinend können nicht nur virusnegative, sondern auch B19V-positive Patienten/-innen mit einer Myokarditis von einer immunsuppressiven Therapie profitieren. Weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven sind nötig, um die Daten dieser Arbeit zu verifizieren und Informationen über das Langzeitoutcome B19V-positiver, immunsuppressiv behandelter, Patienten/-innen zu erhalten.

Abstract English

Introduction:

Parvovirus B19 (B19V) is the most qualitatively proven viral genome in the myocardium [1,2]. The prevalence of B19V is very high due to a lifelong persistence [3-5] and the high degree of infestation [6,7]. The importance of B19V in the entity of myocarditis is controversially discussed. So far, no significant correlation between myocardial detection of B19V DNA and myocarditis could be established [8].

In the case of persistent myocardial inflammation without a virus genome, immunosuppressive therapy is recommended [9-11]. Antiviral treatment studies exist, which mainly deal with the therapy of adeno- and/or enteroviruses by INF- β [12-15]. For the B19V there are therapy approaches under trial with INF- β [12,13,16]. How B19V behaves under immunosuppression is not known at this time. For people with myocardial B19V who suffer from progressive myocarditis, there is no specific therapy available so far. In the present retrospective observational analysis, data of both B19V-positive and virus-negative patients who received immunosuppressive drugs as part of myocarditis therapy were evaluated retrospectively.

Methodology:

52 patients with myocarditis (32 B19V-positive and 20 virusnegative) were biopsied and clinically examined once before and once after six months of immunosuppressive therapy with prednisolone and azathioprine endomyocardially. The biopsy results and clinical parameters of both points in time were compared and statistically evaluated by SPSS.

Results:

The six-month immunosuppressive therapy led to better clinical parameters in both B19V-positive and virus-negative patients (e.g. significant increase in left ventricular ejection fraction). There was no significant increase in viral load.

Conclusion:

Apparently, not only virus-negative but also B19V-positive patients with myocarditis can benefit from immunosuppressive therapy. Further studies with larger patient populations are needed to verify the data of this work and to obtain information on the long-term outcome of B19V-positive, immunosuppressive treated patients.

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Behandlungsoptionen einer Myokarditis – Übersicht/Fragestellung.....	2
Tabelle 2: Analyse Entzündungszellen.....	22
Tabelle 3: Primer	24
Tabelle 4: Amplifikationskombination.....	24
Tabelle 5: Patientenausgangssituation – Zusammenfassung aller Parameter	29
Tabelle 6: LVEF – statistische Analyse (B19V-positive & virusnegative Patienten).....	32
Tabelle 7: LVEF – Messergebnisse.....	35
Tabelle 8: LVEDD und LVESD – Statistische Analyse	36
Tabelle 9: LVEDD – Messergebnisse.....	37
Tabelle 10: LVESD – Messergebnisse.....	37
Tabelle 11: Entwicklung B19V-DNA-Kopienanzahl	38
Tabelle 12: Einteilung nach der B19V-mRNA-Kopienbestimmung (1. und 2. Biopsie).....	39
Tabelle 13: Entwicklung B19V-mRNA-Kopienanzahl	39
Tabelle 14: Entzündungsnachweis – histologische Auswertung.....	40
Tabelle 15: Entzündungsmarker – immunhistologische Auswertung.....	41
Tabelle 16: Leitsymptome – prozentuales Auftreten	43
Tabelle 17: Leitsymptome zu Therapieende.....	44
Tabelle 18: NYHA-Klassen – Entwicklung.....	45
Tabelle 19: Herzinsuffizienzmedikation.....	46

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phasen der viralen Myokarditis.....	9
Abbildung 2: Therapieschema	14
Abbildung 3: LVEF zu Therapiestart und -ende (gesamtes Patientenkollektiv)	31
Abbildung 4: LVEF zu Therapiestart und -ende B19V und Vneg	33
Abbildung 5: Entwicklung durchschnittlicher LVEF (B19V-positive vs. virusnegative Patienten)	34
Abbildung 6: NYHA-Klassen zu Therapiestart und -ende.....	45

IV Abkürzungsverzeichnis

ACE: Angiotensin-Converting-Enzym
ADV: Adenovirus
AHA: American Heart Association
ASS: Acetylsalicylsäure
AT₁: Angiotensin1-Rezeptorantagonist
CSE: Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
DKM: dilatative Kardiomyopathie
DKMe: entzündliche dilatative Kardiomyopathie
EBV: Epstein-Barr-Virus
ESC: Europäische Gesellschaft für Kardiologie
EV: Enterovirus
GE: gemessene Einheiten
HHV6: Herpesvirus 6
HLA: Humanes Leukozyten Antigen
HIV: Humanes Immundefizienz Virus
IKDT: Institut für kardiale Diagnostik und Therapie (Berlin)
IL-6: Interleukin 6
INF-β: Interferon-β
ISFC: International Society and Federation of Cardiology
KHK: koronare Herzkrankheit
LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD: linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MK: Myokarditis
MKa: akute Myokarditis
MK-BL: Borderline Myokarditis
MRT: Magnetresonanztomographie
NF-κB: „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer“ aktivierter B-Zellen
NS: non-structural Polypeptid
ORF: open reading frame
B19V: Parvovirus B19
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
RORC: Transkriptionsfaktor
qPCR: quantitative Polymerase-Kettenreaktion
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TIMIC: Tailored Immosuppression in Inflammatory Cardiomyopathy (Studie)
TNF-α: Tumornekrosefaktor alpha
Vneg: virusnegative Patienten/-innen, Kontrollkollektiv
VP1 und VP2: Kapsid Proteine
WHO: World Health Organisation
ZMV: Zytomegalievirus

1. EINLEITUNG

Als Myokarditis (MK) wird eine entzündliche Erkrankung des Myokards bezeichnet, die durch infektiöse und nicht infektiöse Ätiologie (metabolische, toxische und genetische) bedingt sein kann [17,18]. Es wird zwischen akutem und chronischem Verlauf unterschieden. Die genaue Epidemiologie der MK ist schwer zu erfassen, da ihre Symptomatik vielfältig ist und sie häufig inapparent verläuft. In den westlichen Ländern sind ca. 50% der Myokarditiden viralen Ursprungs [18,19].

1.1 Virusarten

Enteroviren (EV), zu denen die Coxsackieviren A und B gehören, wurden bisher für ca. 10-15% der Virusmyokarditiden verantwortlich gemacht [20,21]. Weitere Viren sind Adeno- (ADV), Hepatitis- (HA/B/C/EV), Humane Immundefizienz- (HIV), Ebstein-Barr- (EBV), Zytomegalie- (ZMV), Herpes- (HHV6) und Erythroviren [22]. Zu den Erythroviren gehört das vaskulotrope Parvovirus B19 (B19V), dessen DNA in fast allen Organen des Körpers detektiert werden kann (siehe 1.3.4), ohne dass eine Replikation oder eine direkte Krankheitskausalität nachgewiesen werden muss [3,23].

Die Bedeutung des B19V bei der Entität der MK wird kontrovers diskutiert. In einer Metaanalyse kamen Rigopoulos et al. 2019 zu dem Ergebnis, dass der reine Nachweis von B19V-DNA in Myokardbiopsien in keinem signifikanten Zusammenhang mit der klinischen Diagnose von MK und dilatativen Kardiomyopathie (DKM) stehe [8]. B19V ist das qualitativ am meisten nachgewiesene virale Genom im Myokard [1,2]. Eine 2003 von Kühl et al. veröffentlichte Studie wies neben EV und ADV am häufigsten B19V im Myokard bei Patienten¹ mit akuter MK (MKa) und infarktähnlicher Klinik (ohne angiographisch nachweisbarer Koronarstenose) nach [24]. Bei 71% der Probanden konnten Viren nachgewiesen werden wovon 50% B19V waren [24]. In einer anderen Studie erhielten Kühl et al. ähnlich hohe Prävalenzen und Verteilungen von B19V-Genomen in den Biopsien von Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer DKM [25].

¹ Aus Gründen der Lesbarkeit wird im Folgenden die männliche Form verwendet. Die Bezeichnung soll sich jedoch auf Angehörige aller Geschlechter beziehen, soweit nicht anders gekennzeichnet.

Kandolf et al. gaben mit einer Prävalenz von 36,7% B19V als potentiell häufigsten kardiotropen Erreger an [26,27]. Eine lebenslange Persistenz [3,28] sowie die bereits im Kindesalter bei 5-15% liegende Durchseuchungsrate, sind Ursachen der hohen Prävalenz des B19V [4-6,29].

1.2 Mögliche Behandlungsoptionen

Bei 60-70% der Patienten findet in den ersten zwei bis vier Wochen eine spontane oder medikamentös induzierte Viruselimination statt, die zu einer Erholung der Myokardfunktion beiträgt [19,20,30]. Kommt es zu keiner Erholung des Myokards, entwickelt sich eine persistierende kardiale Dysfunktion (siehe 1.4.1 und 1.4.3), die letal enden kann [22]. Bei einer anhaltenden myokardialen Entzündung und Vorhandensein von kardiotropen Viren bestehen, zusätzlich zu einer symptomatischen Herzinsuffizienztherapie, aktuell folgende Behandlungsoptionen:

Option	Zustand Myokard	Virusgenom	Therapie
1.	anhaltende myokardiale Entzündung	ohne Virusgenom	immunsuppressiv [9-11]
2	(keine) myokardiale Entzündung	Adenoviren/ Enteroviren	Behandlungsstudien mit Interferon-β [12-14]
3.	keine myokardiale Entzündung	<i>Parvovirus</i>	Keine
4.	myokardiale Entzündung	<i>Parvovirus</i>	Gibt es Behandlungsmöglichkeiten und wenn ja, welche? (Fragestellung dieser Promotion)

Tabelle 1: Behandlungsoptionen einer Myokarditis – Übersicht/Fragestellung

1.3 Das Parvovirus

Die Spezies des humanen Parvovirus gehört zur Gattung der Erythroviren und der Familie der Parvoviridae. Die Nomenklatur „B19“ geht auf die Beschriftung der Laborprobe zurück, in welcher das Virus erstmalig 1974 von Cossart und Mitarbeitern entdeckt wurde [31]. An humanpathogenen Parvoviren sind B19, PARV4, PARV5 und das humane Bocavirus bekannt [32].

B19V ist der Erreger der Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) und wird per Tröpfchen- und/oder Kontaktinfektion übertragen [33]. Des Weiteren kann B19V Verursacher u.a. von Arthritis, Glomerulonephritis, Hepatitis und Anämie sein und zu fetalen Todesfällen führen [32,34,35]. Der überwiegende Anteil an B19V-Infektionen verläuft klinisch asymptomatisch [32]. Bei einer kardialen Entzündung werden mehr als 500 GE/ μ g DNA nachgewiesene B19V-DNA-Kopien als Grenzwerte für die Aufrechterhaltung einer myokardialen Entzündung angesehen [36].

Die Replikation des B19V findet in Erythroblastenzellen des Knochenmarks statt [32]. B19V benötigt S-Phasenproteine seines Wirtes, die es von Myozyten nicht erhalten kann, da diese durch ihre Differenzierung die Eigenschaft zur Zellteilung verlieren [37]. Infektiöse Viruspartikel können in proliferierenden Zellen, die eine Mitoseaktivität und das Blutgruppenantigen P aufweisen, gebildet werden [38,39]. Liu et al. stellten die Vermutung an, dass in nicht permissiven Zellen das Gleichgewicht der Proteinsynthese auf Seiten des single nonstructural proteins (NS1) und nicht auf Seiten der Produktion von Kapsid-Transkripten liege [40].

1.3.1 Aufbau des Virus und Funktion seiner Strukturproteine

Das im Durchschnitt 20-24nm große, unbehüllte Virus weist eine isometrische, lineare Einzelstrang-DNA auf, die aus 5596 Nucleotiden besteht und identische, invertierte Sequenzen an beiden Enden besitzt [41-43]. Im Genom des B19V existieren zwei große open reading frames. Das NS1 wird von Genen auf der linken Seite des Genoms und die zwei Kapsidproteine (VP1 und VP2) von Genen auf der rechten Seite kodiert [42] (Übersetzung durch die Autorin).

Das Virus umgebende Kapsid weist einem Durchmesser von ca. 25nm auf und besteht aus den o.g. Proteinen VP1 (4%) und VP2 (96% des Proteinanteils des Kapsids)

[44,45]. VP1 umfasst ca. 80-86 kDa und VP2 ca. 58-62 kDa [44,46]. Beide Proteine sind bis auf 227 Aminosäuren, die sich am amino-terminalen Ende von VP1 befinden, identisch [44,46]. Diese Region wird als VP1-unique Region bezeichnet [44]. Durch Alternatives Spleißen der mRNA von VP1 entsteht VP2. Über VP2 findet eine Interaktion mit dem Blutgruppenantigen P statt [39]. Beide Proteine haben diverse Funktionen. So führen sie unter anderem zur Produktion von Zytokinen und Phospholipase A2 (Phospholipase A2-Aktivität ist in der VP1 unique Region vorhanden) [47]. Phospholipase A2 trägt zur Entstehung von Arachidonsäure bei, die u.a. die Ausgangssubstanz für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen darstellt. Durch Glucokortikoide kann Phospholipase A2 gehemmt werden [48]. P6 ist der einzige bekannte, funktionale Promotor innerhalb des B19V-Genoms und ist für die Synthese von neun viralen mRNA-Transkripten zuständig (u.a. für NS1, VP1 und 2) [49,50].

Das NS1 ist maßgeblich an der Transkription des viralen Genoms beteiligt, indem es den Promotor p6 aktiviert. Es trägt somit zur viralen Replikation bei [51,52]. Das Protein NS1 wird während aktiver Infektionen gebildet und scheint die Apoptose der infizierten Zelle induzieren zu können [37,53]. Liegen NS1-Antikörper vor, weist dies u.U. auf eine persistierende chronische Infektion hin, bei welcher die Virusvermehrung unvollständig oder verzögert abläuft [24,54]. NS1 fungiert als Transaktivator von zellulären Genen (z.B. Promotor für IL-6 und TNF α) [52,55-59]. Vermutlich trägt der durch NS1 induzierte Anstieg des IL-6 zur vermehrten Autoantikörperproduktion, welche die MK negativ beeinflusst, bei [58,60]. Es wurde von Mutationen in einer Nukleosidtriphosphatbindungsdomäne von NS1 berichtet, wodurch die zytotoxischen Effekte aufgehoben wurden und z.B. keine IL-6 Aktivität mehr nachzuweisen war [61]. Die Vielzahl aller Nucleotidunterschiede im NS1-Gen scheint jedoch auf stille Mutationen zurückzuführen zu sein [62].

IL-6 fungiert u.a. indirekt (extrazelluläres Signal) als Aktivator für die intrazelluläre JAK/STAT-Signalkaskade (Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription Proteine) [63-65]. STAT-Proteine beeinflussen die Expression von Proteinen, die z.B. eine Rolle bei der Inflammation spielen [64].

Es ist nachgewiesen, dass auch NS1 Einfluss auf den STAT-Mechanismus nimmt [57]. Die STAT-Dysregulation durch NS1, in Abwesenheit einer starken Immunantwort, könnte demnach für die virale Replikation, Persistenz und das Aufrechterhalten einer chronischen Entzündung verantwortlich sein und somit für B19V einen Nutzen darstellen.

1.3.2 Epidemiologie

Es gibt drei Genotypen des Parvovirus, die sich um ca. 10%, hauptsächlich in der Kapsid-Sequenz unterscheiden. Genotyp 1 kommt hauptsächlich in Nordamerika, Genotyp 2 in Nordeuropa und Genotyp 3 in Afrika, Südamerika, aber auch Europa (v.a. Frankreich) und Asien vor [66,67]. Genotyp 1 tritt häufiger auf als Genotyp 3, wohingegen Genotyp 2 hauptsächlich bei Menschen vorliegt, die vor 1970 geboren wurden [3,67]. Der Verlauf der Erkrankung ähnelt sich bei allen drei Genotypen [67].

Cohen und Buckley haben in einer Studie 1988 die Verbreitung des Parvovirus in Großbritannien untersucht [29]. Sie fanden heraus, dass (bemessen an Anti-B19 IgG) 5-15% der 1- bis 5-jährigen und 60% der erwachsenen Probanden mit Parvovirus infiziert waren. Die Durchseuchungsrate durch B19V beträgt bei über 70-jährigen mehr als 85% [29]. Bei deutschen Probanden, die älter als 65 Jahre sind, liegt sie laut einer Studie von Röhrer et al. bei 79,1% [7]. Es wird davon ausgegangen, dass 20% aller immunkompetenten Patienten nicht in der Lage sind das Virus unter Kontrolle zu bekommen: Über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren können bei diesen Patienten Viren im Blut und Gewebe nachgewiesen werden [67]. Hemauer et al. berichten von einer großen Genomvariabilität in der B19V-DNA von Patienten mit chronischer im Vergleich zu solchen mit akuter B19V-Infektion [68].

Daher kann von einer großen B19V-Prävalenz in der Bevölkerung gesprochen werden. Dies ist zum einen auf die hohe frühkindliche Durchseuchungsrate [6], zum anderen auf die lebenslange Persistenz des Virus zurückzuführen [3-5,28].

1.3.3 Diagnostik

Der Hauptdiagnostikmarker einer vorausgegangenen B19V-Infektion (akut, latent) ist das Vorhandensein von B19V-spezifischen IgG-Antikörpern im Serum [32]. Verschiedene Studien wiesen bei einer persistierenden Infektion Antikörper gegen das NS1-Protein nach [60,69]. Zur Verifizierung der Serumanalyse kann eine Gewebeuntersuchung durchgeführt werden. Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann je nach Gewebe über Monate oder sogar lebenslang B19V-DNA nachgewiesen

werden [32]. Die Gewebeanalyse scheint spezifischer als die Serumanalyse zu sein, denn auch bei IgG-seronegativem Befund konnten Virusgenome im Gewebe nachgewiesen werden [24,54].

1.3.4 Organmanifestationen

Das vaskulotrope Virus ist in den meisten Endothelien des Körpers nachzuweisen. B19V wurde auch in anderen Geweben und Zellen entdeckt: u.a. im Knochenmark, Colon [70], Schilddrüse [71], Hoden [72], Tonsillen [3], Leber [3], Haut [3,73] sowie synovialen Zellen [3,74]. Auch im Herzgewebe von Patienten ohne Anzeichen einer MK oder DKM wurde B19V nachgewiesen [23].

Durch infizierte endotheliale Progenitorzellen gelangt das Virus in Endothelien. Als Rezeptor dient das Blutgruppenantigen P [26,39,75]. Dieses wird auf Endothelzellen, in erster Linie aber auf erythroiden Vorläuferzellen und Erythrozyten, exprimiert [26]. Für die Internalisierung des Virus sind Co-Rezeptoren [75] wie $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und Ku80 notwendig [76,77].

1.3.5 Auswirkungen auf die Wirtszelle

Eine direkte Schädigung der Myozyten findet in der Regel nicht statt [26]. Während EV und ADV das Herz primär durch direkte Lyse schädigen, infiziert B19V endotheliale Zellen kleiner intrakardialer Arteriolen und Venolen [26]. Bei chronischen B19V-Infektionen ist das Virus im Kapillarendothel mit makrophagenreichen Entzündungen vorzufinden [78]. Die myokardialen Nekrosen erklären sich „sekundär im Rahmen einer ausgeprägten koronaren Mikrozirkulationsstörung mit B19-induzierter [B19 = B19V; Anmerkung durch die Autorin] endothelialer Zytokinexpression (...)“ [26]. Der unter Umständen anfangs geringe primäre Virusschaden könnte die bei symptomatischen Patienten erhaltene oder nur teils eingeschränkte Ejektionsfraktion (LVEF) erklären. Zusätzlich könnte er die Ursache für die z.T. auftretenden, klinischen Zeichen eines Myokardinfarktes sein [24,26].

Eine Infektion der Zelle durch B19V kann neben der beschriebenen Aktivierung der zellulären Immunantwort [26] auch zum Zelltod, führen [42]. B19V-Infektionen gehen mit

einer Veränderung der zellulären Genexpression einher. Dabei spielt es keine Rolle, ob eine virale Replikation vorliegt oder nicht [79]. Nachdem das B19V in eine Zelle gelangt ist, kann seine DNA in geringer Anzahl in der Wirtszelle persistieren (siehe 1.3.4), wobei es zu keiner Erkrankung kommen muss [32]. Eine geringe Menge an persistierendem Virus kann darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei der Wirtszelle um eine nicht permissive Zelle handelt [40]. Im Gegensatz zur o.g. Persistenz kann es aber auch zu einer (Re-)Aktivierung des Virus in der Wirtszelle (Endothelzelle) kommen [26]. Unter anderem können gewebespezifische Stimuli, Stress und Coinfektionen die Produktion von B19V-mRNA und Proteinen triggern. Das führt zum einen zu einer veränderten Expression von NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer aktiver B-Zellen) und kernspezifischen Hormonrezeptoren, zum anderen zu einer Beeinflussung proinflammatorischer Stoffwechselwege mit der Folge einer gesteigerten Ausschüttung von Zytokinen (TNF- α , IL-6). Die gesteigerte Zytokinausschüttung kann zur Entstehung einer MK beitragen oder ihre Progression fördern [26,56,80,81].

Ein Nachweis von Virus-mRNA scheint ein Zeichen für eine Reaktivierung/Replikation des B19V zu sein. Bock et al. detektierten nur bei Patienten B19V-mRNA in Myokardproben, bei denen sie eine Entzündung des Myokards diagnostizieren konnten [82].

Die Expression von B19V-mRNA geht mit einer veränderten Expression von 29 Wirtszell-micro-RNAs einher [83]. Die micro-RNAs stehen in direktem Zusammenhang mit Signalwegen für Bindegewebs-, kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen. In Zellen, welche das micro-RNA-Profil aufwiesen, kam es zu einem signifikanten Anstieg der RNA-Expression für TNF- α , Cyclooxygenase-1, STAT1 und RORC [83]. Die genauen Pathomechanismen des im Gewebe persistierenden Virus sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geklärt.

1.4 Myokarditis

Bei einer MK handelt es sich um eine entzündliche Herzmuskelerkrankung, die infektiös und nicht infektiös, wie z.B. metabolisch, toxisch, genetisch oder idiopathisch, hervorgerufen werden kann [17,18]. Die Entzündung kann Myozyten, perivaskuläres und interstitielles Bindegewebe sowie koronare Gefäße betreffen [18]. In den westlichen Ländern sind kardiotope Viren der Hauptauslöser von Myokarditiden [19,20]. Es wird zwischen akutem und chronischem Verlauf unterschieden. So gelten z.B. anhaltende lymphozytäre, virusnegative Myokarditiden per definitionem ab sechs Monaten als chronisch [30].

1.4.1 Prozesse auf Zellebene

Es können drei Phasen der viralen MK differenziert werden: Der primären akuten viralen Phase (I) schließt sich eine subakut immunologische (II) an. Dieser kann eine potentiell chronische immunvermittelte Schädigung des Myokards (III) folgen [84].

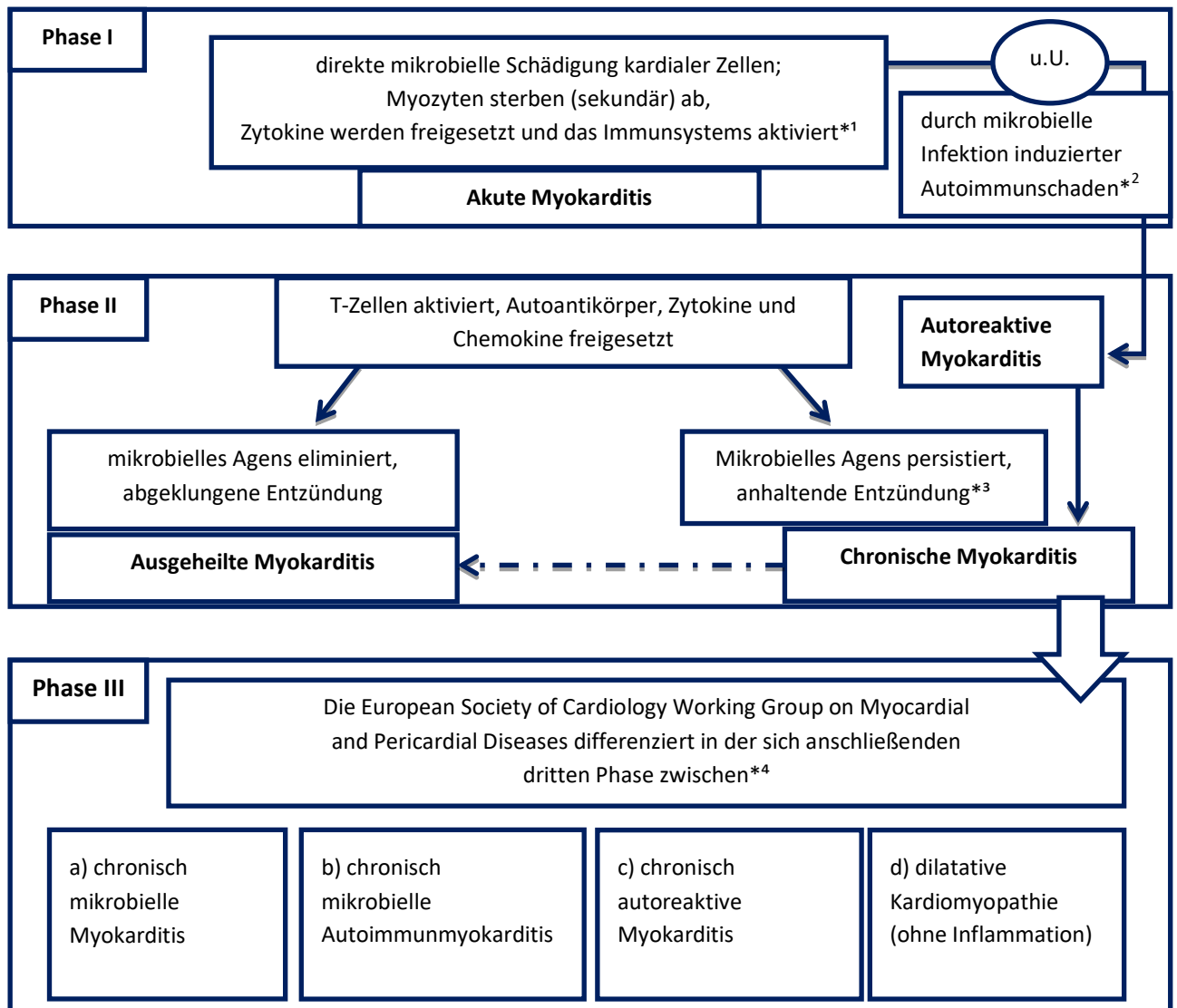


Abbildung 1: Phasen der viralen Myokarditis

Legende: *¹ [22,78] bei einer Infektion durch das Parvovirus werden nicht wie bei EV oder ADV Myozyten, sondern endotheliale Zellen kleiner intrakardialer Arteriolen und Venolen infiziert. Dadurch tritt während einer akuten Infektion eine Verschlechterung der myokardialen Mikrozirkulation mit sekundärer Myozytennekrose ein [78]; *² u.U.: kann, muss nicht stattfinden [22]; *³ u.a. durch zu wenig antivirale Zytokine [85-87]; *⁴ [22]

Nach der Infektion durch ein Virus bilden Zellen Interferon (IF) α und β , die virostatisch wirken, um einer Replikation und Ausbreitung des Virus entgegenzuwirken. Durch Interferone werden vermehrt HLA-Moleküle (Histokompatibilitätsantigen/MHC-Antigen) exprimiert [88]. Durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK) werden infizierte Zellen zerstört [89]. Ihre Aktivität wird durch Interleukin-12 (aus Makrophagen) sowie Interferon- α und β gesteigert. Durch das von den NK gebildete Interferon- γ wird der Replikation von Viren zusätzlich entgegengewirkt. Die maximale NK-Wirkung besteht ca. am dritten Tag post infectionem [88]. Somit wird die unspezifische Virusabwehr durch NK-Zellen sowie IF- α und β initiiert. Die sich anschließende spezifische Immunantwort findet in den Lymphknoten statt.

Nach ca. zehn Tagen erfolgt die Auswanderung spezifischer Effektorzellen (z.B. zytotoxische T-Zellen) aus den Lymphknoten. Ungefähr zeitgleich kommt es zur Ausschüttung von Antikörpern (IgM, IgG und IgA) durch Plasmazellen [84,88]. „Obschon die Immunantwort normalerweise die virusbeladenen Myozyten eliminiert und die Myokardheilung einleitet, kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen Virusbeseitigung und immunologischer Reaktion kommen. Bei solch inadäquaten Verteidigungsmechanismen resultiert entweder eine persistierende Virusreplikation in den Myozyten mit chronischem Infekt oder die andauernde Aktivierung der T-Zellen führt zu einer anhaltenden Myokardzerstörung mit möglichem Übergang in das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie“ [89]. Eine anhaltende entzündliche Immunantwort führt letzten Endes zur Myozytolyse, mit Troponinanstieg bei akuter MK, gefolgt von Remodellingprozessen [84,89]. Der Begriff „Remodelling“ steht für reaktive Gewebeumbauprozesse und führt zu einer Veränderung der Herzstruktur und -funktion.[84]

1.4.2 Epidemiologie

Die Epidemiologie der MK ist schwer zu erfassen, da ihre Symptomatik vielfältig ist und sie häufig inapparent verläuft [18,90]. Die Krankheit weist keinen Altersgipfel auf. Die Inzidenz der Krankheit ist nicht eindeutig zu bestimmen, da keine einheitlichen Untersuchungen durchgeführt werden. Der Goldstandard, die endomyokardiale Biopsie, wird unregelmäßig angewendet [90].

Es erkrankten mehr Männer als Frauen an einer MK [91-93]. Patriki et al. berichteten von geschlechterspezifischen Unterschieden bei der klinischen Präsentation einer MK [94]. Sie mutmaßten in ihrer Studie, dass der „subtilere Charakter der Symptome“ bei Patientinnen mit MK zur Unterrepräsentation von Frauen in bisherigen Studien geführt haben könnte [94].

1.4.3 Verlauf und Prognose

Der Verlauf von Myokarditiden wird maßgeblich vom Ausmaß der kardialen Entzündungsreaktion und myokardialen Vorschädigung sowie von den vorherrschenden Entzündungszelltypen bestimmt. Die langfristige Prognose hängt von den kardialen Vorerkrankungen und der zugrundeliegenden Ätiologie ab. Virale sowie antivirale akute Herzmuskelentzündungen weisen eine hohe Spontanheilungsrate auf [20,30,95]. „Eine spontane oder medikamentöse Viruselimination führt in ca. 60-70% zu einer Erholung der Myokardfunktion, wenn die Entzündung in der Folgezeit abklingt“ [30]. Dies ist in der Regel in den ersten zwei bis vier Wochen der Fall [22]. Im Zuge der Erregerelimination werden Myozyten durch Entzündungszellen zerstört [89]. Die Folge ist eine Defektheilung, deren Umfang den weiteren Erkrankungsverlauf mitbestimmt. Findet keine Ausheilung statt, entwickelt sich eine persistierende kardiale Dysfunktion (siehe 1.4.1). Dies ist bei ca. 25% der Patienten der Fall [22]. 12-25% dieser Patienten „verschlechtern sich akut, sterben oder schreiten zum Endstadium einer DKM fort“ [22] (Übersetzung durch die Autorin). Gemäß Definition liegt eine DKM bei Dilatation und beeinträchtigter Kontraktion des linken oder beider Ventrikel vor, die nicht durch abnormale Ladungsbedingungen oder Koronararterienerkrankungen zu erklären sind [17].

Die Prognose, Letalität und Mortalität hängen von der zugrundeliegenden Myokarditisform ab [20,22,96]. Grün et al. fanden z.B. heraus, dass bei einer viralen MK eine Mortalität von 19,2% in 4,7 Jahren besteht [97].

Caforio et al. vermuteten eine Mitverantwortlichkeit der genetischen Disposition für das Entstehen der MK und der folgenden Entwicklung zu einer DKM [98]. Die Progression einer MK zu einer DKM ist vor allem bei Patienten wahrscheinlicher, bei denen eine chronische Entzündung besteht, eine Virusinfektion persistiert und/oder bei denen Herz-

Autoantikörper vorliegen. Diese Faktoren und eine ventrikuläre Funktionseinschränkung sind prognostisch ungünstige Verlaufsprädiktoren [9,22,99,100].

1.4.4 Symptome

Die Symptome einer MK weisen eine hohe Diversität auf. Klinisch kann sie unter anderem durch pektanginöse Beschwerden, Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, ventrikuläre Arrhythmien bis hin zum kardiogenen Schock und Herztod imponieren. Zudem gibt es asymptomatische und uncharakteristische Verläufe, die z.T. mit anderen Krankheitsbildern assoziiert werden wie z.B. einem grippalen Infekt [18,20].

In allen Fällen einer vermuteten MK ist es notwendig kardiovaskuläre und koronararterielle Krankheiten auszuschließen, die die häufigsten Differentialdiagnosen darstellen (siehe 1.3.3).

1.4.5 Diagnostik

Beim klinischen Verdacht auf eine MK, kommen als diagnostische Mittel u.a. EKG, Echokardiographie, Bemessung des TroponinT/I und CK/CK-MB (Kreatinkinase) sowie kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz [22,101]. Die Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) schlug 2013 in ihrem Bericht zu Management und Therapie der MK vor, die oben genannten diagnostischen Untersuchungsverfahren bei klinischem Verdacht auf eine MK anzuwenden und den Patienten anschließend zur Beobachtung stationär aufzunehmen. Nach Ausschluss einer Koronararterienerkrankung wird eine Biopsie empfohlen [22]. Die Biopsie sollte bei Patienten durchgeführt werden, deren Gesundheitszustand sich nicht unter der symptomatischen Therapie verbessert und/oder sich akut verschlechtert (siehe 1.4.6) [19]. In solchen Fällen ist für eine spezifische Therapie eine differenzierte Diagnose erforderlich, die nur durch eine endomyokardiale Biopsie erhalten werden kann [20]. Ein weiterer Aspekt, der für eine Biopsie spricht, ist, dass eine kardiale Ursache der Beschwerden z.T. zu einem Zeitpunkt in Betracht gezogen wird, wenn EKG und laborchemische Befunde nicht mehr Charakteristika einer MK vorweisen. Echokardiographie, MRT und Angiographie liefern

nur Anhaltspunkte für das Ausmaß der kardialen Schädigung [20,101-103]. Die Gewebeproben können zur differenzierten Diagnostik der MK histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch untersucht werden (siehe 2.3) [18,104].

1.4.6 Therapie Myokarditis

Bei symptomatischen Patienten mit einer akuten MK kann neben einer körperlichen Schonung ggf. eine Analgetikagabe induziert sein. Eine intensive stationäre Überwachung sollte insbesondere bei Vorliegen akuter myokardialer Schädigungszeichen, wie z.B. ST-Streckenhebung, positive Kreatinkinase-/Troponinwerte, erfolgen. Es sollte immer eine leitlinienbasierte, symptomatische Behandlung der Herzinsuffizienz entsprechend des Schweregrades der LV-Funktionseinschränkung durchgeführt werden (Betablocker, Diuretika, ACE-Hemmer, u.a.) [105-108]. Eine Endomyokardbiopsie sollte stattfinden, wenn das MRT auf eine Entzündung hinweist und der Patient sich nicht in den folgenden 3-6 Monaten erholt sowie bei einer akuten Verschlechterung/Schock [19]. Denn „die Magnetresonanztomografie (MRT) kann allenfalls den Verdacht auf eine akute MK bestätigen, aber nicht ausschließen (positiv prädiktiver Wert ca. 80%, negativ prädiktiver Wert ca. 60%)“ [30]. Molekularbiologische und immunhistochemische Analysen der Myokardbiopsien sind wichtig, um zu analysieren, welche spezifische Therapie indiziert ist [18,104].

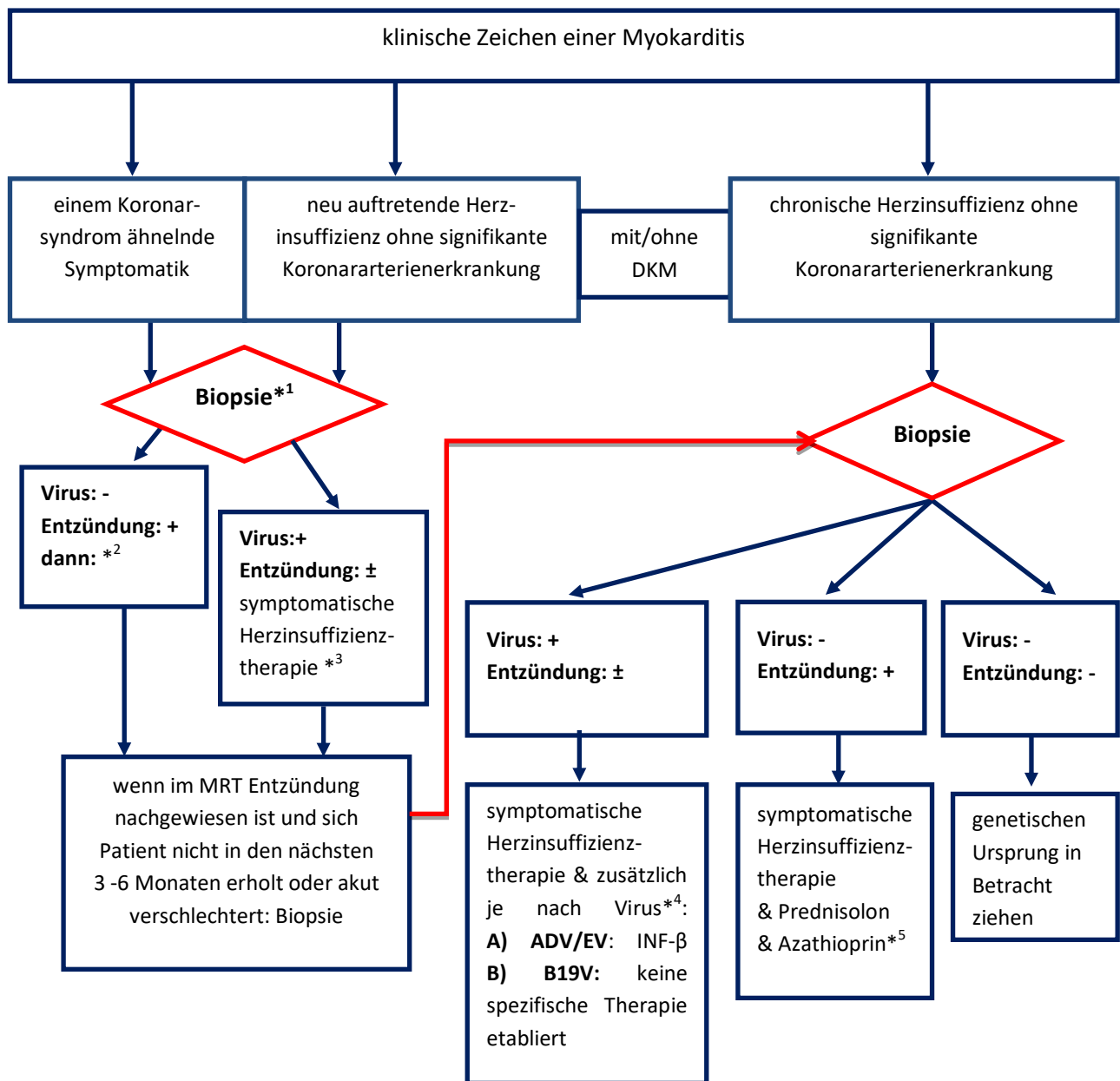


Abbildung 2: Therapieschema

Legende: Graphik nach [19,20,30] und den im Folgenden aufgeführten Quellen; *¹ [22]; *² Behandlung nach zugrundeliegender Entzündungsform (z.B. eosinophile MK mit Immunsuppressiva) und symptomatische Herzinsuffizienztherapie, Kontrollbiopsie nach 3-6 Monaten [19,30,108]; *³ [108]; *⁴ unter Erprobung stehende Therapieansätze: **A)** [12-16] **B)** [12,13,16,19,30]; *⁵ [9-11]; ±: kann vorliegen, muss nicht; -: negativ; +: positiv; **DKM**: dilatative Kardiomyopathie; **ADV**: Adenovirus, **EV**: Enterovirus, **B19V**: Parvovirus B19; **INF-β**: Interferon-β

1.5 Fragestellung

Eine persistierende Inflammation wirkt sich negativ auf die Prognose des myokardialen Krankheitsverlaufes aus [100]. B19V scheint, wie bereits beschrieben (siehe 1.3.1) Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse am Herzen zu nehmen.

Wojnicz et al. beschrieben 2001 eine signifikante Verbesserung des Langzeitoutcomes immunsuppressiv therapierter Patienten mit DCM gegenüber den Patienten ihrer Placebogruppe. Die damals entnommenen Myokardbiopsien wurden allerdings nicht auf Viren untersucht [109]. 2003 bestätigten Frustaci et al. dieses Ergebnis mit der Einschränkung, dass die immunsuppressive Therapie nur bei Patienten mit einer nicht virusassoziierten MK induziert sei. Sie detektierten retrospektiv in 85% der Myokardbiopsien ihrer Patienten, die nicht auf die Immunsuppression angesprochenen hatten, Virusgenome. Von den 41 untersuchten Patienten war einer B19V-positiv [9]. 2009 bestätigten Frustaci et al. in der TIMIC-Studie ihre Beobachtungen: die Verbesserung des Gesundheitszustandes virusnegativer, an MK erkrankter Patienten nach einer immunsuppressiven Therapie [10].

Virale Erkrankungen werden i.d.R. nicht immunsuppressiv behandelt, da mit einer schlechteren immunologischen Kontrolle gerechnet werden muss [110]. Es liegen antivirale Behandlungsstudien vor, die sich vornehmlich mit der Therapie von Adeno- und/oder Enteroviren induzierten Kardiomyopathien durch INF- β beschäftigen [12-15,20]. Für das B19V existieren unter Erprobung stehende Therapieansätze mit INF- β [12,13,16] und Telbivudin [19,30]. Wie sich B19V unter Immunsuppression verhält, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Daher stellte sich die Frage, wie sich eine immunsuppressive Therapie auf den Krankheitsverlauf (gemessen an der LVEF) von B19V-positiven Patienten mit MK auswirkt. Zurzeit ist unklar, welche klinischen Auswirkungen im Gefäßendothel persistierendes B19V hat.

In anderen Fachdisziplinen wie z.B. der Gastroenterologie wird bisher empirisch systemisch immunsuppressiv therapiert, ohne eine vorherige Diagnostik auf vorliegendes B19V durchzuführen (z.B. bei Autoimmunhepatitis) [111]. Bisher besteht keine bundesweite Statistik über durch B19V ausgelöste Erkrankungen. Nach dem Infektionsschutzgesetz in Sachsen sind sie meldepflichtig [112]. Die dortige Statistik zeigt trotz steigender Verwendung von Immunsuppressiva keinen klaren Anstieg von

B19V-Infektionen [113-117]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen immunsuppressiver Behandlung und B19V-Reaktivierung ist bisher eher in Fallberichten bei Organtransplantationen beschrieben [118]. Ein allgemeingültiger Anstieg aus anderer Indikation ist aus den vorhandenen Infektionsstatistiken nicht abzuleiten.

In der hiesigen retrospektiven Beobachtungsanalyse wurden sowohl Daten B19V-positiver als auch virusnegativer Patienten retrospektiv ausgewertet, die im Rahmen einer Myokarditistherapie immunsuppressive Medikamente erhielten. Folgende Hypothesen wurden in Bezug auf die Behandlung kardiotoxischer Parvoviren aufgestellt:

Hypothese 1:

Eine immunsuppressive Therapie führt bei B19V-positiven Patienten mit einer MK zu einer Verbesserung der LVEF.

Hypothese 2:

Von einer immunsuppressiven Therapie profitieren B19V-positive Patienten im gleichen Maße wie virusnegative Patienten.

Hypothese 3:

Eine immunsuppressive Therapie führt bei B19V-positiven Patienten zu keiner Veränderung der Viruslast.

2. METHODIK

Diese retrospektive Beobachtungsanalyse schließt 52 Patienten mit der klinischen Erstdiagnose MK ein. Allen Patienten ist gemein, dass ihre Erstdiagnose eine MK war, ihnen mindestens zweimal eine Myokardbiopsie entnommen wurde und sie alle eine immunsuppressive Therapie erhielten. Die Therapie wurde angesetzt, wenn sich der Gesundheitszustand der Patienten akut verschlechterte oder innerhalb von sechs Monaten nicht verbesserte. Die in der Studie verwendeten Patientendaten wurden von Dr. rer. nat. Kühl zur Verfügung gestellt. Das Kollektiv setzt sich aus Patienten seiner kardiologischen Sprechstunden aus den Jahren 1990 bis 2016 zusammen. Bei den Patienten aus den Jahren 1990-1994 handelt es sich um einen B19V-positiven und drei virusnegative Patienten aus seiner Tätigkeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die restlichen Patienten wurden an den Standorten Benjamin Franklin und Rudolf Virchow der heutigen Charité – Universitätsmedizin Berlin betreut.

Aktuell ist die Bedeutung von Parvovirusinfektionen bei einer MK unklar. Bei hoher Durchseuchungsrate und fast ausschließlich subklinischer Infektion kann epidemiologisch mit zunehmendem Alter vom Vorhandensein viruspezifischer Antikörper ausgegangen werden [4-6]. Somit dürfte im Rahmen einer Immunsuppression unter möglicher Reaktivierung des B19V mit einer sekundären Immunreaktion gerechnet werden.

Von den anfänglich 136 Patienten konnten 52 in diese retrospektive Beobachtungsanalyse aufgenommen werden (32 B19V und 20 virusnegative). Das häufigste Ausschlusskriterium war die Detektion eines anderen Virus wie EV, ADV oder HHV6 in einer der Biopsien oder Follow-up-Biopsien. Auch eine immunsuppressive Therapie anderer Begleiterkrankungen führte mehrfach zum Ausschluss von Patienten.

Die folgenden Kriterien mussten für die Aufnahme in die Beobachtungsanalyse erfüllt sein:

- Patienten mit einer klinisch diagnostizierten MK (akut/chronisch) oder DKM in Folge einer MK
- Vorhandensein zweier Myokardbiopsien (vor/nach immunsuppressiver Therapie)
- 6 Monate andauernde immunsuppressive Therapie
- ausschließlich B19V-Nachweis bei den „viruspositiven“ Patienten
- kein Virusnachweis im Gewebe des Kontrollkollektivs („virusnegativ“: Vneg)

- zeitnahe Biopsieentnahme vor und nach der immunsuppressiven Therapie
- zeitnahe Erfassung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) zu Beginn und Ende der immunsuppressiven Therapie
- Dokumentation von Vergleichskriterien ²
- keine Einnahme von Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren aufgrund anderer Erkrankungen im Beobachtungszeitraum
- Ausschluss anderer Pathologien wie z.B. Thrombosen, Lungen-, Tumor- und koronare Herzerkrankungen

2.1 Diagnostik

Bei allen Patienten dieser retrospektiven Beobachtungsanalyse erfolgte als erstes eine umfassende Anamnese. Die Patienten wurden zu Beginn und zum Therapieende nach Leitsymptomen wie Dyspnoe, Angina pectoris, Palpitation, Leistungseinschränkung und Müdigkeit, jeweils unter Belastung und in Ruhe, befragt und auf das Vorhandensein peripherer Ödeme untersucht. Die Symptome wurden von den Patienten den folgenden Schweregraden zugeteilt: nicht vorhanden, gering/mild, mittelgradig und hochgradig/stark. Im Ergebnisteil wird aufgrund der Subjektivität der patienteneigenen Einteilung nur auf das Vorhandensein der Beschwerden, nicht aber auf ihre Ausprägung eingegangen. Zudem wurde die NYHA-Klasse bestimmt (Definition wie in den Leitlinien angegeben [107]). Von einer Verbesserung/Verschlechterung der NYHA-Klasse wird in dieser Arbeit gesprochen, wenn sie um mindestens eine Stufe abnimmt oder zunimmt. Des Weiteren wurde im Rahmen einer in parasternaler Längsachsenansicht durchgeführten M-Modus Echokardiographie der enddiastolische und endsystolische linksventrikuläre Durchmesser (LVEDD/LVESD) bestimmt.

Als Hauptvergleichskriterium diente in dieser Arbeit die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die bei jedem Patienten möglichst zeitnah zu Therapiebeginn und -ende mittels transthorakaler Echokardiographie bestimmt wurde. Eine hochgradig eingeschränkte LVEF wurde bei < 35% angenommen. Gemäß den Leitlinien lag eine reduzierte LVEF bei < 40%, eine mittelgradig eingeschränkte bei 40-49% und eine erhaltene bei ≥ 50% vor [119].

² In Einzelfällen sind nicht alle Diagnostikmerkmale bei jedem Patienten dokumentiert, wodurch die Patientenkollektivgröße im Ergebnisteil variiert (n ≠ 52).

Die klinischen und labordiagnostischen Parameter ließen beim hiesigen Patientenkollektiv auf eine MK, MKa oder DKM schließen und lieferten somit die rechtfertigende Indikation für eine Biopsiediagnostik [22].

Im frühen Stadium können die Entzündungsherde/Nekrosen diffus oder fokal auftreten. Für eine sichere Diagnosestellung einer MK wurden daher mehrere Biopsien entnommen, um falsch negative Ergebnisse durch einen Sampling Error zu vermeiden [95]. Den hier untersuchten Patienten wurden Myokardbiopsien im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung, unter Verwendung eines Biotoms (Westmed, Deutschland und B-18110; Medizintechnik Meiners, Deutschland), entnommen. In der Regel wurde versucht, mindestens 8 Biopsien zu gewinnen. Bei der Biopsieentnahme wurde wie von Tschöpe et al. beschrieben vorgegangen [120]. Es wurde möglichst zeitnah, nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie, eine zweite Biopsie vorgenommen.

2.2 Therapie Patientenkollektiv

Die Patienten wurden für 6 Monate, nach dem gängigsten Behandlungsprinzip, immunsuppressiv mit Prednisolon und Azathioprin behandelt [19]. Initial wurde täglich 1mg/kg Körpergewicht Prednisolon für einen Monat verabreicht. Im Zweiwochenrhythmus wurde die Dosis um 10mg, bis auf eine Erhaltungsdosis von 10mg, reduziert. Die Erhaltungsdosis wurde nach sechs Monaten schleichend abgesetzt. Da ab 80mg Prednisolon vermehrt Therapienebenwirkungen zu beobachten sind, wurde auch bei Patienten, die über 80kg wogen, mit einer Dosis von 80mg/Tag Prednisolon begonnen. Um die schnelle Reduktion des Cortisons zu ermöglichen, erhielten die Patienten zudem täglich 2mg/kg Körpergewicht Azathioprin.

Zusätzlich erfolgte eine richtlinienbasierte medikamentöse Behandlung der Herzinsuffizienz [105-107,119]. Die bei den hiesigen Patienten verwendeten Medikamente waren: Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE), Angiotensin1-Rezeptorantagonist (AT1), Aldosteron-Antagonist, Betablocker, Thiazid- und Schleifendiuretika, Marcumar, Antiarrhythmika, Acetylsalicylsäure (ASS), Kalzium-Antagonist (Ca), Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer (CSE = HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) und Digitalis. Die medikamentöse Einstellung der Patienten wies bei Erstvorstellung eine große Inhomogenität auf. Daher wurde in dieser Arbeit nur auf die Medikation nach Umstellung/mit Therapiebeginn eingegangen.

2.3 Untersuchung der Gewebeproben

Die Analyse stellt keine Eigenleistung dieser Arbeit dar. Das Biopsiegewebe wurde histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch untersucht. Die histologische Färbung diente dem Entzündungsnachweis; die immunhistologische Untersuchung ist eine zuverlässige Methode für eine qualitative und quantitative Zelldifferenzierung des Phänotyps [121]. Zudem erfolgte eine Analyse auf vorhandene B19V-DNA und -mRNA. Die Entnahme der Myokardbiopsien und die molekularbiologische Untersuchung der Gewebeproben standen nicht immer in direktem zeitlichem Zusammenhang.

Bis 1996 erfolgte die Virusdiagnostik im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Professor Kandolf von der Universität Tübingen. 2003 wurde erstmals die Methodik der B19V-Diagnostik aus Myokardgewebe publiziert [24]. Die Gewebeproben fünf B19V-positiver und drei virusnegativer Patienten stammen aus den Jahren vor 2003. Diese Patienten wurden immunsuppressiv behandelt, wenn EV und ADV ausgeschlossen werden konnten. Die retrospektive B19V-Diagnostik erfolgte aus in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Gewebeproben.

Ab 2003 wurden alle Analysen der Gewebeproben durch das Institut für kardiale Diagnostik und Therapie Berlin (IKDT) durchgeführt.

2.3.1 Histologie

Die histologischen Auswertungen wurden von den pathologischen Instituten der Universität Düsseldorf und Charité Berlin (Campus Benjamin Franklin) durchgeführt. Am IKDT erfolgte die histologische Auswertung ab 2003 durch einen vormals an der Charité mit dieser Aufgabe betrauten Pathologen.

Für die histologische Auswertung wurden Paraffinschnitte hergestellt. Dafür wurde ein Teil der Gewebeproben (2-3) mit 5% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin eingefärbt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels Lichtmikroskopie anhand der Dallas Kriterien [122]. Nach diesen besteht eine MK beim Vorliegen von inflammatorischen Infiltraten im Myokard, assoziiert mit Myozytendegeneration und Nekrosen nicht-ischämischen Ursprungs [122]. Sind entzündliche Infiltrate, aber keine Zellnekrosen nachweisbar, spricht man von einer Borderline MK. Ein chronischer

Verlauf ist durch diffuse Entzündungsinfiltrate ohne akute Zellnekrosen und mit einer geringeren Anzahl an Entzündungszellen gekennzeichnet [123].

2.3.2 Immunhistologie

Die quantitative immunhistologische Entzündungsdiagnostik an Gefrierschnitten von Myokardbiopsien wurde in der Abteilung von Professor Schultheiß zwischen 1986 und 1988 an der Universität München etabliert, an seinen Tätigkeitsstandorten Düsseldorf und Berlin fortgeführt und 2003 vom IKDT übernommen.

Für die immunhistologische Untersuchung wurde ein weiterer Anteil der Gewebeproben in Tissue Tec (SLEE Medical) eingelassen und sofort schockgefroren. Hierfür wurde durch flüssigen Stickstoff gekühltes Methylbutan verwendet. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Die eingebetteten Proben wurden serienmäßig in Gefrierschnitte von $5\mu\text{m}$ Dicke geschnitten und anschließend mit 10%-igem poly-L-Lysine bedeckt.

Eine MK wird nach den Kriterien von Maisch et al. wie folgt definiert: „Für die Diagnose „Myokarditis“ wird ein Minimum von 14 Leukozyten/ mm^2 , bestehend aus T-Lymphozyten (CD3) oder aktivierten T-Lymphozyten (zum Beispiel CD45R0), gefordert (allerdings dürfen bis zu 4 Makrophagen eingeschlossen werden). Ein fokal entzündlicher Prozess wird beschrieben, wenn sich mindestens drei Lymphozyten in einem Nest außerhalb von Gefäßen befinden (...)“ [124]. Gefrier- und Paraffinschnitte dienen als Grundlage für die Definition von Maisch et al. Das IKDT analysierte die Gewebeschnitte anhand der in der Tabelle 2 aufgeführten Grenzwerte. Es untersuchte die Gefrierschnitte per Clusterdifferenzierung auf folgende Entzündungszellen, die per quantitativer digitaler Bildanalyse ausgezählt wurden:

Phänotyp	Grenzwert	Verdünnung	Hersteller
CD3 ⁺	14	1:25	Dako
CD45RO ⁺	40	1:25	Dako
Beta-Integrin-Rezeptor LFA-1 ⁺	14	1:250	Immuno Tools
Perforin ⁺	2,9	1:150	Bioscience
Mac-1 ⁺	40	1:500	Immuno Tools

Tabelle 2: Analyse Entzündungszellen

Die aktuellen Grenzwerte wurden vom IKDT anhand Spenderherzproben ermittelt; **Grenzwert:** Medianwert der Zellzählung (Zellen/mm²)

Zur Signalamplifikation wurde ein Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper verwendet (Anti-Maus Antikörper, EnVision, Dako Cytomation). Zur Visualisierung der immunhistologischen Schnitte wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Merck) als chromogenes Substrat verwendet. Zuletzt wurden die Schnitte mit Hämatoxylin eingefärbt und in Kaiser´s Gelatine R (Merck) eingebettet.

2.3.3 Extraktion und Detektion von Virusgenomen

Die verbliebenen Gewebeproben wurden zur Virusdiagnostik verwendet. Zum Ausschluss des Vorliegens anderer Viren wurde eine PCR/quantitative Reverse Transkriptase PCR durchgeführt (auf EV, ADV [125], HHV6 [126], ZMV [127], EBV [128]) [1,24]. Um eine systemische virale Infektion auszuschließen, wurde DNA aus 0,5ml peripherem Blut extrahiert [1,129]. Als interne Kontrolle einer erfolgreichen Nukleinsäureextraktion (DNA/mRNA) wurden Primer für das humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasegen verwendet [1,24].

Das Verfahren zur Detektion von B19V-DNA war identisch zum bereits 2008 von Kühl et al. beschriebenen Vorgehen [129]: Durch Puregene Mousetail-Kits (Gentra, Minneapolis, USA) wurde genomische DNA aus den Endomyokardbiopsien extrahiert. Aufgrund der geringen DNA-Mengen wurde zunächst mit Primern für die kodierende Sequenz von VP1/2 (siehe Tabelle 3) eine nested PCR durchgeführt. Die spezifischen B19V-Primer erzeugten Produkte von 290 bzw. 173 Basenpaaren Größe. Die Spezifität der Produkte wurde durch Sequenzierung überprüft. Die erhaltenen Sequenzen wurden über die NCBI GenBank abgestimmt und mit einem aktuellen PVB19-Genom abgeglichen (GenBank Identifikationsnummer: AY386330). Als interne Kontrolle einer

erfolgreichen Nukleinsäureextraktion (DNA) wurden Primer für das humane beta-Actin-Gen verwendet. Die restlichen Primer wurden, mit Ausnahme der TaqMan-PCR-Probe SPV (s.u.), von TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) erworben. Mittels nested PCR und zwei neuen Primerpaaren (siehe Tabelle 3) erfolgte die Amplifikation eines 664 Basenpaare langen PCR-Fragments mit anschließender Sequenzierung eines 553 Basenpaaren langen PCR-Produktes. Der PCR-Ablauf war wie folgt: Initiale Denaturierung für 7 Minuten bei 95°C; 35 Dreischritt-Zyklen (45s bei 95°C, 45s bei 57°C, 45s bei 72°C). Die nested PCR wurde mit 40 Zyklen und unter den gleichen Temperaturen durchgeführt.

Anschließend wurde zur quantitativen Bestimmung der Viruslast eine quantitative-PCR (qPCR) durchgeführt. Um einen Vergleich von qualitativen nested PCR und quantitativen Werten zu ermöglichen, wurden Primer und Proben für eine Erythrovirus-TaqMan-qPCR im nested-PCR Sequenzfragment konstruiert (siehe Tabelle 3). Die Primer wurden mit der Software Primer Express (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) designt. Das gewählte Primerpaar amplifizierte ein 70 Basenpaare großes Fragment in der VP1/2-Genregion des B19V-Genoms. Für den PCR Mix wurde der Universal Mastermix von Applied Biosystems verwendet. Die verwendeten Primerkonzentrationen pro Probe waren 0,2µM auf 4µl Proben-DNA. Der PCR-Ablauf war hier wie folgt: N-Glycosylase-Behandlung bei 50°C für 2 Minuten und initiale Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C. Durchführung von 38 Zweischritt-Zyklen (15s bei 95°C, 60s bei 57°C). Verwendet wurde die qPCR-Maschine ABI-Prism HT7900.

Zur Generierung einer Standardkurve wurde bei jeder qPCR eine serielle Verdünnung des B19V-DNA-Plasmidstandards ($3,5 - 3,5 \times 10^4$ Genome pro Experiment, Genexpress, Berlin, Deutschland) simultan mitgeführt. Der Virusgehalt wurde aus dem Verhältnis zwischen gemessenen DNA-Kopien und der Menge an humaner DNA in der Probe bestimmt (gemessen durch UV-Spektroskopie) [129] (Übersetzung durch die Autorin).

Nicht bei allen 32 positiv auf B19V getesteten Proben konnte die B19V-DNA-Kopienanzahl quantitativ bestimmt werden. Die gemessenen Werte lagen unterhalb des linearen Titrationsbereiches und waren damit nicht mehr vom Hintergrundsignal zu unterscheiden.

Primer	Sequenz (5`-3`)	Genbank
Diagnostik nested PCR		
PVB1 (forward 1. PCR)	AGC ATG TGG AGT GAG GGG GC	VP1 Gen
PVB2 (reverse 1. PCR)	AAA GCA TCA GGA GCT ATA CTT CC	VP2 Gen
PVB3 (forward nested)	GCC AAC TCT GTA ACT TGT AC	VP1 Gen
PVB4 (reverse nested)	AAA TAT CTC CAT GGG GTT GAG	VP2 Gen
Lange nested PCR		
PVB5	TAC CCG GTA CTA ACT ATG TTG G	VP1 Gen
PVB6	CTG GCA ATG AGC TAC AAG CTG	VP1 Gen
TaqMan PCR		
Forward Primer	CAT TTT CCA GAC AGT TTT TAA TTC CA	
Reverse Primer	CTT GCT GCG GGA GAA AAC AC	
MGB Probe	FAM-ATG ACC CAG AGC ACC-MGB	

Tabelle 3: Primer

Diagnostik nested PCR	Gen	Produkt
PVB1/PVB2	VP1/VP2 Gen PVB19	290 bp
PVB3/PVB4	VP1/VP2 Gen PVB19	173bp
Lange nested PCR		
PVB5/PVB2	VP1/VP2 Gen PVB19	664 bp
PVB6/PVB4	VP1/VP2 Gen PVB19	553 bp

Tabelle 4: Amplifikationskombination

3.3.4 Extraktion und Detektion von B19V-mRNA

Die Extraktion und Analyse der B19V-mRNA wurde ebenfalls vom IKDT durchgeführt und entsprach weitestgehend dem bereits 2013 von Kühl et al. [130] veröffentlichten Vorgehen: Mittels TRIzol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde die B19V-mRNA isoliert. Um Spuren von genomischer DNA zu entfernen, erfolgte eine DNase-Behandlung (PeqLab, Deutschland). Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mittels Reverser Transkriptase und „Random Priming“ (High capacity Kit: Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Anzahl viraler Kopien in der cDNA wurde durch real-time-PCR bestimmt (TaqMan Universal PCR master mix: Applied

Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Um die qualitativen nested-PCR-Ergebnisse mit den quantitativen Werten vergleichen zu können, wurden die Primer und Sonden für die Erythrovirus TaqMan qPCR im nested-PCR-Sequenzfragment designt. Die Primer und die minor groove binding site (MGB) Sonde SPV wurden nach den gängigen Regeln durch die Primer Express-Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) ausgewählt (siehe Tabelle 3). Die TaqMan-PCR wurde auf 96-well Microtiterplatten (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Der PCR-Mix wurde auf ein Volumen von 25µl aufgefüllt (TaqMan Universal Mastermix: Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Konzentration pro Versuch an Forward-, Reverse-Primern und der fluoreszierenden Sonde lag bei 0,2µM. Diese wurde mit 0,4µl Proben-DNA oder -cDNA vermischt. Eine Uracil-N-Glykosylase-Behandlung wurde für 2min bei 50°C durchgeführt. Die Denaturierung fand bei 95°C für 10min statt. Die Amplifizierung der DNA wurde wie folgt durchgeführt: 40 Zweischnitt-Zyklen (15s bei 95°C und 1min bei 57°C) unter Verwendung des ABI Prism 7900HT Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Zum Erhalt einer Standardkurve und Berechnung der mRNA-Kopien wurde wie bereits bei der DNA beschrieben vorgegangen (siehe 2.3.3). Die Anzahl der mRNA-Kopien wurde in Kopien pro µl Reaktionsassay angegeben. Es erfolgte eine Normalisierung auf die in jeder Probe mitvermessene humane Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-cDNA im Verhältnis zu einer jeweils mitgeführten humanen Kontroll-RNA-Probe (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) [130] (Übersetzung durch die Autorin). Der Nachweis von B19V-mRNA bedeutet, dass VP1 und 2 transkribiert werden. Ob darüber hinaus in jedem Fall eine Translation stattfindet, ist bisher fraglich. In dieser Promotion deklariert eine „positiv“ bezeichnete Biopsie den Nachweis von B19V-mRNA, „negativ“ dagegen die Biopsien, bei denen keine B19V-mRNA nachgewiesen wurde. „B19V-mRNA-positiv/negativ“ bedeutet somit, dass nur in der ersten Biopsie mRNA nachgewiesen werden konnte. Bei 9 Patienten (B19V-mRNA n.b.) wurde zu keinem Zeitpunkt das Vorhandensein von mRNA untersucht. Die Gründe hierfür waren aus den vorliegenden Datensätzen nicht ersichtlich.

2.4 Statistische Analyse

Zur Datenanalyse wurden SPSS (IBM SPSS Statistics 24) und Excel (Microsoft 2010) verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mit SPSS. Bei allen Testverfahren wurde ein p-Wert (2-seitig) $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

Es wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Aufgrund der Sensibilität des arithmetischen Mittels gegenüber Ausreißern, wurde zusätzlich der Median bestimmt. Die Medianwerte wurden zusammen mit Minimum, Maximum und Quantile (10%, 25%, 75% und 90%) angegeben.

Wenn, wie im Fall der LVEF, keine Normalverteilung vorlag, wurden parameterfreie Tests zur Analyse herangezogen. Die statistische Analyse der LVEF-Entwicklung zwischen Therapiestart und -ende, innerhalb der Untersuchungsgruppen B19V-positiv und Vneg, wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben durchgeführt. Für die statistische Analyse der LVEF-Daten zwischen den Gruppen B19V-positiv und Vneg wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben verwendet.

Nominelle Variablen wurden mittels Exaktem Fisher Test analysiert. Der Exakte Test nach Fisher ist softwarebedingt (SPSS) auf 2x2 Tabellen begrenzt. Deswegen wurde trotz der z.T. sehr kleinen Zellhäufigkeiten bei der Berechnung der NYHA der Chi²-Test angewendet. Für die statistische Analyse verbundener Stichproben, bei welchen ein dichotomes Merkmal vorlag, wurde der McNemar-Test verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs - Ausgangssituation

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf 52 Patienten mit der Erstdiagnose MK, die sechs Monate immunsuppressiv behandelt wurden. Den Probanden wurde jeweils vor Therapiestart und nach Therapieende eine Myokardbiopsie entnommen sowie u.a. die LVEF bestimmt. Von den 52 Patienten waren 32 (61,5%) B19V-positiv. Anzeichen einer aktiven systemischen B19V-Infektion lagen nicht vor. Die verbleibenden 20 Patienten (38,5%) bildeten das virusnegative Kontrollkollektiv (Vneg). Während des Therapiezeitraumes verstarb kein Patient.

Das Durchschnittsalter aller Patienten betrug zu Therapiebeginn $44,19 \pm 14,01$ und zu Therapieende: $45,06 \pm 14,0$ Jahre.

Sowohl in der Gruppe der B19V-positiven als auch in der Gruppe der virusnegativen Patienten überwog der Anteil an männlichen Probanden. Weder in Hinblick auf das Geschlecht noch auf das Alter bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen.

Die folgende Tabelle führt die Ausgangssituation aller Patienten auf:

		B19V (%)	Vneg (%)	Gesamt (%)	p-Wert
Patientenanzahl		32 (61,5)	20 (38,5)	52 (100,0)	
Geschlecht					0,370
	männlich	19 (59,4)	15 (75,0)	34 (65,4)	
	weiblich	13 (40,6)	5 (25,0)	18 (34,5)	
Alter (Mittelwert)		43,78 ± 13,94	44,85 ± 14,47	44,19 ± 14,01	0,553
klinische Diagnose					0,588
	DKM	8 (25,0)	4 (20,0)	12 (23,1)	
	MK	19 (59,38)	13 (65,0)	32 (61,5)	
	MKa	4 (12,5)	1 (5,0)	5 (9,6)	
	andere	1 (3,13)	2 (10,0)	3 (5,8)	
Diagnose nach Biopsie					0,485
	DKM	3 (9,38)	3 (15,0)	6 (11,5)	
	DKMe	8 (25,0)	4 (20,0)	12 (23,1)	
	MKa	4 (12,5)	1 (5,0)	5 (9,6)	
	MK-BL	13 (40,63)	8 (40,0)	21 (40,4)	
	andere	4 (12,5)	4 (20,0)	8 (15,3)	
grippaler Infekt vor Therapie		22 (68,75)	14 (70,0)	36 (73,47)	0,743
LVEF (%)		40,53 ± 15,83	44,2 ± 18,52	41,94 ± 16,83	0,480
LVEDD (mm) (Mittelwerte)		58,13 ± 09,75	57,72 ± 10,3	57,89 ± 09,85	0,957
LVESD (mm)		44,30 ± 13,57	45,31 ± 12,69	44,64 ± 13,08	0,697

		B19V (%)	Vneg (%)	Gesamt (%)	p-Wert
NYHA-Klassen					0,657
	I und II	16 (59,26)	9 (52,94)	25 (56,82)	-
III und IV	11 (40,74)	8 (47,06)	19 (43,18)		
Entzündung Myokard		32 (100,0)	20 (100,0)	52 (100,0)	≥ 0,999
Medikation (Patientenanzahl in %)	ACE-Hemmer	62,5	60,0	61,54	≥ 0,999
	Aldosteron-Anta.	50,0	50,0	50,0	≥ 0,999
	AT ₁ -Anta.	15,63	0,0	9,62	0,143
	Antiarrhythmikum	9,38	10,0	9,61	≥ 0,999
	ASS	37,5	20,0	30,77	0,228
	Beta-blocker	68,76	60,0	65,38	0,561
	Ca-Anta.	6,25	0,0	3,85	0,517
	CSE-Hemmer	12,50	15,0	13,46	≥ 0,999
	Digitalis	18,75	10,0	15,38	0,463
	Thiazid-diuretikum	56,25	45,0	51,92	0,570
	Schleifen-diretikum	6,25	0,0	3,85	0,517
	Marcumar	21,88	15,0	19,23	0,722

Tabelle 5: Patientenausgangssituation – Zusammenfassung aller Parameter

Legende: Ausgangssituation zu Therapiestart; **B19V**: Parvovirus B19-positive Patienten, **Vneg**: virusnegative Patienten; **p-Wert**: Ergebnisse der statistischen Analyse zwischen B19V-positiven und Vneg Patienten, verwendete Tests: McNemar-Test (Histologie), Exakter Test nach Fisher (Medikation), Chi²-Test (NYHA-Klassen) und parameterfreier Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; **Alter**: Mittelwert, zu Therapiebeginn in Jahren; **Grippaler Infekt vor Therapie**: im Vorfeld der Erkrankung aufgetretene Grippe, (N = 36); **Diagnose**: **DKM** = dilatative Kardiomyopathie, **MK** = Myokarditis, **MK-BL** = Borderline-Myokarditis, **a** = akut, **e** = entzündliche, **andere** = keine Angaben, Granulomatose mit Polyangiitis und Riesenzellmyokarditis; **klinische Diagnose**: gestellte Diagnose anhand klinischer Diagnostikverfahren (B19V-positiv N = 30, Vneg N = 17); **Diagnose nach Biopsie**: Diagnose auf Grundlage der analysierten Gewebebiopsie (B19V-positiv N = 30, Vneg N = 17); **LVEF**: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion in % (B19V-positiv N = 32, Vneg N = 20); **LVEDD**: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser in mm (B19V-positiv N = 30, Vneg N = 18), **LVESD**: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser in mm (B19V-positiv N = 23, Vneg N = 13); **NYHA-Klasse**: Anteil an Patienten der NYHA-Klasse I und II sowie III und IV in % (B19V-positiv N = 27, Vneg N = 17); **Entzündung Myokard**: prozentualer Anteil an Patienten, bei welchen eine Entzündung nachgewiesen wurde; **Medikation**: Anzahl der Patienten nach medikamentöser Einstellung in % (B19V N = 32, Vneg N = 20), die die aufgeführten Medikamente erhalten haben, **Anta.** = Antagonist, **ACE** = Angiotensin-Converting-Enzym, **AT** = Angiotensin, **ASS** = Acetylsalicylsäure, **Ca** = Kalzium, **CSE** = Cholesterin-Synthese-Enzym (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer)

3.2. Untersuchungsergebnisse

3.2.1 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Innerhalb der Gruppen B19V-positiv und Vneg verbesserten sich die LVEF zwischen Therapiestart und -ende signifikant (p-Werte: < 0,001 bei B19V-positiv und 0,003 bei Vneg) (siehe Tabelle 6).

Sowohl zu Therapiestart als auch zu Therapieende unterschieden sich die Ergebnisse der Analysen zwischen den B19V-positiven und virusnegativen Patienten nicht signifikant (p = 0,480 und p = 0,880). Ein p-Wert (2-seitig) ≤ 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3.2.1.1 LVEF – Patienten gesamt

Die statistische Analyse des gesamten Patientenkollektivs mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben ergab eine signifikante Steigerung der LVEF (p-Wert < 0,001). Die minimal gemessene LVEF betrug 18,0%, die maximale 75,0%. Bei Therapieende lag die niedrigste gemessene LVEF bei 11,0%, die höchste bei 77,0%. Die nachfolgenden zwei Graphiken zeigen die LVEF aller Patienten zu Beginn und nach Ende der immunsuppressiven Therapie (siehe auch: Abbildung 4).

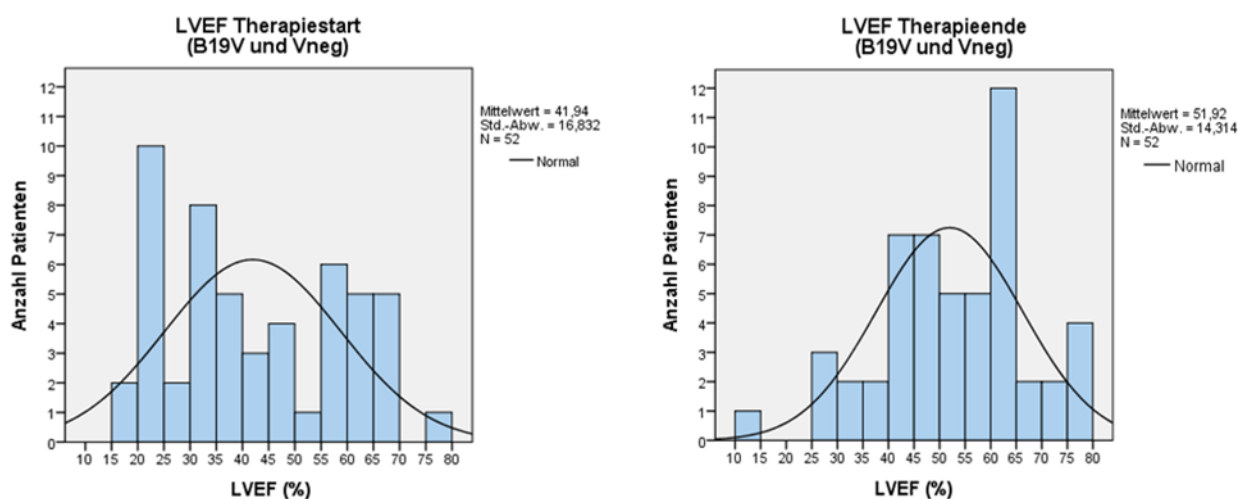


Abbildung 3: LVEF zu Therapiestart und -ende (gesamtes Patientenkollektiv)

Legende: LVEF in Prozent zu Therapiestart und -ende, B19V-positive und virusnegative (Vneg) Patienten; **Std.-Abw.:** Standardabweichung; — **Normal:** Normalverteilung; **N:** Anzahl Patienten

3.2.1.2 LVEF – B19V-positive versus virusnegative Patienten

In beiden Untersuchungsgruppen wurde nach der sechsmonatigen immunsuppressiven Therapie eine signifikante Verbesserung der LVEF verzeichnet. Die durchschnittliche LVEF des virusnegativen Kontrollkollektivs verbesserte sich geringer als die der B19V-positiven Patienten. Wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist, bestand weder zu Therapiestart noch zu Therapieende ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei untersuchten Patientengruppen.

	LVEF (%) Therapie- START	LVEF (%) Therapie- ENDE	p-Wert 1	p-Wert 2
virusnegativ	44,20 ± 18,52	51,85 ± 16,91	0,003	Therapiestart: 0,480 Therapieende: 0,880
B19V-positiv	40,53 ± 15,83	51,97 ± 12,72	< 0,001	

Tabelle 6: LVEF – statistische Analyse (B19V-positive & virusnegative Patienten)

Legende: LVEF-Mittelwerte und Standardabweichungen (±) zu Therapiestart und -ende in Prozent sowie Berechnung der statistischen Signifikanz

LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion in %; **B19V-positiv:** Parvovirus B19-positive Patienten (N = 32);

virusnegativ: Kontrollkollektiv ohne Virusnachweis (N = 20);

p-Wert 1: innerhalb der Gruppen zwischen Therapiestart und -ende; mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben (asymptomatische Signifikanz (2-seitiger Test)) berechnet;

p-Wert 2: zwischen den Gruppen zu Therapiestart und -ende; mittels Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben (asymptomatische Signifikanz (2-seitiger Test)) berechnet;

37,5% der B19V-positiven Patienten und 40,0% der virusnegativen Patienten wiesen vor Start der immunsuppressiven Therapie eine hochgradig eingeschränkte (< 35,0%) linksventrikuläre Ejektionsfraktion auf (p-Wert = 0,792). Zu Therapieende hatten noch 9,38% der B19V-positiven und 15,0% der virusnegativen Patienten eine hochgradig eingeschränkte LVEF (p-Wert ≥ 0,999).

Die folgenden Graphen zeigen für die Gruppen B19V-positive und Vneg Patienten jeweils die Verteilung und Entwicklung der LVEF zu Therapiestart und -ende, innerhalb und zwischen den Gruppen auf.

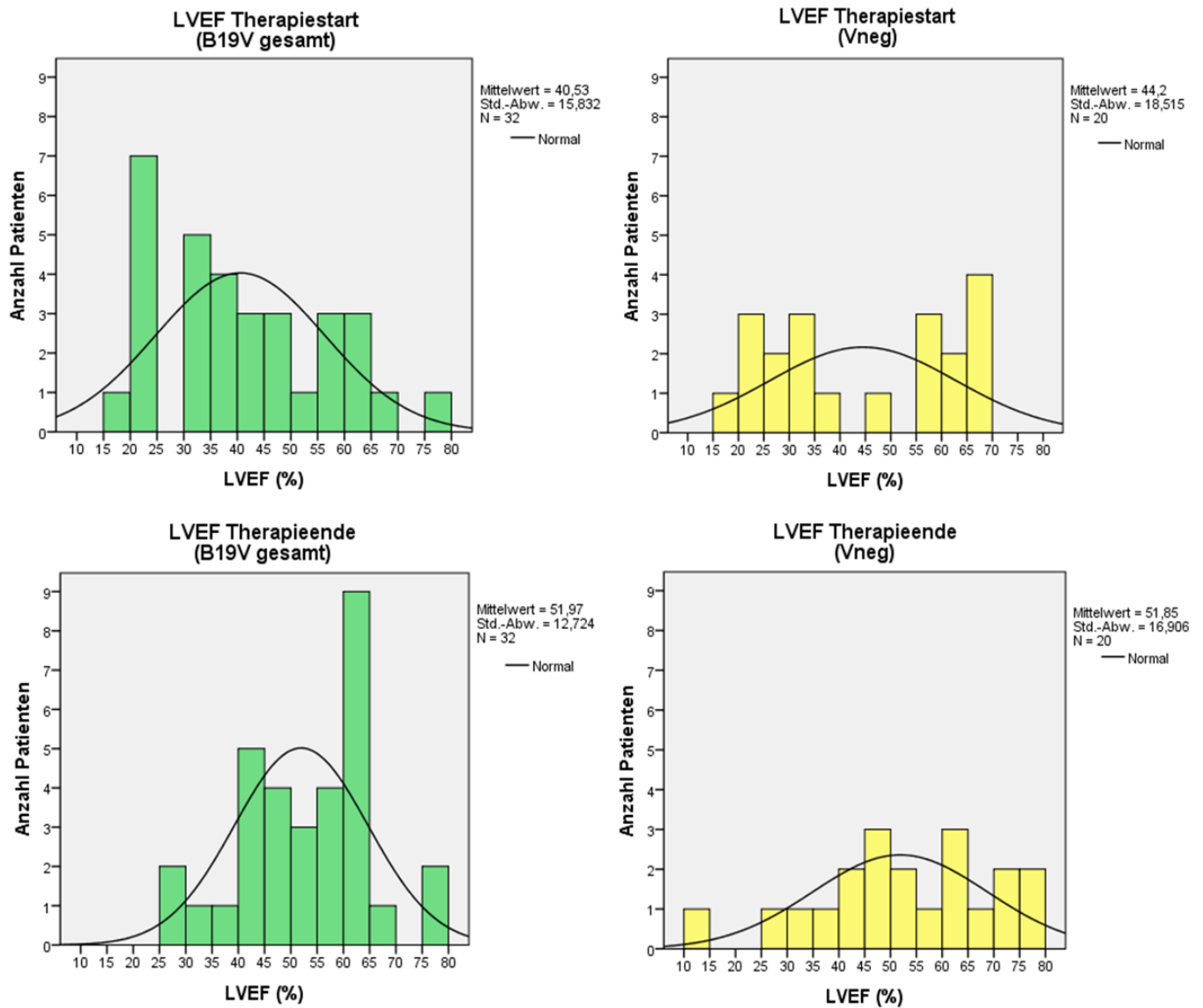


Abbildung 4: LVEF zu Therapiestart und -ende B19V und Vneg

Legende: LVEF zu Therapiestart (oben) und -ende (unten) in Prozent; links/grün B19V und rechts/gelb virusnegative (Vneg) Patienten; Mittelwert mit **Std.-Abw.:** Standardabweichung; — **Normal:** Normalverteilung; **N:** Anzahl Patienten; 20 Vneg und 32 B19V

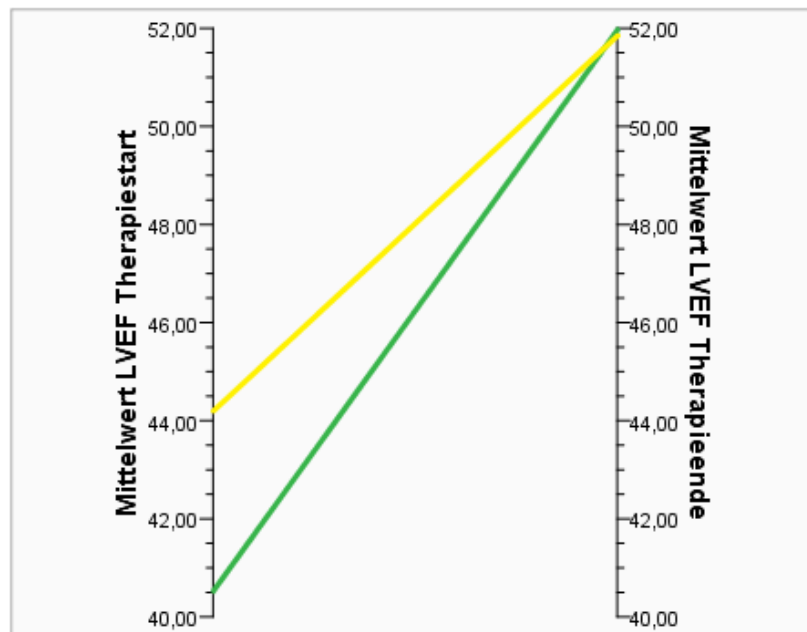


Abbildung 5: Entwicklung durchschnittlicher LVEF (B19V-positive vs. virusnegative Patienten)

Legende: Entwicklung der durchschnittlichen LVEF des B19V-positiven (grün/Start: 40,53%) und virusnegativen (gelb/Start: 44,2%) Patientenkollektivs in Prozent; p-Werte = 0,480 (Therapiestart) und 0,880 (Therapieende); siehe auch Tabelle 6

Zwischen der ersten Messung zu Therapiestart und der zweiten Messung zu Therapieende verschlechterte sich bei 6 B19V-positiven Patienten (18,75%) die LVEF um Werte zwischen 2,0% und 14,0%. Bei einem Patienten trat keine Veränderung ein. Der maximale LVEF-Anstieg betrug 34,0% (von 24,0% auf 58,0%).

In der Gruppe der virusnegativen Patienten verschlechterten sich drei Patienten (15,0%) hinsichtlich ihrer LVEF-Werte zwischen Therapiestart und -ende. Die Werte lagen zwischen 1,0% und 8,0%. Bei einem Patienten war die LVEF zu beiden Messzeitpunkten identisch. Die maximale LVEF-Verbesserung betrug in der Gruppe des Vneg Kontrollkollektivs 32,0% (von 20,0% auf 52,0%).

Bei der alleinigen Betrachtung der Differenzen der LVEF-Medianwerte (Therapiestart/-ende) ist in der Gruppe der B19V-positiven Patienten ein Anstieg von 17,0% und bei den Vneg Patienten ein Anstieg von 9,5% zu erkennen.

Start	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
B19V	18,0	21,0	25,5	37,5	54,8	63,0	75,0
Vneg	19,0	20,2	26,5	42,0	62,3	67,8	69,0

Ende	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
B19V	26,0	32,1	42,3	54,5	60,8	66,8	77,0
Vneg	11,0	28,6	43,3	51,5	65,5	74,8	77,0

Tabelle 7: LVEF – Messergebnisse

Legende: LVEF zum Therapiestart und -ende in Prozent; B19V-positive und virusnegative (Vneg) Patienten; Minimum, Maximum, Median, Quantile; N = 52

3.2.2 LVEDD und LVESD

Im Rahmen der Diagnostik wurden die linksventrikulären enddiastolischen (LVEDD) und linksventrikulären endsystolischen (LVESD) Durchmesser bestimmt.

		B19V	Vneg	p-Wert
LVEDD	Start	58,13 ± 09,75 (30)	57,72 ± 10,3 (18)	0,957
	Ende	52,92 ± 09,89 (26)	55,53 ± 11,75 (15)	0,265
<i>p-Wert</i>		0,999 (24)	0,488 (14)	
LVESD	Start	44,30 ± 13,57 (23)	45,31 ± 12,69 (13)	0,697
	Ende	41,56 ± 13,05 (18)	44,33 ± 14,27 (12)	0,787
<i>p-Wert</i>		0,059 (16)	zu kleine Fallzahl	

Tabelle 8: LVEDD und LVESD – Statistische Analyse

Legende: Mittelwerte der linksventrikulären enddiastolischen (LVEDD) und linksventrikulären endsystolischen (LVESD) Durchmesser zu Therapiestart und -ende in mm;

in Klammern „()“ = Anzahl aller Patienten, bei denen eine Bestimmung des Untersuchungsparameters stattfand; beim *p-Wert* in Klammern „()“ = Anzahl an Patienten bei denen zu Therapiestart und -ende Ergebnisse für die Berechnung vorlagen; **p-Wert:** Berechnung mittels Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben (parameterfreier Test); **p-Wert:** Berechnung innerhalb der Gruppen mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B19V-positiv und Vneg vorlag.

Die Abnahme des LVEDD und LVESD innerhalb der Gruppen war im Laufe der Therapie nicht signifikant.

Start	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
B19V	40,0	43,3	51,8	58,0	63,0	73,9	82,0
Vneg	43,0	43,9	48,8	56,5	65,3	75,3	78,0

Ende	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
B19V	35,0	41,5	48,0	51,0	57,5	72,9	76,0
Vneg	37,0	38,8	45,0	55,0	61,0	76,8	78,0

Tabelle 9: LVEDD – Messergebnisse

Legende: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) zu Therapiestart (N = 30 bei B19V; N = 18 bei virusnegativen (Vneg) Patienten und -ende (N = 26 bei B19V; N = 15 bei Vneg) in mm; Minimum, Maximum, Median, Quantile

Start	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
B19V	24,0	26,2	34,0	44,0	51,0	68,6	71,0
Vneg	26,0	28,0	33,5	45,0	56,5	65,2	70,0

Ende	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
B19V	21,0	27,3	31,8	40,0	45,8	65,2	67,0
Vneg	27,0	27,6	31,8	42,0	57,5	67,9	70,0

Tabelle 10: LVESD – Messergebnisse

Legende: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVESD) zu Therapiestart (N = 23 bei B19V; N = 13 bei virusnegativen (Vneg) Patienten) und -ende (N = 18 bei B19V; N = 12 bei Vneg) in mm; Minimum, Maximum, Median, Quantile

3.2.3 B19V-DNA und B19V-mRNA-Kopienanzahl

Im folgenden Textabschnitt werden die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Kopien von B19V-DNA und B19V-mRNA aufgeführt.

3.2.3.1 B19V-DNA-Kopienanzahl

	Therapiestart	Therapieende
Minimum Kopien	5,0	10,0
Maximum Kopien	9800,0	848,0
Median	62,0	105,0
Mittelwert und Standardabweichung	708,85 ± 2097,32	200,00 ± 239,05

Tabelle 11: Entwicklung B19V-DNA-Kopienanzahl

Legende: Quantitativ bestimmte B19V-DNA-Kopien vor Therapiestart und nach Therapieende; Werte von Minimum, Maximum, Median und Mittelwert mit Standardabweichung beziehen sich auf die Patientenzahlen N = 26 (Start) und N = 14 (Ende)³

Bei allen B19V-positiven Patienten wurde zu Therapiestart und -ende B19V-DNA nachgewiesen. Eine quantitative Bestimmung konnte nur bei 14 Patienten erfolgen. Die gemessenen Werte der übrigen Patienten lagen unterhalb des linearen Titrationsbereiches und waren somit nicht mehr vom Hintergrundsignal zu unterscheiden.

Die in der zweiten Biopsie (Therapieende) gemessene B19V-DNA-Kopienanzahl stieg bei 57,14% und sank bei 42,85% der Patienten. Das Ergebnis der parameterfreien statistischen Analyse dieser 14 Patienten durch den Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben, hinsichtlich der DNA-Kopienanzahl, war nicht signifikant ($p = 0,551$), wohingegen sich die LVEF der 14 Patienten zwischen Therapiestart und -ende signifikant verbesserte ($p = 0,014$).

Bei einem Patienten nahm die Kopienanzahl von 5047,0 Kopien zu Therapiestart auf 510,0 Kopien zu Therapieende ab. Bei den anderen 13 Patienten betrug die Differenz zwischen den zwei ermittelten Kopienanzahlen zwischen 4 und 306 Kopien (im Mittel 159,46 Kopien).

³ Bei allen anderen B19V-Patienten konnte keine quantitative B19V-DNA-Kopienanzahl bestimmt werden bzw. lagen die gemessenen Werte unterhalb des linearen Titrationsbereiches

3.2.3.2 B19V-mRNA-Kopienanzahl

Unter Berücksichtigung der Biopsieergebnisse zu Therapiestart und -ende ergab sich nachfolgende Einteilung der auf B19V-mRNA getesteten Patienten.

Biopsieergebnis 1/2	Anzahl	Prozent
B19V-mRNA negativ/n.b.	7	21,88
B19V-mRNA negativ/negativ	7	21,88
B19V-mRNA negativ/positiv	5	15,63
B19V-mRNA positiv/n.b.	1	3,13
B19V-mRNA positiv/negativ	2	6,25
B19V-mRNA positiv/positiv	1	3,13
B19V-mRNA n.b./n.b.	9	28,13

Tabelle 12: Einteilung nach der B19V-mRNA-Kopienbestimmung (1. und 2. Biopsie)

negativ: kein mRNA-Nachweis; **positiv:** mRNA-Nachweis; **n.b.:** nicht bestimmt;

Bei vier Patienten wurden vor Therapieanfang und bei sechs Patienten nach Therapieende B19V-mRNA-Kopien im Gewebe nachgewiesen (bei einem Patienten davon zu beiden Zeitpunkten).

	Therapiestart	Therapieende
Minimum Kopien	15,0	15,0
Maximum Kopien	2018,0	538,0
Median	117,5	116,5
Mittelwert und Standardabweichung	98,61 ± 420,45	66,73 ± 143,34

Tabelle 13: Entwicklung B19V-mRNA-Kopienanzahl

Legende: Quantitativ bestimmte B19V-mRNA-Kopien zu Therapiestart und zu Therapieende; Werte von Minimum, Maximum, Median und Mittelwert mit Standardabweichung beziehen sich auf die Patientenzahlen N = 4 (Start) und N = 6 (Ende)

3.2.4 Histologische und immunhistologische Auswertung

Die folgende Tabelle zeigt auf, bei wie vielen Patienten vor und nach der Therapie eine myokardiale Entzündung nachgewiesen werden konnte.

	Entzündung	B19V in % (N)	Vneg in % (N)	gesamt in % (N)	p-Wert ¹
Start					-
	positiv	100 (32)	100 (20)	100 (52)	
	negativ	0	0	0	
Ende					0,569
	positiv	59,38 (19)	60,0 (12)	59,62 (31)	
	negativ	37,5 (12)	35,0 (7)	36,54 (19)	
	keine Angaben	3,13 (1)	5,0 (1)	3,85 (2)	
	p-Wert²	< 0,001	0,016	< 0,001	

Tabelle 14: Entzündungsnachweis – histologische Auswertung

Legende: Prozentualer Anteil B19V-positiver und virusnegativer (Vneg) Patienten mit myokardialer Entzündung zu Therapiestart und -ende; **p-Wert¹**: zwischen B19V-positiven und virusnegativen Patienten zu Therapieende mittels McNemar-Test; **p-Wert²**: statistische Analyse mittels McNemar-Test bei verbundenen Stichproben innerhalb der Gruppen B19V und Vneg bzw. dem gesamten Patientenkollektiv; **N** = 32 B19V-positiv und 20 virusnegative Patienten

Bei der immunhistologischen Untersuchung wurden die Biopsien von Therapiestart und -ende auf Entzündungsmarker wie CD3⁺, CD45R0⁺, LFA-1⁺, Mac-1⁺ und Perforin⁺ hin untersucht. Aufgrund der kleinen Fallzahlen wurde hier nur eine deskriptive Analyse zur Entwicklung der einzelnen Entzündungsmarker durchgeführt. Zu Therapieende wurden bei der immunhistologischen Untersuchung der B19V-Biopsien meistens weniger Entzündungsmarker gefunden als zu Therapiestart. Bei alleiniger Betrachtung der Medianwerte ist zu erkennen, dass sie bei allen Entzündungsmarkern zu Therapieende abgenommen haben. Bei den virusnegativen Patienten lagen mit Ausnahme der

Perforinmessungen die Mittel- und Medianwerte zu Therapieende unter denen zu Therapiestart.

B19V-positive Patienten										
	CD3 ⁺ Start	CD3 ⁺ Ende	LFA-1 ⁺ Start	LFA-1 ⁺ Ende	CD45R0 ⁺ Start	CD45R0 ⁺ Ende	Perforin ⁺ Start	Perforin ⁺ Ende	Mac-1 ⁺ Start	Mac-1 ⁺ Ende
N	28	18	23	14	28	17	23	15	23	14
Mittelwert	16,43	6,71	42,13	16,34	51,26	19,93	2,60	0,93	61,20	29,73
Median	10,1	5,66	32,9	12,39	38,8	13,8	1,3	0,5	47,79	30,23
Standard-abweichung	19,28	5,5	38,99	9,29	64,94	17,9	4,08	1,08	36,61	10,94
Minimum	0,65	0,0	8,4	2,0	0,0	0,71	0,0	0,0	24,36	10,0
Maximum	104,4	18,10	162,8	34,45	357,1	73,46	15,46	3,7	194,0	46,7

virusnegative Patienten										
	CD3 ⁺ Start	CD3 ⁺ Ende	LFA-1 ⁺ Start	LFA-1 ⁺ Ende	CD45R0 ⁺ Start	CD45R0 ⁺ Ende	Perforin ⁺ Start	Perforin ⁺ Ende	Mac-1 ⁺ Start	Mac-1 ⁺ Ende
N	19	13	13	9	17	14	13	9	13	9
Mittelwert	16,30	7,59	64,76	19,6	56,91	15,46	7,78	3,19	87,22	40,1
Median	9,82	5,0	28,1	16,5	23,0	7,86	0,6	2,2	44,4	42,6
Standard-abweichung	19,47	7,23	69,17	13,95	79,48	16,63	20,89	4,11	90,02	25,7
Minimum	2,86	0,0	11,3	3,3	1,07	0,0	0,0	0,0	19,90	5,7
Maximum	87,2	27,8	194,1	40,3	284,2	46,1	76,0	13,4	284,0	86,8

Tabelle 15: Entzündungsmarker – immunhistologische Auswertung

Legende: Durch mikroskopische Gewebeanalyse nachgewiesene Entzündungsmarker (Zellen/mm²); **Start:** vor, **Ende:** nach immunsuppressiver Therapie; **N:** Anzahl an Patienten, bei welchen die entsprechenden Entzündungsmarker nachgewiesen wurden (von insgesamt 32 B19V-positiven und 20 virusnegativen Patienten)

3.2.5 Leitsymptome

Beim Vergleich der Patientengruppen (B19V und Vneg) auf das Vorhandensein der Leitsymptome Angina pectoris, Dyspnoe, Palpitation, Leistungseinschränkung, Müdigkeit (jeweils in Ruhe und unter Belastung) sowie Ödemen vor Therapiestart und nach Therapieende ergab sich kein signifikanter Unterschied (p-Werte zwischen 0,156 und 0,999). Statistisch wurde nur das Vorhandensein, nicht die Ausprägung der Symptome untersucht (siehe 2.1).

Aufgrund einer unzureichenden Befunddokumentation des Symptoms „periphere Ödeme“ konnte diesbezüglich keine statistische Analyse durchgeführt werden. 33 Patienten (22 B19V; 11 Vneg) wurden vor und 14 (nur B19V) nach der Therapie auf periphere Ödeme untersucht.

Die aufgeführten Ergebnisse legen dar, dass es zu Therapieende tendenziell in beiden Gruppen zu einer Abnahme der diagnostizierten Symptome kam.

		Therapiestart gesamt in % (B19V/Vneg)	Therapieende gesamt in % (B19V/Vneg)	p-Werte (Therapiestart/ -ende)
Angina pectoris	Ruhe	19,23 (12,5/30,0)	9,38 (09,38/15,0)	0,156 / 0,664
	Belastung	28,85 (21,88/40,0)	11,54 (12,5/10,0)	0,213 / > 0,999
Dyspnoe	Ruhe	19,23 (21,88/15,0)	7,69 (9,38/5,0)	0,722 / > 0,999
	Belastung	51,92 (59,38/40,0)	40,38 (43,75/35,0)	0,255 / 0,575
Palpitation	Ruhe	19,23 (18,75/20,0)	13,46 (12,50/15,0)	> 0,999/ >0,999
	Belastung	19,23 (25,00/10,0)	17,31 (18,75/15,0)	0,283 /> 0,999
Leistungs- einschränkung	Ruhe	26,92 (31,25/20,0)	15,38 (15,63/15,0)	0,524 / > 0,999
	Belastung	57,69 (65,63/45,0)	48,08 (53,12/20,0)	0,162 / 0,404
Müdigkeit	Ruhe	25,0 (31,25/15,0)	21,15 (21,88/20,0)	0,324 / > 0,999
	Belastung	38,46 (43,75/30,0)	32,29 (31,25/35,0)	0,389 / > 0,999

Tabelle 16: Leitsymptome – prozentuales Auftreten

Legende: Auftreten der Leitsymptome in Prozent zu Therapiestart und -ende; **Einzelwert** „dünn“ **geschrieben**: alle 52 Patienten; **in Klammern unter den Einzelwerten**: prozentualer Anteil B19V-positiver (N = 32) und virusnegativer (N = 20) Patienten; **p-Werte**: Analyse zwischen B19V-positiven und virusnegativen (Vneg) Patienten jeweils zu Therapiestart und -ende mittels Exaktem Test nach Fisher

In der folgenden Tabelle werden die Patienten aufgeführt, bei denen zu Therapieende ein oder mehrere Symptome aufgetreten sind.

		B19V (%)	Vneg (%)	Gesamt (%)
Angina pectoris	Ruhe	2 (6,25)	0	2 (3,85)
	Belastung	2 (6,25)	0	
Dyspnoe	Ruhe	2 (6,25)	0	3 (5,77)
	Belastung	1 (3,13)	0	
Palpitation	Ruhe	4 (12,5)	1 (5,0)	12 (23,08)
	Belastung	5 (15,63)	2 (10,0)	
Leistungseinschränkung	Ruhe	4 (12,5)	2 (10,0)	8 (15,38)
	Belastung	1 (3,13)	1 (5,0)	
Müdigkeit	Ruhe	4 (12,5)	3 (15,0)	11 (21,15)
	Belastung	2 (6,25)	2 (10,0)	

Tabelle 17: Leitsymptome zu Therapieende

Legende: Anzahl der Patienten, bei denen zu Therapieende die aufgeführten Symptome auftraten; zu Therapiestart waren diese Patienten in Hinblick auf die aufgeführten Symptome beschwerdefrei; Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf N = 32 B19V-positive Patienten und N = 20 virusnegative Patienten (Vneg)

3.2.6 NYHA-Klassifikation

Auch beim Zusammenlegen der NYHA-Klassen I und II sowie III und IV blieben die Fallzahlen in den Gruppen so klein, dass lediglich eine deskriptive Analyse durchgeführt werden konnte.

Der größte Anteil aller Patienten wies vor der Therapie die Symptomatik der NYHA-Klassen II und III auf (II: 43,18%, III: 40,91%). Zu Therapieende überwogen vor allem in der B19V-Gruppe die Symptome einer NYHA-Klasse II (II: 57,5%, III: 25,0%). Zu sechs Patienten existierten weder zu Therapieanfang noch -ende Daten zur NYHA-Klasse. Bei weiteren sechs Patienten lagen nur zu Therapiestart und bei zwei nur zu Therapieende Informationen zur NYHA-Klassifikation vor.

		B19V (%)	Vneg (%)
NYHA-Klasse	verbessert	5* (20,83)	2 (16,67)
	verschlechtert	5 (20,83)	3 (25,0)
	gleich geblieben	14 (58,33)	7 (58,33)

Tabelle 18: NYHA-Klassen – Entwicklung

Legende: Patienten, deren NYHA-Klasse zu Therapiestart und -ende analysiert wurden; **verbessert/verschlechtert**: jeweils um eine NYHA-Klasse; *: ein Patient verbesserte sich um 2 NYHA-Klassen; Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Probandenanzahl N innerhalb einer Gruppe (N = 24 B19V-positive und 12 virusnegative (Vneg) Patienten)

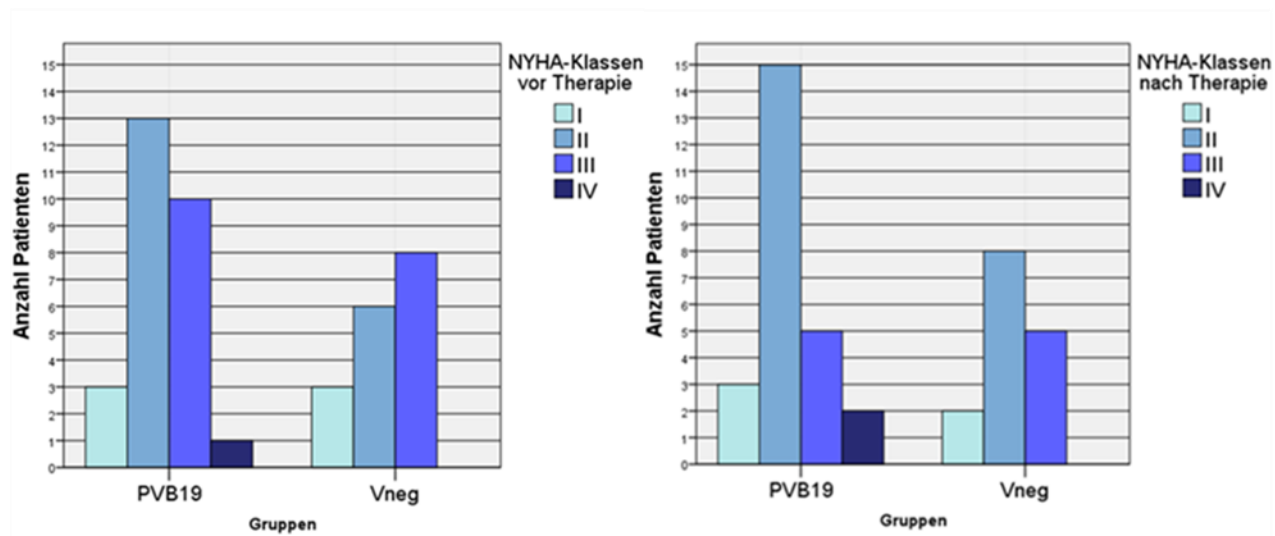


Abbildung 6: NYHA-Klassen zu Therapiestart und -ende

Legende: NYHA-Klassen zu Therapieanfang (links) und -ende (rechts); N = 44 (27 B19V-positive, 17 virusnegative (Vneg) Patienten) zu Therapieanfang und 40 (25 B19V-positive, 15 Vneg Patienten) zu Therapieende

3.2.7 Medikation

Es gab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Medikation mit Marcumar, ASS, Antiarrhythmika, Kalzium-Antagonisten, CSE-Hemmer, Digitalis, ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonist, Aldosteron-Antagonist, Betablocker sowie verschiedenen

Diuretika zwischen den Gruppen B19V und Vneg. Die folgende Tabelle führt den Anteil an B19V-positiven und virusnegativen Patienten (%) gemessen an ihrer erhaltenen Herzinsuffizienzmedikation sowie die dazugehörigen p-Werte auf.

Medikament	Therapiestart				Therapieende			
	p-Wert	gesamt	B19V	Vneg	p-Wert	gesamt	B19V	Vneg
ACE-Hemmer	≥ 0,999	61,54	62,5	60,0	≥ 0,999	53,85	53,13	55,0
Aldosteron-Anta.	≥ 0,999	50,0	50,0	50,0	≥ 0,999	36,54	37,5	36,54
AT ₁ -RAnta.	0,143	9,62	15,63	0,0	0,035	13,46	21,88	0,0
Antiarrhythmikum	≥ 0,999	9,61	9,38	10,0	0,695	15,38	12,5	20,0
ASS	0,228	30,77	37,5	20,0	≥ 0,999	11,54	12,5	10,0
Betablocker	0,561	65,38	68,76	60,0	0,384	59,62	65,63	50,0
Ca-Anta.	0,517	3,85	6,25	0,0	≥ 0,999	5,77	6,25	5,0
CSE-Hemmer	≥ 0,999	13,46	12,5	15,0	≥ 0,999	13,46	12,5	15,0
Digitalis	0,463	15,38	18,75	10,0	≥ 0,999	5,77	6,25	5,0
Thiaziddiuret.	0,570	51,92	56,25	45,0	0,776	50,0	53,13	45,0
Schleifendiuret.	0,517	3,85	6,25	0,0	≥ 0,999	7,69	9,38	5,0
Marcumar	0,722	19,23	21,88	15,0	0,722	19,23	21,88	15,0

Tabelle 19: Herzinsuffizienzmedikation

Legende: Anzahl an Patienten, welche die oben aufgeführten Herzinsuffizienzmedikamente erhalten haben in Prozent und statistische Analyseergebnisse hinsichtlich der Medikation zwischen B19V-positiven und virusnegativen Patienten jeweils zu Therapiestart und zu Therapieende; **p-Wert**: Exakter Test nach Fisher; **RAnta.:** Rezeptorantagonist **Anta.:** Antagonist, **ACE:** Angiotensin-Converting-Enzym, **AT:** Angiotensin, **ASS:** Acetylsalicylsäure, **Ca:** Kalzium, **CSE:** Cholesterin-Synthese-Enzym, **diuret.:** Diuretikum; N = 52 (32 B19V-positive und 20 virusnegative (Vneg) Patienten)

4. DISKUSSION

Eine MK stellt eine entzündliche Erkrankung des Myokards dar, die in den westlichen Ländern hauptsächlich durch Viren verursacht wird [19,20]. Das zu den Erythroviren gehörende B19V weist eine lebenslange Persistenz auf und kann in diversen Geweben nachgewiesen werden [3,5,129]. Es wird qualitativ häufiger als andere kardiotope Viren (wie z.B. EV, ADV, HHV6) bei Patienten mit Myokarditiden detektiert [1,24,25,131].

In 60-70% der Fälle kommt es bei akuten Myokarditiden zu einer spontanen oder medikamentös induzierten Viruselimination, die zur Erholung der Myokardfunktion beiträgt [19,20,30]. Sowohl eine chronische Viruspersistenz als auch eine nicht spontan abklingende Entzündungsreaktion können irreversible Schäden des Myokards zur Folge haben. Virusnegative chronische Myokarditiden sollten immunsuppressiv behandelt werden [9-11]. Die immunsuppressive Therapie hilft maßgeblich bei der Reduktion der gewebeschädlichen, zur Herzinsuffizienz beitragenden, myokardialen Entzündungsreaktion [9-11]. Behandlungsstudien raten bei Adeno- und Enterovirus infizierten Patienten mit MK zu einer Therapie mit INF- β [12-15]. Für B19V bestehen diesbezüglich unter Erprobung stehende Ansätze [12,13,16].

Welche klinische Auswirkung im Gefäßendothel persistierendes B19V hat, ist bisher ebenso ungeklärt wie die Bedeutung von im Myokard vorliegender B19V-mRNA. Daher stellte sich die Frage, wie sich eine immunsuppressive Therapie auf den Krankheitsverlauf von B19V-positiven Patienten mit MK auswirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden retrospektiv die Daten B19V-positiver Patienten mit MK analysiert, die sechs Monate lang immunsuppressiv behandelt wurden. Vor und nach der Therapie wurden Myokardbiopsien entnommen und die B19V-DNA- und B19V-mRNA-Kopienanzahlen bestimmt. Anhand klinischer Diagnostikkriterien, wie z.B. der LVEF, wurde der Krankheitsverlauf der Patienten analysiert. Verglichen wurden die Verläufe mit den Daten identisch behandelter virusnegativer Patienten mit MK.

4.1 Diskussion Methodik

4.1.1 Patientenkollektiv

Diese retrospektive Beobachtungsanalyse untersucht die Daten von 52 Patienten (61,5% B19V-positive und 38,5% virusnegative) mit der klinischen Erstdiagnose MK. Ein größeres Patientenkollektiv wäre für die Aussagekraft der Promotionsergebnisse zuträglich gewesen. Die in der Methodik aufgeführten Einschlusskriterien führten zu dem kleinen Kollektiv von 52 Probanden. Das zusammengestellte Patientenkollektiv weist hinsichtlich der Einteilung auf Viren, der Bestimmung der LVEF und den stattgefundenen Biopsieentnahmen eine hohe Homogenität auf.

Der direkte Vergleich zwischen den in der folgenden Diskussion aufgeführten Studien zu B19V ist auf Grund der Inhomogenität der einzelnen Studienaufbauten erschwert.

4.1.2 Diagnostik

Die Diagnostikkriterien (LVEF, NYHA, LVESD, Leitsymptome) dieser Arbeit waren weitestgehend mit denen von anderen Studien wie z.B. BICC- und TIMIC-Studie kongruent [10,13]. Die Herzinsuffizienzmedikation wurde leitliniengerecht verabreicht. Ein Unterschied zu dieser Arbeit ist, dass sowohl in der BICC- als auch in der TIMIC-Studie nur Probanden eingeschlossen wurden, die mindestens sechs Monate eine Herzproblematik aufwiesen [10,13]. Damit sollte verhindert werden, dass sich spontane Heilungsverläufe im Patientenkollektiv befanden. Spontanverläufe sind in dieser Promotion nicht auszuschließen, auch wenn die Patienten erst eine Biopsie und immunsuppressive Therapie erhielten, nachdem sie sich unter der Herzinsuffizienzmedikation nicht verbesserten oder sich ihr Zustand akut verschlechterte (siehe Abbildung 2). Der Zeitraum von Erkrankung bis Erstvorstellung in der Klinik war nicht immer lückenfrei nachvollziehbar. Diese Problematik resultierte u.a. daraus, dass einige Patienten zeitliche Verläufe (erstes Auftreten der Beschwerden) nicht mehr in Erinnerung rufen konnten oder zu Beginn Tage/Wochen/Monate verstrichen, bis eine zielführende Diagnostik erfolgte.

4.1.3. Endomyokardbiopsie

Die Rolle der Endomyokardbiopsie bei myokardialen Erkrankungen wird kontrovers diskutiert. Es existieren keine randomisierten Behandlungsdaten über den Nutzen von Biopsien. Die Empfehlungen basieren, wie von der American Heart Association (AHA) und der ESC beschrieben, auf fallkontrollierten Studien und Expertenmeinungen [104]. Die ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases empfiehlt bei klinischem Verdacht auf eine MK, unter Anwendung aller anderen diagnostischen Kriterien und Ausschluss einer Koronararterienerkrankung, eine Biopsie durchzuführen [22]. Eine multidisziplinäre Expertengruppe aus AHA, dem American College of Cardiology und der ESC empfiehlt, von mehr als einer Stelle des rechten Ventrikelseptums fünf bis zehn Proben von ein bis zwei mm³ Größe zu entnehmen [104].

Für die Biopsie spricht, dass die Pathomechanismen der Krankheit auf zellulärer und molekularer Ebene ablaufen und das klinische Bild uncharakteristische Beschwerden aufweisen kann. Wenn eine kardiale Ursache der Beschwerden sehr spät in Betracht gezogen wird, können EKG und laborchemische Befunde mitunter typische Charakteristika einer MK nicht mehr aufweisen. Echokardiographie, MRT und Angiographie liefern nur Anhaltspunkte für das Ausmaß der kardialen Schädigung [18,20,101-103]. In einer Studie kamen Ardehali et al. zu dem Ergebnis, dass durch eine Myokardbiopsie eine exaktere Diagnosestellung möglich sei [132]. Die alleinige Serumanalyse von B19V bei einer myokardialen Erkrankung wird als nicht aussagekräftig angesehen [24,54], da eine lebenslange Persistenz besteht und das Virus in diversen Geweben nachgewiesen werden kann [3,23,70,71].

Gegen die Biopsie sprechen die mit ihr einhergehenden Risiken (z.B. Nachblutungen, Embolisation, Perforation, Arrhythmie, Tod), bei nicht zwingend gewährleistetem Nutzen. Ihre Komplikationsrate wird in der Literatur mit Werten zwischen <1 und 6% angegeben [104,133,134].

4.1.4 Sampling Error

Die Problematik, wie mit einem zunächst negativ und dann positiv auf B19-DNA und auch -mRNA (und umgekehrt) getesteten Patienten verfahren wird – in Hinblick z.B. auf einen möglichen Sampling Error –, wird in keiner zum jetzigen Zeitpunkt publizierten

Studie diskutiert. Studien, die zwischen erstem und zweitem Biopsieergebnis bezüglich vorhandener und nicht vorhandener DNA differenzieren, sind aktuell nicht bekannt. Lediglich der Verweis auf die Problematik falsch-negativer Proben (z.B. beim Inflammationsnachweis) existiert [18].

Beim sog. Sampling Error handelt es sich um einen „Probenfehler“, der bei der Untersuchung des Gewebes und der Interpretation der Biopsieergebnisse zu berücksichtigen ist [18]. Wird ein Areal biopsiert, in welchem in Folge einer fokalen Verteilung kein Entzündungsinfiltrat vorliegt, kann es zu einer falsch-negativen Probe/Bewertung kommen [18]. Deswegen sollten bei einer Myokardbiopsie mehrere Proben aus verschiedenen Arealen entnommen werden [95]. Im Hinblick auf die Interpretation der DNA/mRNA-Anzahlen kommt hinzu, dass B19V im Gefäßendothel lokalisiert ist [26]. Wird bei der Biopsie ein Areal entnommen, in welchem sich viele Gefäße befinden, könnte auch die gegebenenfalls nachgewiesene DNA-Kopienanzahl in diesem höher sein als in einem Areal mit geringerem Gefäßanteil. Des Weiteren kann bei der zweiten Biopsie (Therapieende) nicht vom identischen Areal Gewebe entnommen werden. Operative Limitationen sind weiterer Einflussfaktoren, welcher zur Heterogenität der Ergebnisse beitragen können.

Das Resultat einer postmortalen Studie ergab, dass in 37-45% aller analysierten Gewebeproben falsch-negative Ergebnisse erhalten werden [135]. Nach Meinung der Autoren dürften, wenn die Biopsie als alleiniges Diagnostikmerkmal für die MK diene, nur positive Biopsieergebnisse zur Diagnostik beitragen [135]. Auch die AHA und die ESC kamen in einem gemeinsamen wissenschaftlichen Statement zu dem Ergebnis, dass nur ein positives PCR-Ergebnis diagnostische Aussagekraft besitzt, während ein negatives PCR-Ergebnis eine virale Erkrankung nicht ausschließt [104].

4.1.5 Einteilung der Untersuchungsgruppen – molekularbiologische Auswertung

Die Labormethodik zur Extraktion sowie Analyse der B19V-DNA und -mRNA ist in allen Studien ähnlich. Einige weisen eine identische Methodik zu dieser Promotion auf [129,130] andere [24,136,137] weichen ab und verwenden z.B. andere Primer. Zur Diskussion der B19V-DNA/mRNA-Analyse siehe auch 4.2.4 und 4.2.6. Bei Betrachtung der Tabelle 12 wird ersichtlich, dass die Datengrundlage bezüglich der B19V-mRNA

nicht ausreichend ist, um Schlussfolgerungen daraus ziehen zu können. In einer Studie von Kühl et al. wurden 415 Patienten mit dem Verdacht auf eine kardiomyopathische Erkrankung identisch wie in dieser Arbeit auf B19V-DNA und -mRNA (VP1 und VP2 Transcripte) untersucht [130]. Es ist eines der größten bekannten B19V-positiven Patientenkollektive. Bei den Patienten von Kühl et al. (15,9%) [130] wurde bei einem ähnlichen prozentualen Anteil an Patienten B19V-mRNA nachgewiesen wie in dieser Promotion (12,5%).

Aus den oben genannten Aspekten wurde nur zwischen B19V-positiven und virusnegativen Patienten eine statistische Analyse durchgeführt und nur Patienten in das virusnegative Kollektiv aufgenommen, in deren sämtlichen, inklusive der Follow-up Untersuchungen, Biopsien kein Virus nachgewiesen werden konnte.

4.1.6 Histologische und immunhistologische Auswertung

In dieser, wie auch anderen Studien (z.B.: [10,13,25,131]) wurden für die histologische Auswertung der Paraffinschnitte die Dallas Kriterien angewendet [122]. Diese definieren keine Zellzahlen [122]. Es könnte somit vom Pathologen abhängig sein, ob und welche Ausprägung einer MK diagnostiziert wird.

Immunhistologische Untersuchungen liefern spezifischere Ergebnisse [100]. Sie können sowohl aus Paraffin- als auch aus Gefrierschnitten gewonnen werden. Die vom IKDT erfolgten seriellen Gefrierschnitte haben gegenüber Paraffinschnitten den Vorteil einer höheren Sensitivität bei der Detektion von Immunhistochemiemarkern [138]. Dies könnte bei der Diagnostik histologisch weniger aussagekräftiger Verläufe hilfreich sein. Je nach Labor werden die immunhistologischen Grenzwerte, ab welchen eine MK vorliegt, anders definiert. Die geläufigste Einteilung ist die von Maisch et al. im Jahr 2000 festgelegte, wonach eine MK bei einem „Minimum von 14 Leukozyten/mm², bestehend aus T-Lymphozyten (CD3⁺) oder aktivierten T-Lymphozyten (zum Beispiel CD45R0⁺)“ [124] vorliegt. Diese Definition wurde z.B. auch in der TIMIC-Studie verwendet [10]. Wie in der Methodik beschrieben, zieht das IKDT noch zusätzliche Marker zur immunhistologischen Diagnostik einer MK heran. Auch Escher et al. [139] weichen mit ihren definierten Grenzwerten von der Definition von Maisch et al. [124] ab (>7,0 CD3⁺ Lymphozyten/mm² und/oder > 35,0 CD11b⁺/Mac1⁺ Makrophagen/mm² [139]).

Die Unterschiede der zugrundeliegenden Gewebeanalysen (Grenzwerte, Gefrier- oder Paraffinschnitt) erschweren den Vergleich von verschiedenen Studienergebnissen. Einheitliche Standards zur Aufarbeitung myokardialen Gewebes könnten die Auswertung zukünftiger Daten verbessern.

4.1.7 Limitationen

Die aufgeführten Aspekte wie z.B. Sampling Error und operative Limitationen können nicht nur den Vergleich zwischen Patienten, sondern auch die Interpretation der Ergebnisse eines Patienten erschweren. Um die Inhomogenität zu reduzieren und eine Einteilung/Untersuchung unter Berücksichtigung beider Biopsieergebnisse vornehmen zu können, müssten deutlich höhere Patientenzahlen untersucht werden.

Einige Datensätze wie z.B. vom Entzündungsverlauf und von den DNA-Kopienanzahlen weisen eine starke Streuung auf. Dort spiegeln die vor Ausreißern stabilen Medianwerte die Veränderung zwischen Therapiestart und -ende besser wieder als die Mittelwerte.

Bei der Interpretation der B19V-mRNA-Kopienanzahl und dem Entzündungsverlauf konnte aufgrund kleiner Fallzahlen nur eine deskriptive statistische Analysen durchgeführt werden. (Crush-)Artefakte, zu wenig verwendbares kardiales Material oder Methodenfehler bei der laborchemischen Aufbereitung könnten Ursachen für fehlende Daten bzw. daraus resultierende kleine Datensätze sein [104]. Einem insuffizienten Transport vom Katheterlabor zur Bench, wie früher als Fehlerquelle in der Literatur beschrieben, wurde durch einen fachgerechten Transport vorgebeugt [104].

Für zukünftige Datenerhebungen wäre es, besonders in Hinblick auf eine Multicenterstudie, wichtig, eine einheitliche Methodik zu etablieren. Auch sollte der zeitliche Verlauf zwischen Auftreten der Beschwerden und Biopsieentnahme besser dokumentiert werden, denn in der akuten Phase der B19V-Virusinfektion ist die Viruslast höher als in der chronischen [36].

4.2 DISKUSSION ERGEBNISSE

4.2.1 Ausgangssituation

Weder zu Therapiestart noch zu Therapieende bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B19V-positiv und Vneg in Bezug auf LVEF, LVEDD, LVESD, Beschwerdesymptomatik, Diagnose, Herzinsuffizienzmedikation, Alter und Geschlecht (siehe Tabelle 5).

Da alle Patienten (MK, DKM, etc.) in einer Gruppe zusammengefasst wurden, ist der direkte Vergleich mit Studien, in denen z.B. nur B19V-positive DKM Patienten [129,140] untersucht wurden oder die zwischen MK und DKM Patienten differenzierten [36], nicht möglich.

Mit $44,19 \pm 14,01$ Jahren waren die Patienten dieser Promotion ungefähr genauso alt wie die Patienten mit Kardiomyopathien anderer Studien, die B19V-positive Patienten in ihren Kollektiven hatten [10,129,130,141].

Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Geschlechtes zwischen der B19V-positiven und Vneg Patientengruppe ($p = 0,370$). Bei den Vneg Patienten waren 75% der Patienten männlich. Bei den B19V-positiven Patienten lag der Anteil der Männer bei 59,4%. Auch in anderen Studien überwog die Anzahl der Männer. Zum Beispiel waren von den Probanden der TIMIC-Studie 58% der viruspositiven und 62% der virusnegativen Patienten männlich. In einer Studie von Kühl et al. waren 63% der B19V-positiven und 72% der virusnegativen Patienten mit Verdacht auf eine Kardiomyopathie männlich [130]. Die Inzidenz der MK wird in der Literatur bei Männern höher angegeben als bei Frauen [91,92,94]. Bock et al. untersuchten Patienten mit MK und DKM hinsichtlich ihres zugrundeliegenden B19V-Genotypes und konnten weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern noch in zugrunde liegender Kardiomyopathieform oder Alter feststellen (498 B19V-positive Patienten). In ihren Ergebnissen zeichnete sich die Tendenz ab, dass Genotyp 2 mehr bei den weiblichen Probanden vorlag [82].

Auch die statistische Analyse zum Auftreten der Leitsymptome beim Therapiestart und -ende ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den B19V-positiven und Vneg Patienten. Prozentual nahmen die Symptome zu Therapieende ab. Bei diesem Ergebnis ist zu berücksichtigen, dass die Leitsymptome nur hinsichtlich ihres Auftretens

und nicht ihrer Ausprägung untersucht wurden. Wenige Studien legen die genaue Symptomatik ihrer Patienten dar [140], sondern führen zum Vergleich der klinischen Ausgangssituation ihrer Studienpopulationen die NYHA-Klassen an. In dieser Promotion zeichnete sich anhand der Absolutwerte bei B19V-positiven und Vneg Patienten eine Tendenz zur Verbesserung der NYHA-Klassen nach der Therapie ab. Zu Therapiestart wurden die meisten Patienten der NYHA-Klassen I und II zugeteilt (B19V: 59,26%, Vneg: 52,94%). In einigen anderen Studien, die sich mit B19V-assoziierten myokardialen Erkrankungen beschäftigten, befand sich der größte Anteil der Patienten in der NYHA-Klasse II [13,129,130]. Vergleiche zur Änderung der NYHA-Klasse bei B19V-positiven Patienten können nicht gezogen werden, da zum jetzigen Zeitpunkt keine Untersuchungen bekannt sind, die sich mit einer immunsuppressiven Therapie bei B19V-positiven Patienten beschäftigten.

Zu keinem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den B19V positiven und Vneg Patienten bezüglich ihres LVEDD und LVESD. Ein Zusammenhang zwischen diastolischer Dysfunktion und im Myokard vorliegenden Viren ist bekannt. Dass es zu keiner signifikanten Änderung zwischen Therapiestart und -ende des LVEDD und LVESD kam, könnte auf die zum Teil schon zu Therapiebeginn im Normbereich gelegenen Werte zurückzuführen sein. Die Werte von LVEDD und LVESD ähneln denen einer Studie von Kühl et al. [130], deren Kollektiv sich aus 415 B19V-positiven und 122 virusnegativen Patienten mit Kardiomyopathie zusammensetzte.

4.2.2 Myokardiale Entzündung

Bei den B19V-positiven ($p = 0,013$) und Vneg Patienten ($p = 0,016$) wurde nach der immunsuppressiven Therapie sowohl eine signifikante Reduktion an histologischen Entzündungsnachweisen als auch einen Rückgang an immunhistochemischen Entzündungsmarkern wie $CD3^+$, Perforin⁺ etc. gemessen (siehe Tabelle 14 und 15).

Um eine Aussage darüber treffen zu können inwieweit diese Reduktion allein auf die Wirkung des Prednisolons und Azathiopriins zurückzuführen ist, wäre eine nicht immunsuppressiv behandelte B19V-positive Kontrollgruppe nötig. Der positive Effekt einer Immunsuppression bei virusnegativen Patienten mit MK wurde bereits in der TIMIC-Studie belegt [10].

Inwieweit das Vorliegen spezifischer Entzündungsmarker wie z.B. CD45R0⁺ eine Aussagekraft bezüglich des Verlaufs einer MKa zulässt und die Patienten von einer frühen Therapie profitieren können, ist bislang noch nicht ausreichend für alle Entzündungsmarker untersucht [19]. Es wurden Zusammenhänge (z.B. bei Perforin⁺) zwischen kardial vorliegenden Entzündungsmarkern und einer Herzinsuffizienz nachgewiesen [142].

Immunhistologische Untersuchungen von Kandolf et al. an Gewebe 1474 viruspositiver Patienten mit MK (36,7% B19V-positiv) ergaben, dass „nur bei 62% der viruspositiven Endomyokardbiopsien eine pathologisch signifikante Entzündungsreaktionen gesichert werden kann, die eine ätiopathogenetische Bedeutung der Infektion für kardiale Beschwerdesymptomatik nahelegt“ [143]. D.h. bei den verbliebenen 38% könnte von einer Persistenz von Viren ohne pathologische Bedeutung für die Entzündung oder einer bereits abgeklungenen bzw. fokalen Entzündung ausgegangen werden [143].

Bock et al. definieren >500 GE/μg B19V-DNA als Grenzwerte für die Aufrechterhaltung einer myokardialen Entzündung [36]. Die DNA-Kopienanzahlen in dieser Arbeit lagen im Mittel zu Therapieende unter 500 GE/μg DNA. Die signifikante Reduktion an histologischen Entzündungsnachweisen im Zusammenhang mit den vorliegenden B19V-DNA-Kopienanzahlen <500 GE/μg DNA – geringe Entzündung bei geringer B19V-DNA-Kopienanzahl – gehen demnach mit den Beobachtungen von Bock et al. einher [36]. Es könnte sein, dass die Immunsuppression bei den hiesigen Patienten zur Entzündungsreduktion geführt hat, ohne dass es dabei zu einem Anstieg der B19V-DNA-Kopienanzahl kam.

4.2.3 Beurteilung der Herzfunktion anhand der LVEF

Um eine Aussage über die Veränderung der Herzfunktion nach der immunsuppressiven Therapie treffen zu können, wurde bei allen Patienten zum Therapiestart und -ende die LVEF gemessen. Die statistische Analyse zeigt, dass sich die mittlere LVEF der B19V-positiven und Vneg Gruppe signifikant verbesserte ($p < 0,001$ (B19V); $p = 0,003$ (Vneg)). Sowohl zu Therapiestart als auch -ende bestand ein nicht signifikanter Unterschied zwischen der virusnegativen und B19V-positiven Patientengruppe (Therapiestart $p = 0,480$; Therapieende $p = 0,880$).

Die mittleren LVEF-Ausgangswerte ($40,53 \pm 15,83\%$) der B19V-positiven Patienten entsprachen in etwa den Werten anderer Studien. In einer Studie von Kühl et al. wiesen B19V-positive Patienten mit Kardiomyopathie z.B. eine LVEF von $45,2 \pm 19,2\%$ (B19V-mRNA positiv; N= 66) bzw. eine LVEF von $46,2 \pm 19,0\%$ (B19V-mRNA negative; N = 349) [130] auf. Bei Stewart et al. hatte das Patientenkollektiv eine durchschnittliche LVEF von 41% (N = 12) [137]. Rigopoulos et al. führten eine Metaanalyse durch, im Rahmen derer sie 29 Studien untersuchten. Allen Studien war gemein, dass mehr als 10 Patienten eingeschlossen wurden, die an DKM/DKMe oder MK erkrankt waren. Des Weiteren mussten von allen Patienten Myokardproben vorliegen, die per PCR auf B19V-Genom untersucht wurden [8]. Die LVEF-Ausgangswerte dieser Promotion lagen zwischen denen der Metaanalyse (Gruppe mit Kontrollkollektiv: $34,2 \pm 9,0\%$ bzw. Gruppe ohne Kontrollkollektiv: $45,2 \pm 11,6\%$) [8].

Die mittlere LVEF der virusnegativen Patienten lag sowohl zu Therapiestart ($44,20 \pm 18,52\%$) als auch Therapieende ($51,85 \pm 16,91\%$), bei identischer Medikation und Follow-up Untersuchung nach sechs Monaten, über den Durchschnittswerten anderer Studien ($26,5 \pm 6,6$; nach 6 Monaten: $45,6 \pm 9,6$, MK [10]; $23,86 \pm 8,6$; nach 6 Monaten: $39,5 \pm 10,7$, DKM [109]). Dass sich die Patienten der anderen/o.g. Studien trotz schlechterer LVEF-Ausgangswerte im Mittel mehr verbesserten als die Patienten dieser Arbeit, könnte darauf zurückzuführen sein, dass ihr Myokard zwar stärker, aber nicht irreversibel, vorgeschädigt war. In den o.g. Studien wurden nur Patienten mit einer LVEF < 40 bzw. 45% einbezogen [10,109], wodurch sich eine größere Differenz zum LVEF-Normbereich ergibt. In der vorliegenden Arbeit wiesen genau die Hälfte der Patienten zu Therapiebeginn eine LVEF > 45% und nur 45% eine LVEF von < 35% auf. Dadurch wird der Vergleich zu den zitierten Studien [10,109] erschwert.

Bei den Patienten (18,75% B19V; 15% Vneg), deren LVEF-Werte sich nicht veränderten oder geringfügig (ca. $\pm 5,0\%$) verbesserten bzw. verschlechterten könnte davon ausgegangen werden, dass es sich sowohl bei den B19V-positiven als auch virusnegativen Patienten um Nonresponder handelte. Frustaci et al. berichteten bereits 2003 in einer Studie über Patienten mit aktiver lymphozytärer MK von Respondern (N=21) und Nonrespondern (N=20) auf eine immunsuppressive Therapie [9]. In 85% der Biopsien von Nonrespondern fanden Frustaci et al. hauptsächlich virales Genom von EV und ADV. Sie schlussfolgerten, dass die vorliegenden kardialen Viren zum schlechten Outcome der Patienten beitragen würden [9]. In dieser Promotion wurden EV- und ADV-positive Patienten im Vorfeld ausgeschlossen. Die Gruppe der Patienten,

welche nicht auf die immunsuppressive Therapie ansprachen war sowohl bei den B19V-positiven als auch Vneg Patienten fast gleich groß. Dies macht einen Zusammenhang zwischen Nonrespondern und B19V-positiven Patienten unwahrscheinlich.

Ein weiterer Grund für die sich in dieser Promotion nicht verbesserten oder sogar verschlechterten LVEF-Werte könnte auch eine irreversible Myokardschädigung gewesen sein.

Verschiedene Studien schreiben dem zugrundeliegenden B19V-Genotyp eine Rolle in der Pathophysiologie und für die Form der klinischen Ausprägung zu [129,144]. Bei den Patienten dieser Promotionsschrift gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen B19V-positiven Patienten, die vor und nach 1970 geboren wurden. Vor 1970 dominiert nach der Literatur Genotyp 2 [3,67]. Eine mögliche genetische Komponente kann nicht ausgeschlossen werden, da keine Bestimmung des Genotyps durchgeführt wurde.

Beim Vergleich der Medianwerte zeigt sich die Tendenz, dass sich die LVEF der B19V-positiven Patienten mehr verbesserte als die der virusnegativen (siehe Tabelle 6). Der Anstieg unterschied sich zwischen den Untersuchungsgruppen jedoch nicht signifikant. Die jeweils signifikante Verbesserung der LVEF könnte nicht nur bei den Vneg, sondern auch bei den B19V-positiven Patienten auf die immunsuppressive Therapie zurückzuführen sein. Um Spontanverbesserungen auszuschließen, hätten im Vorfeld nur Patienten eingeschlossen werden dürfen, die schon über einen längeren Zeitraum eine pathologische Herzsymptomatik aufwiesen. Ob dies der Fall war, ist den vorliegenden Daten nicht zu entnehmen. Größere Studiendesigns, wie TIMIC (85 Patienten) und BICC (134 Patienten) haben diesen Aspekt berücksichtigt und nur mindestens 6 Monate kardial erkrankte Probanden in ihre Studien aufgenommen [10,13].

4.2.4 B19V-DNA-Kopien

Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,551$) zwischen den quantitativ bestimmten B19V-DNA-Kopienanzahlen der Patienten vor und nach immunsuppressiver Therapie festgestellt werden. Der Medianwert der B19V-DNA-Kopienanzahl in dieser Promotion lag bei 62 Kopien/ μg DNA zu Therapiestart und 106 zu Therapieende. Die Mittelwerte lagen zwischen $708,85 \pm 2097,32$ zu Therapiestart und $200,00 \pm 239,05$ zu Therapieende. Viruslasten von mehr als 500 GE/ μg B19V-DNA wurden von Bock et al. als klinisch relevante Grenzwerte für die Aufrechterhaltung einer myokardialen Entzündung angesehen [36]. Die Betrachtung von Mittel- und Medianwerten zeigt, dass die meisten Biopsien unter 500 B19V-Kopien pro μg DNA aufwiesen.

Bei zwei der B19V-positiven Patienten wurden zu Therapiebeginn höhere B19V-DNA-Kopienanzahlen bestimmt (9800,0 und 5047,0 DNA-Kopien). Die nächste darunter liegende Kopienanzahl lag bei 768,0 Kopien. Bei diesen zwei Proben könnte es sich neben einem korrekten klinischen Verlauf ggf. um „Ausreißer“ handeln, ein Messfehler in der Analyse vorgelegen haben oder ein Areal biopsiert worden sein, in welchem überdurchschnittlich viel B19V-DNA vorlag. Vielleicht lag mit 9800,0 Kopien aber auch eine akute Infektion vor. Die Viruslast liegt nach Kandolf et al. „bei der akuten Infektion des Herzens zwischen 10^4 und 10^8 Genomäquivalenten pro μg isolierter Nukleinsäuren und bei entzündlicher [Parvovirus] B19-Persistenz zwischen 10^2 und 10^3 viralen Kopien“ [26]. Ohne die zwei o.g. vermeintlichen „Ausreißer“ stieg die durchschnittliche Kopienanzahl von 150 auf 200 DNA-Kopien zu Therapieende an.

Die Werte der quantitativen DNA-Kopienbestimmung entsprechen in etwa denen anderer Studien bzw. liegen ohne die „Ausreißer“ unter ihnen [36,129,137,141]. Zum Beispiel wurden bei 9 von Greulich et al. untersuchten Patienten mit MK und DKM weniger als 100 GE, bei 72 100-499 GE und bei 27 mehr als 500 GE/ μg B19V-DNA (maximal 2450 GE) bestimmt [141]. Kühl et al. gaben in ihrer Publikation zur Prävalenz von Erythrovirusgenomen bei DKM-Patienten Werte von 451 ± 514 (Genotyp 1) bzw. 614 ± 2316 (Genotyp 2) B19V-Kopien/ μg DNA an [129,129]. Die niedrigste gemessene Kopienanzahl lag bei 35 die höchste bei 22000 B19V-Kopien/ μg DNA. Es handelte sich dabei um die Werte 151 B19V-positiver DKM-Patienten. Die Analyse der Gewebeproben wurde wie in dieser Arbeit durch das IKDT durchgeführt [129]. Die beiden oben genannten Arbeiten [129,141] zeigen, dass bei der quantitativen

Bestimmung von B19V-DNA-Kopien aus Myokardbiopsien anscheinend eine natürliche große Streuung vorliegt. Auch eine Gruppe von Experten der AHA, dem American College of Cardiology und der ESC halten in ihrer Stellungnahme eine große Streuung bei der Detektion myokardial vorliegender Viren fest [104].

Lotze et al. ließen die Biopsien ihrer Kontrollpatienten (Bypass-OP, LVEF > 55%, keine idiopathische DKM) von drei Laboren untersuchen. Je nach Labor waren 30%, 50% oder 60% der Patienten B19V-positiv [136]. Sie stellten fest, dass die Variabilität zwischen den Laboren bei 40% lag. Bei der Interpretation ihrer Daten müsse jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um lediglich 10 Kontrollpatienten mit geringen B19V-Kopienanzahlen handele (außerhalb des linearen Messbereiches, nahe der Nachweisbarkeitsgrenze des Assays) [136]. Die Abhängigkeit von Untersucher und Labor bei der Bestimmung der B19V-DNA-Kopienanzahl sollte als mögliche Fehlerquelle bei der Interpretation der Daten dieser und den zitierten Studien berücksichtigt werden. Bei den genannten Literaturvergleichen sollte zudem die Inhomogenität der einzelnen Studien untereinander bedacht werden. Zum Beispiel geben die meisten Studien nicht exakt an, wieviel Zeit zwischen Auftreten einer Beschwerdesymptomatik und Biopsieentnahme verstrich [51,145]. Auch Differenzen in der Laboranalyse, wie z.B. das Verwenden unterschiedlicher Primer, sollten beim Vergleich der Studienergebnisse nicht außer Acht gelassen werden (vergleiche die aufgeführten Primer in Tabelle 3 unter anderem mit [24,136,137]). Differenzen zwischen den Studien bestehen zudem bei den untersuchten Myokarditisformen. Beim Patientenkollektiv dieser Arbeit war kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit MK, MKa, DKM, DKMe und MK-BL auszumachen. Sie wurden in einem Kollektiv zusammengefasst. Andere Studien, wie z.B. von Bock et al. [37], differenzierten bei ihrer Datenanalyse hinsichtlich dieses Kriteriums und ordneten Patienten mit MK und DKM getrennten Untersuchungsgruppen zu. Dadurch können keine allgemeingültigen Vergleiche zwischen den Studien gezogen werden. Generell beruhen die meisten Studien auf Daten von Patienten mit DKM [2,25,129,140,141,146] oder DKM und MK [37,137].

4.2.5 Bedeutung der Viruslast für eine Myokarditis/dilatative Kardiomyopathie

Auch bei Patienten, die keine Zeichen einer kardialen Inflammation aufwiesen, konnten B19V-DNA-Kopien nachgewiesen werden (Biopsieentnahme im Rahmen von Bypass-OP, keine idiopathische DKM, LVEF > 55%) [131]. Bock et al. maßen bei Patienten mit MKa höhere Viruslasten als bei Patienten mit chronischer MK und DKM (z.B. 316000 GE bei akuter MK; 392 GE bei DKM [36]). Steward et al. detektierten nicht bei MK, sondern bei Patienten mit DKM, höhere B19V-Kopienanzahlen (keine Differenzierung ob akut oder chronisch). Im Kollektiv befanden sich allerdings nur zwei Patienten mit MK und nur bei 6 von 12 Patienten konnte die B19V-DNA-Kopienanzahl bestimmt werden [137]. Bock et al. detektierten höhere und signifikant häufiger B19V-Kopienanzahlen im Myokard bei entzündlicher als nicht entzündlicher DKM [82]. Eine mögliche Reaktivierung (Nachweis von B19V-mRNA) wurde in beiden Studien von Bock et al. [36,82] lediglich im Rahmen entzündeter Herzen festgestellt. Dies erfolgte sowohl bei Patienten mit MKa als auch chronischer MK, sofern die Viruslast mehr als 500 GE/ μ g DNA [36,82] betrug. In nicht entzündeten Herzen von Patienten mit DKM und einer Viruslast von weniger als 100 GE/ μ g DNA wurden keine B19V-mRNA-Intermediate nachgewiesen [82]. Auch Greulich et al. stellten eine Tendenz zu höheren Viruslasten bei entzündetem Myokard fest [141]. Aus der bisherigen Datenlage kann kein Nachweis eines kausalen Zusammenhanges, zwischen B19V-Kopienanzahl/B19V-Reaktivierung (mRNA) und entzündlicher Aktivität des Myokards, erbracht werden [8]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der lebenslangen Persistenz [3,5] des B19V liegen, wodurch nicht klar differenziert werden kann, ob das Virus passiv vorliegt oder in Verbindung mit der myokardialen Erkrankung steht. Auch der „Arbeitskreis Blut“ des Bundesministeriums für Gesundheit hielt in seiner Mitteilung aus dem Jahr 2010 fest, dass der Großteil aller B19V-Infektionen einen asymptomatischen Verlauf aufweist [32]. Untersuchungen von Kindermann et al. zu prognostischen Indikatoren bei einer vermuteten MK ergaben keinen Zusammenhang zwischen Virusnachweis und einem schlechteren Outcome (28% B19V) [100]. Auch bei Patienten dieser Promotion könnte B19V ohne direkte kardiale Beeinflussung vorgelegen haben.

Hinsichtlich ihrer LVEF verbesserten sich die Patienten, bei welchen B19V-DNA-Kopien quantitativ bestimmt werden konnten, signifikant ($p = 0,014$).

Greulich et al. untersuchten den Einfluss der B19V-DNA-Kopien auf den klinischen Verlauf von 108 Patienten mit MK oder DKM unklaren Ursprungs. Unabhängig von der

Viruslast konnten sie keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von B19V-DNA-Kopien und dem klinischen Verlauf feststellen [141]. Hohe LVEF-Werte korrelierten bei ihnen mit hohen Viruslasten (> 500 GE/ μ g DNA). Die Autoren mutmaßten, dass die hohen LVEF-Werte daher kommen könnten, dass das Endstadium (postinflammatorisches Herzgewebe mit Fibrose etc.) und eine daraus resultierende schlechtere LVEF noch nicht erreicht sei [141]. In stark nekrotischem Gewebe kann der Gefäßanteil reduziert sein. Nekrotisches Gewebe wiederum kann die Ursache niedriger LVEF-Werte sein. Da B19V nur im Gefäßendothel vorzufinden ist [26], könnte es durch eine Nekrose neben niedrigen LVEF-Werten auch zu einem geringen Nachweis an B19V-DNA/mRNA-Kopien kommen.

Sowohl aus den Daten dieser Arbeit, als auch aus den Ergebnissen von Greulich et al. [141] könnte geschlossen werden, dass die Anzahl an B19V-DNA-Kopien in keinem Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf (LVEF) steht.

Die von Bock et al. definierte Grenzwerte von 500 GE/ μ g DNA [36] sollte kritischer auf andere Studienmodelle z.B. in Bezug auf den Anteil an nekrotischem Gewebe sowie Lokalisation des B19V (Gefäßendothel) angewandt werden.

Eine standardisierte Herangehensweise könnte zu mehr Vergleichbarkeit führen. Zum Beispiel könnte B19V-DNA im Verhältnis zur Menge an Gefäßendothel (Marker für Gefäßendothel) bestimmt werden. Eine isolierte Extraktion des Gefäßendothels ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Auch Vergleiche mit gesunden Patienten könnten Aufschluss über die Bedeutung der B19V-DNA-Kopienanzahl geben. Die dafür durchzuführenden Biopsien sind aufgrund des Eingriffsrisikos ethisch nicht vertretbar. Eine Option für den Erhalt von Gewebe nicht an MK/DKM erkrankter Patienten wären Analysen aus Spenderherzen oder, wie von Lotze et al. beschrieben, eine Probenentnahme im Zuge von Bypassoperationen [136]. Ein Vorteil von Bypassoperations- und Spenderherzproben gegenüber Proben aus Autopsieherzen ist, dass in ihnen noch Derivate wie z.B. mRNA vorzufinden sein müssten, die aufgrund ihres schnellen Zerfalls nicht mehr zwingend bei Autopsieproben nachzuweisen sind. Beispielsweise könnten für zukünftige Studien die zwei hier untersuchten Gruppen B19V-positiv und Vneg noch mit einem myokardial entzündungsfreien und nicht immunsuppressiv behandeltem Kontrollkollektiv verglichen werden, um mehr Informationen zur B19V-Aktivität zu erhalten. Besonders in Hinblick auf eine Multicenterstudie sollte über eine Einführung einheitlicher Standards zur Datenerhebung und -auswertung nachgedacht werden.

4.2.6 B19V-mRNA-Kopien

Bei vier Patienten (12,5%) wurde zu Therapiestart und bei sechs (18,75%) zu Therapieende B19V-mRNA nachgewiesen. In einer Studie von Kühl et al. war der prozentuale Anteil an diagnostizierter B19V-mRNA ähnlich. Sie wiesen in der Studie, deren laboratorisches Vorgehen mit dem dieser Publikation kongruiert, in 15,9% von 415 B19V-positiven Biopsien B19V-mRNA nach [130].

Die transkriptionelle Aktivität, also das Vorhandensein von B19V-mRNA, muss nicht automatisch auch eine translationelle Aktivität bedeuten. Sie zeigt lediglich, dass VP1 und VP2 vorliegen – ob auch auf Proteinebene ist unklar [130]. Die Expression von B19V-Kapsidproteinen konnte mit einem signifikant häufigeren Auftreten von Brustschmerzen in Ruhe und körperlichen Stress sowie einer reduzierten LVEF in Verbindung gebracht werden. Kühl et al. schlossen in ihrer Studie Patienten mit myokardialer Entzündung aus [83]. Dem gegenüberstehend fanden Bock et al. nur in entzündeten Herzen RNA-Intermediate. In Kontrollherzen und auch Biopsien entzündungsfreier, chronischer Kardiomyopathiepatienten, konnten sie keine Intermediate nachweisen [36,82]. Studien zum Aktivitätsstatus des Virus sind selten, wodurch Vergleiche erschwert werden [51].

Die Bedeutung des B19V-mRNA-Nachweises wird durch diese Arbeit nicht erweitert und bedarf weiterer Untersuchungen. Wegen des geringen Outputs an B19V-mRNA-Kopien aus B19V-positiven Myokardbiopsien und der daraus resultierenden geringen Datenlage, sollte über die Durchführung einer Multicenterstudie nachgedacht werden.

4.3 Conclusio Fragestellung

Die Datenanalyse dieser Arbeit zeigt, dass eine immunsuppressive Therapie, auch bei kardial vorliegendem B19V, zu einem besseren klinischen Outcome der Patienten führen kann. Es bestand weder zu Therapiestart noch -ende ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen B19V-positiv und Vneg. Unter sechsmonatiger immunsuppressiver Therapie kam es zu einem signifikanten Anstieg der LVEF der B19V-positiven Patienten ($p < 0,001$). Ob ein langfristig (über die sechs Monate hinaus) besseres Ergebnis der LVEF für immunsuppressiv therapierte B19V-positiv Patienten zu erwarten ist, könnte anhand von Follow-up-Daten untersucht werden.

Die Daten lassen vermuten, dass der positive Effekt einer immunsuppressiven Therapie bei einer MK auch bei kardial vorliegendem B19V bestehen könnte. Die immunsuppressive Therapie scheint keine Auswirkung auf die B19V-Kopienanzahl zu haben. Die Werte der B19V-DNA-Kopien veränderten sich zwischen Therapiestart und -ende nicht signifikant ($p = 0,551$) und entsprachen ungefähr denen anderer Studien [36,129,137,141]. Da die Viruslast des B19V z.T. sehr gering war, könnten latente Infektionen vorgelegen haben, die nicht reaktiviert wurden. In der Literatur wird von B19V-positiven Patienten mit Kardiomyopathien berichtet, bei welchen spontane Wechsel von aktiven zu latenten B19V-Infektionen beobachtet wurden [130].

Eine Reduktion der B19V-Viruslast konnte in Behandlungsstudien mit INF- β erzielt werden [12,13,16]. Eine signifikante Virusreduktion mit Verbesserung der NYHA und Lebensqualität wurde von Schultheiß et al. 2008 bei 131 viruspositiven Patienten (EV, ADV, B19V) nach einer INF- β -Therapie beobachtet [12]. 2016 stellten sie in der BICC-Studie fest (128 B19V-positiv Patienten), dass es bei ihren mit INF- β -1b therapierten B19V-positiv Patienten zu einer höheren, aber nicht signifikanten, Viruselimination kam [13]. Zudem verbesserten sich die Patienten symptomatisch und hinsichtlich ihrer NYHA signifikant [13]. Ein direkter Vergleich zwischen immunmodulierender und immunsuppressiver Therapie bei B19V-positiv Patienten könnte sowohl hinsichtlich der therapeutischen Relevanz beider Therapieoptionen als auch der Bedeutung des B19V im Rahmen der MK, hilfreich sein.

Bei der kleinen Datengrundlage dieser Arbeit können keine konkreten Aussagen getroffen werden. Auch in anderen Studien zeigte sich das Problem, dass nicht alle Proben quantitativ ausgewertet werden konnten (siehe auch: 2.3.3).

Stewart et al. konnten z.B. nur in 50% ihrer von B19V-positiven Patienten entnommenen Biopsien die B19V-DNA-Kopienanzahl bestimmen [137]. Es ist bisher nicht endgültig bewiesen, ob ein Zusammenhang zwischen B19V-Persistenz und Herzerkrankungen bzw. deren Fortschreiten besteht [8,23,51,100].

Im Fall B19V-positiver, immunsuppressiv behandelter Kardiomyopathiepatienten sind weitere Studien nötig, um Aussagen über die Pathomechanismen der Erkrankung, auch im Zusammenspiel mit Prednisolon, und über das Langzeitoutcome der Patienten treffen zu können. Es wäre daher sinnvoll, die Ergebnisse dieser Promotion mit einer größeren Studienpopulation zu verifizieren. Zur Gewinnung eines größeren Datensatzes sollte eine Multicenterstudie in Erwägung gezogen werden. Die Einführung einheitlicher Standards – von der Biopsieentnahme bis hin zur Labormethodik – könnten die Vergleichbarkeit zukünftiger Ergebnisse verbessern.

Die Ergebnisse dieser Promotion könnten die Grundlage für weitere Studien bilden, die den Effekt der Immunsuppressiven Behandlung einer MK bei B19V-positiven Patienten untersuchen und eventuell zur Verbesserung der medizinischen Versorgung dieser beitragen könnten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das lebenslang persistierende B19V ist das am häufigsten nachgewiesene virale Genom im Myokard [1,2]. Eine lebenslange Persistenz [3,28] sowie der hohe Durchseuchungsgrad [4,5] im Kindesalter, sind Ursachen der hohen Prävalenz des B19V. In Deutschland konnte bei 79,1% der über 65-jährigen B19V nachgewiesen werden [7].

Die Rolle des B19V bei einer MK ist bisher nicht ausreichend geklärt. B19V-positiven Patienten wird im Fall einer kardialen Inflammation zurzeit nur eine symptomatische Herzinsuffizienztherapie zuteil. Leitlinien existieren nicht.

In bisherigen Studien und im klinischen Alltag werden bei einer chronisch anhaltenden oder sich akut verschlechternden Kardiomyopathie, virusnegative Myokarditiden immunsuppressiv therapiert [10,11]. Es liegen antivirale Behandlungsstudien vor, die sich vornehmlich mit der Therapie von Adeno- und/oder Enteroviren induzierten Kardiomyopathien durch INF- β beschäftigen [12-15]. Für das B19V existieren unter Erprobung stehende Therapieansätze mit INF- β [12,13,16].

Es stellte sich die Frage, ob das lebenslang persistierende [3,28] und in diversen Organen nachzuweisende [3,23,70,73] B19V im Myokard nicht nur inaktiv vorliegt. B19V konnte auch bei kardial gesunden Patienten im Herzgewebe nachgewiesen werden [23]. Wenn Immunsuppressiva keinen Einfluss auf das B19V nehmen, könnten B19V-positive Patienten vielleicht in gleicher Weise von einer immunsuppressiven Therapie profitieren, wie virusnegative Patienten [10].

Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Untersuchungen darüber, welche Auswirkung eine immunsuppressive Therapie auf myokardial vorliegendes B19V hat. Bis auf die allgemeine Annahme, dass bei einer immunsuppressiven Therapie von Viren mit einer erhöhten Virusreplikation gerechnet werden muss [110], liegen keine Anhaltspunkte vor, weshalb B19V-positive Patienten nicht immunsuppressiv behandelt werden sollten.

In dieser Arbeit wurden retrospektiv die Daten von 32 B19V-positiven Patienten, die aufgrund einer myokardialen Inflammation sechs Monate lang immunsuppressiv therapiert wurden, ausgewertet und mit den Daten eines identisch therapierten virusnegativen Kontrollkollektives von 20 Patienten verglichen.

Die Patienten verbesserten sich hinsichtlich ihrer klinischen Ergebnisse. Es bestand weder zu Therapiestart noch Therapieende ein signifikanter Unterschied zwischen B19V-positiven und virusnegativen Patienten. Innerhalb der Untersuchungsgruppen war die Verbesserung der LVEF signifikant. Der Anstieg der B19V-DNA-Kopien unter immunsuppressiver Therapie war nicht signifikant ($p = 0,551$).

Auch wenn die Pathomechanismen des B19V im Zusammenspiel mit Prednisolon nicht bekannt sind, könnte die immunsuppressive Therapie vielleicht vielen Patienten eine bisher verwehrt Behandlungsoption eröffnen – besonders in Hinblick auf die lebenslange Persistenz und z.T. hohe Inzidenz des B19V in der europäischen Bevölkerung [3-5,7,28]. Weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven sind nötig, um die Daten dieser Arbeit zu verifizieren und Informationen über das Langzeitoutcome B19V-positiver immunsuppressiv behandelter Patienten zu erhalten.

Literatur

1. Tschöpe C, Bock C-T, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P-L, Pauschinger M, Poller W-C, Kühl U, Kandolf R, Schultheiß H-P. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 2005;111:879-886.
2. Pankuweit S. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Human Pathology* 2003;34:497-503.
3. Norja P, Hokynar K, Aaltonen L-M, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B, Fischer H-P, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:7450-7453.
4. Anderson LJ, Tsou C, Parker RA, Chorba TL, Wulff H, Tattersall P, Mortimer PP. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology* 1986;24:522-526.
5. Tsujimura M, Matsushita K, Shiraki H, Sato H, Okochi K, Maeda Y. Human parvovirus B19 infection in blood donors. *Vox sanguinis* 1995;69:206-212.
6. Berner R, Bialek R, Borte M, Forster J, Heining U, Liese JG, Nadal D, Roos R, Scholz H. *DGPI Handbuch: Infektionen bei Kindern und Jugendlichen*. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2013:424
7. Röhrer C, Gärtner B, Sauerbrei A, Böhm S, Hottenträger B, Raab U, Thierfelder W, Wutzler P, Modrow S. Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiology and infection* 2008;136:1564-1575.
8. Rigopoulos AG, Klutt B, Matiakis M, Apostolou A, Mavrogeni S, Noutsias M. Systematic Review of PCR Proof of Parvovirus B19 Genomes in Endomyocardial Biopsies of Patients Presenting with Myocarditis or Dilated Cardiomyopathy. *Viruses* 2019;11:566-582.
9. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003;107:857-863.
10. Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *European heart journal* 2009;30:1995-2002.
11. Escher F, Kühl U, Lassner D, Poller W, Westermann D, Pieske B, Tschöpe C, Schultheiß H-P. Long-term outcome of patients with virus-negative chronic myocarditis or inflammatory cardiomyopathy after immunosuppressive therapy. *Clinical research in cardiology: official journal of the German Cardiac Society* 2016;105:1011-1020.
12. Schultheiß HP, Piper C, Sowade K. The effect of subcutaneous treatment with interferon-beta-1b over 24 weeks on safety, virus elimination and clinical outcome in patients with chronic viral cardiomyopathy. *Circulation* 2008;118:2309-2317.

13. Schultheiß H-P, Piper C, Sowade O, Waagstein F, Kapp J-F, Wegscheider K, Groetzbach G, Pauschinger M, Escher F, Arbustini E, Siedentop H, Kühl U. Betaferon in chronic viral cardiomyopathy (BICC) trial: Effects of interferon-beta treatment in patients with chronic viral cardiomyopathy. *Clinical research in cardiology: official journal of the German Cardiac Society* 2016;105:763-773.
14. Kühl U, Lassner D, Schlippenbach J von, Poller W, Schultheiß H-P. Interferon-Beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 2012;60:1295-1296.
15. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiß H-P. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003;107:2793-2798.
16. Schmidt-Lucke C, Spillmann F, Bock T, Kühl U, van Linthout S, Schultheiß H-P, Tschöpe C. Interferon beta modulates endothelial damage in patients with cardiac persistence of human parvovirus b19 infection. *The Journal of infectious diseases* 2010;201:936-945.
17. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841-842.
18. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. 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* 2006;113:1807-1816.
19. Dominguez F, Kühl U, Pieske B, Garcia-Pavia P, Tschöpe C. Update on Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy: Reemergence of Endomyocardial Biopsy. *Revista espanola de cardiologia (English ed.)* 2016;69:178-187.
20. Kühl U, Schultheiß H-P. Myocarditis: early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Deutsches Ärzteblatt international* 2012;109:361-368.
21. Schneider T, Widmer N, Noll G, Budak K. Myokarditis – eine wichtige Differentialdiagnose. *Swiss Medical Forum* 2012;12:812-816.
22. Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, Fu M, Heliö T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiß H-P, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European heart journal* 2013;34:2636-48, 2648a-2648d.
23. Schenk T, Enders M, Pollak S, Hahn R, Huzly D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without

- myocarditis or dilative cardiomyopathy. *Journal of clinical microbiology* 2009;47:106-110.
24. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CPL, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiß H-P, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003;108:945-950.
 25. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiß H-P. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005;111:887-893.
 26. Kandolf R, Bultmann B, Klingel K, Bock C-T. Molekulare Mechanismen und Konsequenzen kardialer Virusinfektionen. *Der Pathologe* 2008;29:112-117.
 27. Kandolf R. Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2004;129:2187-2192.
 28. Söderlund M, Essen R von, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *The Lancet* 1997;349:1063-1065.
 29. Cohen BJ, Buckley MM. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *Journal of medical microbiology* 1988;25:151-153.
 30. Tschöpe C, Kühl U. Myokarditis und entzündliche Kardiomyopathie - aktuelle Behandlungsmöglichkeiten. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2015;141:95-102.
 31. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *The Lancet* 1975;1:72-73.
 32. Parvovirus B19. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2010;53:944-956.
 33. Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie*. 4th ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2009:258
 34. Modrow S, Gärtner B. Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Deutsches Ärzteblatt* 2006;103:A2870-2876.
 35. Reid DM, Brown T, Reid TMS, Rennie JAN, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *The Lancet* 1985;325:422-425.
 36. Bock C-T, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *The New England Journal of Medicine* 2010;362:1248-1249.
 37. Bock C-T, Klingel K, Aberle S, Duechting A, Lupescu A, Lang F, Kandolf R. Human parvovirus B19: a new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 2005;52:340-343.
 38. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, Young NS. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *The New England Journal of Medicine* 1994;330:1192-1196.
 39. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993;262:114-117.

40. Liu JM, Green SW, Shimada, Takashi, Young, Neal S. A Block in Full-Length Transcript Maturation in Cells Nonpermissive for B19 Parvovirus. *Journal of Virology* 1992;66:4686-4692.
41. Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, Siegl G. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* 1990;175:247-254.
42. Heegaard ED BK. Human parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews* 2002 Jul;15:485-505.
43. Berns KI. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Howley RM, Chanock JL, Melnick TP, Monath BR, Straus SE, Hrsg. *Fields virology*. 2. Auflage. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1996:2173-2197.
44. Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *Journal of Virology* 1987;61:2627-2630.
45. Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR, Tattersall P. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *Journal of Virology* 1986;60:548-557.
46. Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *Journal of Virology* 1986;58:921-936.
47. Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, Landenberg P von, Hoffmann JH, Drobnik W, Modrow S. The VP1 Unique Region of Parvovirus B19 and Its Constituent Phospholipase A2-Like Activity. *Journal of Virology* 2002;76:2014-2018.
48. Horn F. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Thieme; 2009:413
49. Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T, Young N. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *Journal of Virology* 1987;61:2395-2406.
50. Raab U, Bauer B, Gigler A, Beckenlehner K, Wolf H, Modrow S. Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19. *The Journal of general virology* 2001;82:1473-1480.
51. Verdonschot J, Hazebroek M, Merken J, Debing Y, Dennert R, Brunner-La Rocca H-P, Heymans S. Relevance of cardiac parvovirus B19 in myocarditis and dilated cardiomyopathy: review of the literature. *European journal of heart failure* 2016;18:1430-1441.
52. Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller H-H, Doyle S, Modrow S. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* 2002;293:86-93.
53. Schmidt-Lucke C, Zobel T, Schrepfer S, Kühl U, Wang D, Klingel K, Becher PM, Fechner H, Pozzuto T, van Linthout S, Lassner D, Spillmann F, Escher F, Holinski S, Volk H-D, Schultheiß H-P, Tschöpe C. Impaired Endothelial Regeneration Through Human Parvovirus B19-Infected Circulating Angiogenic Cells in Patients With Cardiomyopathy. *The Journal of infectious diseases* 2015;212:1070-1081.

54. Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R, Giorgi V de, Di Lollo S, Azzi A. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *Journal of medical virology* 2008;80:2005-2011.
55. Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T. Regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha Promoter by Human Parvovirus B19 NS1 through Activation of AP-1 and AP-2. *Journal of Virology* 2002;76:5395-5403.
56. Mitchell LA. Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein as a transactivator of interleukin-6 synthesis: common pathway in inflammatory sequelae of human parvovirus infections? *Journal of medical virology* 2002;67:267-274.
57. Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock C-T. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *Journal of Virology* 2008;82:7942-7952.
58. Tsay GJ, Zouali M. Unscrambling the role of human parvovirus B19 signaling in systemic autoimmunity. *Biochemical pharmacology* 2006;72:1453-1459.
59. Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, Hirano T, Sugamura K. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *Journal of Virology* 1996;70:8485-8491.
60. Kerr JR, Cunniffe VS. Antibodies to parvovirus B19 non-structural protein are associated with chronic but not acute arthritis following B19 infection. *Rheumatology* 2000;39:903-908.
61. Momoeda M, Wong S, Kawase M, Young NS, Kajigaya S. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *Journal of Virology* 1994;68:8443-8446.
62. Kerr JR, Curran MD, Moore JE, Erdman DD, Coyle PV, Nunoue T, Middleton D, Percy Ferguson W. Genetic diversity in the non-structural gene of parvovirus B19 detected by single-stranded conformational polymorphism assay (SSCP) and partial nucleotide sequencing. *Journal of Virological Methods* 1995;53:213-222.
63. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 2003;374:1-20.
64. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: From protection to failure. *Pharmacology & therapeutics* 2008;120:172-185.
65. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: The gp130-STAT3 axis. *Basic research in cardiology* 2007;102:279-297.
66. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J-P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *Journal of Virology* 2004;78:12169-12178.
67. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag; 2010:635-652

68. Hemauer A, Poblitzki A von, Gigler A, Cassinotti P, Siegl G, Wolf H, Modrow S. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *The Journal of general virology* 1996;77 (Pt 8):1781-1785.
69. Hemauer A, Gigler A, Searle K, Beckenlehner K, Raab U, Broliden K, Wolf H, Enders G, Modrow S. Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *Journal of medical virology* 2000;60:48-55.
70. Li Y, Wang J, Zhu G, Zhang X, Zhai H, Zhang W, Wang W, Huang G. Detection of parvovirus B19 nucleic acids and expression of viral VP1/VP2 antigen in human colon carcinoma. *The American journal of gastroenterology* 2007;102:1489-1498.
71. Wang J, Zhang W, Liu H, Di Wang, Wang W, Li Y, Wang Z, Wang L, Zhang W, Huang G. Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto's thyroiditis in adults. *The Journal of infection* 2010;60:360-370.
72. Polcz ME, Adamson LA, Datar RS, Fowler LJ, Hobbs JA. Detection of parvovirus B19 capsid proteins in testicular tissues. *Urology* 2012;79:744.e9-15.
73. Zakrzewska K, Corcioli F, Carlsen KM, Giuggioli D, Fanci R, Rinieri A, Ferri C, Azzi A. Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients. *Intervirology* 2009;52:279-282.
74. Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95:8227-8232.
75. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *Journal of Virology* 2001;75:4110-4116.
76. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 2003;102:3927-3933.
77. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Koderia T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 2005;106:3449-3456.
78. Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr J-J, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Medical microbiology and immunology* 2004;193:101-107.
79. Kerr JR, Kaushik N, Fear D, Baldwin DA, Nuwaysir EF, Adcock IM. Single-nucleotide polymorphisms associated with symptomatic infection and differential human gene expression in healthy seropositive persons each implicate the cytoskeleton, integrin signaling, and oncosuppression in the pathogenesis of human parvovirus B19 infection. *The Journal of infectious diseases* 2005;192:276-286.
80. Polcz ME, Adamson LA, Lu X, Chang MN, Fowler LJ, Hobbs JA. Increased IL-6 detection in adult and pediatric lymphoid tissue harboring parvovirus B19. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2013;57:233-238.

81. Adamson-Small LA, Ignatovich IV, Laemmerhirt MG, Hobbs JA. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus research* 2014;190:8-16.
82. Bock C-T, Duchting A, Utta F, Brunner E, Sy BT, Klingel K, Lang F, Gawaz M, Felix SB, Kandolf R. Molecular phenotypes of human parvovirus B19 in patients with myocarditis. *World journal of cardiology* 2014;6:183-195.
83. Kühl U, Rohde M, Lassner D, Gross UM, Escher F, Schultheiß H-P. miRNA as activity markers in Parvo B19 associated heart disease. *Herz* 2012;37:637-643.
84. Sagar S, Liu PP, Cooper LT. Myocarditis. *The Lancet* 2012;379:738-747.
85. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 2000;342:1077-63.
86. Dec GW Jr, Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnsin RA. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies: Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *The New England Journal of Medicine* 1985;312:885-890.
87. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001;85:499-504.
88. Siegfried A, Michael T. Immunologie. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014:926.
89. Naegeli B. Myokarditis: Diagnostik und Verlauf. *Kardiovaskuläre Medizin* 2004;7:248-257.
90. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm M. Update on myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* 2012;59:779-792.
91. Fairweather D, Cooper LT, Blauwet LA. Sex and gender differences in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Current problems in cardiology* 2013;38:7-46.
92. Patriki D, Gresser E, Manka R, Emmert MY, Lüscher TF, Heidecker B. Approximation of the Incidence of Myocarditis by Systematic Screening With Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American College of Cardiology: Heart failure* 2018;6:573-579.
93. Berg J, Kottwitz J, Baltensperger N, Kissel CK, Lovrinovic M, Mehra T, Scherff F, Schmied C, Templin C, Lüscher TF, Heidecker B, Manka R. Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Myocarditis Reveals Persistent Disease Activity Despite Normalization of Cardiac Enzymes and Inflammatory Parameters at 3-Month Follow-Up. *Circulation. Heart failure* 2017;10:e004262.
94. Patriki D, Kottwitz J, Berg J, Landmesser U, Lüscher TF, Heidecker B. Clinical Presentation and Laboratory Findings in Men Versus Women with Myocarditis. *Journal of women's health (2002)* 2019;00:1-7.
95. Kühl U SHP. Spezifische Therapie der inflammatorischen und viralen Herzerkrankungen. *Journal of Cardiology* 2011;18:16-23.

96. Caforio ALP, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: Prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *European heart journal* 2007;28:1326-1333.
97. Grün S, Schumm J, Greulich S, Wagner A, Schneider S, Bruder O, Kispert E-M, Hill S, Ong P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Mahrholdt H. Long-term follow-up of biopsy-proven viral myocarditis: Predictors of mortality and incomplete recovery. *Journal of the American College of Cardiology* 2012;59:1604-1615.
98. Caforio ALP, Keeling PJ, Zachara E, Mestroni L, Camerini F, Mann JM, Bottazzo GF. Evidence from family studies for autoimmunity in dilated cardiomyopathy. *The Lancet* 1994;344:773-777.
99. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *European heart journal* 2007;28:1326-1333.
100. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of Outcome in Patients With Suspected Myocarditis. *Circulation* 2008;118:639-648.
101. Friedrich MG, Sechtem U, Schulz-Menger J, Holmvang G, Alakija P, Cooper LT, White JA, Abdel-Aty H, Gutberlet M, Prasad S, Aletras A, Laissy J-P, Paterson I, Filipchuk NG, Kumar A, Pauschinger M, Liu P. Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;53:1475-1487.
102. Lurz P, Eitel I, Adam J, Steiner J, Grothoff M, Desch S, Fuernau G, Waha S de, Sareban M, Luecke C, Klingel K, Kandolf R, Schuler G, Gutberlet M, Thiele H. Diagnostic performance of CMR imaging compared with EMB in patients with suspected myocarditis. *JACC: Cardiovascular imaging* 2012;5:513-524.
103. Gutberlet M, Spors B, Thoma T, Bertram H, Denecke T, Felix R, Noutsias M, Schultheiß HP, Kühl U. Suspected chronic myocarditis at cardiac MR: Diagnostic accuracy and association with immunohistologically detected inflammation and viral persistence. *Radiology* 2008;246:401-409.
104. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kühl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. 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* 2007;116:2216-2233.
105. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;119:479.

106. Hoppe UC, Böhm M, Drexler H, Hasenfuß G, Lemke B, Osterspey A, Pauschinger M. Kommentar zu den ESC-Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008. *Kardiologie* 2009;3:16-23.
107. Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Zeitschrift für Kardiologie* 2005;94:488-509.
108. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC 2016;37:2129-2200.
109. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, Placebo-Controlled Study for Immunosuppressive Treatment of Inflammatory Dilated Cardiomyopathy: Two-Year Follow-Up Results. *Circulation* 2001;104:39-45.
110. Kandolf R. Perikarditis und Myokarditis. In: Marre R, Benez A, Hrsg. *Klinische Infektiologie*. 1st ed. München: Urban & Fischer; 2000:338-348.
111. Strassburg CP, Beckebaum S, Geier A, Gotthardt D, Klein R, Melter M, Schott E, Spengler U, Tacke F, Trauner M, Weiler-Normann C, Weismüller T, Tannapfel A, Tischendorf J, Schramm C. S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2017;55:1135-1226.
112. Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Verbraucherschutz. Verordnung des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Verbraucherschutz über die Erweiterung der Meldepflicht für übertragbare Krankheiten und Krankheitserreger nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSGMeldeVO): Vorschrift-1307.31906, §2; 2002 [zitiert am 28.09.2019]. <https://www.revosax.sachsen.de/vorschrift/1307-IfSGMeldeVO#p2>.
113. Landesuntersuchungsanstalt Sachsen. LUA Jahresbericht 2011 - Tabellenteil; 2012 [zitiert am 28.09.2019]. <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/17071> (accessed 28. September 2019).
114. Landesuntersuchungsanstalt Sachsen. LUA-Jahrebericht 2012 Tabellenteil; 2013 [zitiert am 28.09.2019]. <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/31335> (accessed 28. September 2019).
115. Landesuntersuchungsanstalt Sachsen. LUA Jahresbericht 2013 Tabellenteil; 2014 [zitiert am 28.09.2019]. <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/22474> (accessed 28. September 2019).
116. Landesuntersuchungsanstalt Sachsen. LUA Jahresbericht 2014 Tabellenteil; 2015 [zitiert am 28.09.2019]. <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/24502> (accessed 28. September 2019).

117. Landesuntersuchungsanstalt Sachsen. LUA Jahresbericht 2015 Tabellenteil; 2016 [zitiert am 28.09.2019]. <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/26609> (accessed 28. September 2019).
118. Kaya B, Paydas S. Recurrence of Pure Red Cell Aplasia in a Kidney Transplant Recipient Due to Reactivation of Parvovirus B19 Infection Despite Two Cycles of Intravenous Immunoglobulin Therapy. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 2019;17:195-197.
119. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal* 2012;33:1787-1847.
120. Tschöpe C, Kherad B, Schultheiß H-P. How to perform an endomyocardial biopsy? *Türk Kardiyoloji Dernegi arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir* 2015;43:572-575.
121. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiß HP. Immunhistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 1996;75:295-300.
122. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Human Pathology* 1987;18:619-624.
123. Aretz HT. Diagnosis of myocarditis by endomyocardial biopsy. *Medical Clinics of North America* 1986;70:1215-1226.
124. Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz* 2000;25:200-209.
125. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiß H-P, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;42:466-472.
126. Rohayem J, Dinger J, Fischer R, Klingel K, Kandolf R, Rethwilm A. Fatal myocarditis associated with acute parvovirus B19 and human herpesvirus 6 coinfection. *Journal of clinical microbiology* 2001;39:4585-4587.
127. Muir SW, Murray J, Farquharson MA, Wheatley DJ, McPhaden AR. Detection of cytomegalovirus in upper gastrointestinal biopsies from heart transplant recipients: Comparison of light microscopy, immunocytochemistry, in situ hybridisation, and nested PCR. *Journal of clinical pathology* 1998;51:807-811.
128. Ambinder RF, Lambe BC, Mann RB, Hayward SD, Zehnbaauer BA, Burns WS, Charache P. Oligonucleotides for polymerase chain reaction amplification and

- hybridization detection of Epstein-Barr virus DNA in clinical specimens. *Molecular and cellular probes* 1990;4:397-407.
129. Kühl U, Lassner D, Pauschinger M, Gross UM, Seeberg B, Noutsias M, Poller W, Schultheiß H-P. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of medical virology* 2008;80:1243-1251.
 130. Kühl U, Lassner D, Dorner A, Rohde M, Escher F, Seeberg B, Hertel E, Tschöpe C, Skurk C, Gross UM, Schultheiß H-P, Poller W. A distinct subgroup of cardiomyopathy patients characterized by transcriptionally active cardiotropic erythrovirus and altered cardiac gene expression. *Basic research in cardiology* 2013;108:372.
 131. Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Glück B, Dannberg G, Stelzner A, Figulla HR. Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Medical microbiology and immunology* 2004;193:75-82.
 132. Ardehali H, Qasim A, Cappola T, Howard D, Hruban R, Hare JM., Baughman KL., Kasper EK. Endomyocardial biopsy plays a role in diagnosing patients with unexplained cardiomyopathy. *American heart journal* 2004;147:919-923.
 133. Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. 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. *Journal of the American College of Cardiology* 1992;19:43-47.
 134. Fowlers RE. Endomyocardial Biopsy. *Annals of Internal Medicine* 1982;97:885.
 135. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clinic Proceedings* 1989;64:1235-1245.
 136. Lotze U, Egerer R, Glück B, Zell R, Sigusch H, Erhardt C, Heim A, Kandolf R, Bock T, Wutzler P, Figulla H-R. Low level myocardial parvovirus B19 persistence is a frequent finding in patients with heart disease but unrelated to ongoing myocardial injury. *Journal of medical virology* 2010;82:1449-1457.
 137. Stewart GC, Lopez-Molina J, Gottumukkala RVSRK, Rosner GF, Anello MS, Hecht JL, Winters GL, Padera RF, Baughman KL, Lipes MA. Myocardial parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic phenotype in adults with heart failure. *Circulation: Heart failure* 2011;4:71-78.
 138. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Cryosectioning tissues. *CSH protocols* 2008 [zitiert am 01.12.2019]. 2008:pdb.prot4991. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/8/pdb.prot4991.full>
 139. Escher F, Kühl U, Lassner D, Stroux A, Westermann D, Skurk C, Tschöpe C, Poller W, Schultheiß H-P. Presence of perforin in endomyocardial biopsies of patients with inflammatory cardiomyopathy predicts poor outcome. *European journal of heart failure* 2014;16:1066-1072.
 140. Escher F, Kühl U, Sabi T, Suckau L, Lassner D, Poller W, Schultheiß H-P, Noutsias M. Immunohistological detection of Parvovirus B19 capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients. *Medical science*

monitor: international medical journal of experimental and clinical research 2008;14:CR333-338.

141. Greulich S, Kindermann I, Schumm J, Perne A, Birkmeier S, Grun S, Ong P, Schaufele T, Klingel K, Schneider S, Kandolf R, Bohm M, Sechtem U, Mahrholdt H. Predictors of outcome in patients with parvovirus B19 positive endomyocardial biopsy. *Clinical research in cardiology: official journal of the German Cardiac Society* 2016;105:37-52.
142. Escher F, Kühl U, Lassner D, Stroux A, Gross U, Westermann D, Pieske B, Poller W, Schultheiß H-P. High Perforin-Positive Cardiac Cell Infiltration and Male Sex Predict Adverse Long-Term Mortality in Patients With Inflammatory Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association* 2017;6:e005352.
143. Kandolf R. Virusätiologie der inflammatorischen Kardiomyopathie. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2004;129:2187-2192.
144. Ruppert V, Meyer T, Balbach A, Richter A, Müller H-H, Maisch B, Pankuweit S. Genotype-specific effects on left ventricular function in parvovirus B19-positive patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of medical virology* 2011;83:1818-1825.
145. Klein RM, Jiang H, Niederacher D, Adams O, Du M, Horlitz M, Schley P, Marx R, Lankisch MR, Brehm MU, Strauer BE, Gabbert HE, Scheffold T, Gulker H. Frequency and quantity of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsies from patients with suspected myocarditis or idiopathic left ventricular dysfunction. *Zeitschrift für Kardiologie* 2004;93:30-309.
146. Kuethe F, Sigusch HH, Hilbig K, Tresselt C, Glück B, Egerer R, Figulla HR. Detection of viral genome in the myocardium: Lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy. *American heart journal* 2007;153:850-858.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Saskia Schlieker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Bedeutung einer Parvovirusinfektion bei einer Myokarditis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Saskia Schlieker hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Tschöpe C, Elsanhoury A, Schlieker S, van Linthout S, Kühl U. Immunosuppression in inflammatory cardiomyopathy and parvovirus B19 persistence. *European Journal of Heart Failure* 2019 Nov; 21 (11): 1468-1469. doi: 10.1002/ejhf.1560

Beitrag im Einzelnen:

Die Daten der oben genannten Publikation beziehen sich zum Großteil auf das gleiche Patientenkollektiv wie die Daten der Dissertation. Für meine Dissertation habe ich die verwendeten Analysedaten aus den jeweiligen Patientenakten zusammengetragen. Der daraus entstandene Datensatz wurde zum einen für meine Dissertation, zum anderen für die Weiterarbeit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Tschöpe verwendet. Die Arbeitsgruppe publizierte die Ergebnisse in Form einer Poster Session auf dem Heart Failure 2018 and Word Congress on Acute Heart Failure und 2019 im *European Journal of Heart Failure* (EJHF).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.