

Reinhard Dettmeyer

Plötzlicher Kindstod

(Sudden Infant Death Syndrome; SIDS)

Neue Aspekte zur Bedeutung der
virusbedingten Herzmuskelentzündung

Berichte aus der Medizin

Reinhard Dettmeyer

Plötzlicher Kindstod
(Sudden Infant Death Syndrome; SIDS)

Neue Aspekte zur Bedeutung der
virusbedingten Herzmuskelentzündung

Shaker Verlag
Aachen 2004

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Copyright Shaker Verlag 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-2469-6

ISSN 0945-0890

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Geleitwort

Zur Ätiologie und Pathogenese des plötzlichen Kindstodes (SIDS) existieren mehr als 100 Theorien – ein sicheres Anzeichen dafür, dass die Ursachen des SIDS bis heute nicht geklärt sind. Saisonale Häufungen legten bereits seit langem die Hypothese einer Infektion – vor allem der Atemwege – als Ursache des SIDS nahe, bei der Akuität des Todeseintritts war jedoch auch an Infektionen des Herzens zu denken. Der Hypothese einer viralen Myokarditis als zumindest Teilursache des Phänomens ‚Plötzlicher Kindstod‘ geht Herr PD Dr. Dr. Dettmeyer an einem prospektiv zusammengetragenen Untersuchungskollektiv plötzlich verstorbener Säuglinge mit immunhistochemischen und molekularpathologischen Methoden nach. Untersucht wurden bislang Entero-, Parvo-, Adeno- und Epstein-Barr-Viren, die nach Extraktion aus Myokardgewebe mittels PCR und RT-PCR nachgewiesen wurden. Parallel hierzu wurden immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von Entzündungsmarkern durchgeführt. In Analogie zur in der klinischen Myokarditisdiagnostik an Myokardbiopsien etablierten Grenzwerten wurden erstmals für das Säuglingsalter Grenzwerte vorgeschlagen, die zum Teil die sichere Diagnose, zum Teil die Verdachtsdiagnose einer Myokarditis erlauben, die mit konventionell-histologischen Methoden nach der Dallas-Klassifikation nicht zu stellen gewesen wäre.

Durch den Einsatz hochspezifischer und sensitiver molekularpathologischer PCR und RT-PCR Analysen gelang es, Enteroviren, Parvovirus-B19, Epstein-Barr-Virus sowie Adenoviren aus Myokardgewebe nachzuweisen. An fallgleichem Kontrollgewebe von Leber und Milz verlief der Nachweis jeweils negativ, ebenso am altersgleichen Kontrollkollektiv. Diese Ergebnisse der Untersuchungen von Herrn PD Dr. Dr. Dettmeyer sind außerordentlich innovativ und legen nahe, dass sich hinter ca. 20 % der SIDS – Fälle mit konventionellen Methoden nicht, molekularpathologisch und immunhistochemisch jedoch fassbare Myokarditiden als Todesursache verbergen. In dieser Arbeit wurde erstmals an einem größeren Kollektiv systematisch die Bedeutung viraler Myokarditiden beim SIDS untersucht und ein Vorschlag zur immunhistochemischen Myokarditisdiagnostik durch Quantifizierung interstitieller myokardialer Leukozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen unterbreitet. Wenn daneben noch weitere, hier nicht analysierte Erreger wie z.B. Influenza-Viren, Zytomegalie-Viren usw. berücksichtigt werden, finden somit viele SIDS-Fälle als virale Myokarditiden eine plausible Erklärung. Diese von Herrn PD Dr. Dr. Dettmeyer erarbeiteten Resultate sind weit über die morphologische SIDS-Forschung hinaus auch für die Klinik (Pädiatrie, Infektiologie) von Relevanz, daher ist dieser Monographie eine weite Verbreitung bei Rechtsmedizinern, Pathologen und Klinikern zu wünschen. Die Untersuchungsergebnisse sind auch Ausdruck einer gegenüber anderen Studien

überlegenen Untersuchungsstrategie hinsichtlich Anzahl der pro Fall untersuchten Myokardproben, der benutzten Fixative und Fixationsdauer, die maßgeblich den Ausfall immunhistochemischer Färbungen bzw. den Nachweis viraler DNA und RNA determinieren. Damit hat Herr PD Dr. Dr. Dettmeyer zugleich Standards für zukünftige morphologische und molekularpathologische Untersuchungen zum Myokarditisnachweis beim Phänomen des ‚Plötzlichen Kindstodes‘ vorgelegt. Die innovativen Ergebnisse dieser Arbeit stellen einen ganz wichtigen Fortschritt in der Aufklärung des SIDS dar und werden mit Sicherheit weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet anstoßen.

Bonn, im Januar 2004

Prof. Dr. med. Burkhard Madea

Vorwort

Zahlreiche epidemiologische Studien konnten in den letzten Jahren und Jahrzehnten Risikofaktoren für das Phänomen des 'Plötzlichen Kindstodes' (Sudden Infant Death Syndrome; SIDS) erarbeiten: u.a. Frühgeburtlichkeit, Nikotinabusus insbesondere der Mutter, Betten des Säuglings in Bauchlage / Seitenlage, Unterlassenes Stillen, Überwärmung des Säuglings. Aufklärungskampagnen zur Vermeidung dieser Risikofaktoren haben zu einem deutlichen Rückgang der Fälle von 'Plötzlichen Kindstod' geführt. Dennoch konnte in der überwiegenden Zahl der Fälle von 'Plötzlichem Kindstod' auch durch umfangreiche Untersuchungen bislang keine plausible Todesursache nachgewiesen werden.

Die vorliegende, 1996 begonnene Arbeit, ist entstanden aus der These des Verfassers, dass jedenfalls in einem bedeutenden Teil der Fälle von 'Plötzlichem Kindstod' eine Virusinfektion des Herzmuskels (Myokarditis) todesursächlich sein könnte und diese Todesursache mit den früher zur Verfügung stehenden Methoden diagnostisch nicht oder nur selten nachgewiesen werden konnte. Erst die Etablierung neuerer immunhistochemischer und molekularpathologischer Techniken eröffnete den Weg für systematische, prospektive Untersuchungen von Herzmuskelproben unter weitestgehend standardisierten Bedingungen mit diesen neuen Methoden. Die immunhistochemische Darstellung inflammatorischer Prozesse im Myokard, verbunden mit dem Nachweis von Viren bzw. viralem Genom im Herzmuskel – wie hier erstmals an einem größeren Untersuchungsgut durchgeführt – führte zur Diagnose einer letalen, viralen Myokarditis als einer plausiblen Todesursache mit einer deutlich höheren Indidenz als bislang angenommen wurde. Angesichts des Spektrums an potentiellen Erregern einer viralen Myokarditis eröffnet sich jetzt bei einem Teil der SIDS-Opfer ein aussichtsreicher Weg zur Klärung der Todesursache, auch in bislang nicht geklärten Fällen von 'Plötzlichem Kindstod'. Die Ergebnisse dieser Arbeit entstammen der Habilitationsschrift des Verfassers vom Sommersemester 2003.

Die zum Teil aufwendigen und methodisch anspruchsvollen Untersuchungen waren nur möglich dank der Unterstützung zahlreicher Personen, Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Bonner Instituts für Rechtsmedizin. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Madea, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn, für die Schaffung der erforderlichen Arbeitsmöglichkeiten und seine über Jahre hervorragende und kontinuierliche Unterstützung der Forschungsarbeiten. Weiterhin gebührt besonderer Dank Frau Dr. A. Baasner, die als Molekularbiologin ganz wesentlich zum erfolgreichen Nachweis viralen Genoms in Gewebeproben vom Herzmuskel der verstorbenen Säuglinge beigetragen hat.

Weiterer Dank für Hilfestellung, konstruktive Kritik, wertvollen Rat und Unterstützung im beruflichen Alltag gilt: Dr. S. Banaschak, Dr. J. Becker, Prof. Dr. W. Büttner, J. Brünig, Dr. U. Cremer, U. Diekmann, Dr. F. Driever, Priv.-Doz. Dr. Eis-Hübinger, C. Haag, Dr. R. Kaiser, Prof. Dr. R. Kandolf, R. Klemmer, Prof. Dr. G. Knöpfle, C. König, H. Körner, Dr. L. Kröner, L. Lachenmeier, H. Langer, Prof. Dr. M. Lentze, Priv.-Doz. Dr. F. Musshoff, Dr. S.A. Padosch, Dr. R. Rissland, Dr. M. Schlamann, Priv.-Doz. Dr. K.-H. Schiwvy-Bochat, Priv.-Doz. Dr. P. Schmidt, H. Schoska, Dr. M. Stiel, S. Winkelmann.

Die Arbeit wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG - Förderkennzeichen DE-814), vom 'Förderverein Rechtsmedizin an der Universität Bonn e.V.' sowie durch Privatspenden betroffener Eltern.

Bonn, im Januar 2004

Priv.-Doz. Dr. Dr. R. Dettmeyer

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Rechtsmedizinische Aspekte des plötzlichen und unerwarteten Todes im Säuglingsalter	5
1.1.1	Bisherige Untersuchungsergebnisse	6
1.1.1.1	Phänomenologie	6
1.1.1.2	Risikofaktoren	7
1.1.1.3	SIDS-Inzidenz und Schlafposition	9
1.1.1.4	Jahreszeitliche Verteilung	11
1.1.1.5	Auffindeposition	12
1.1.2	Theorien zur Todesursache beim Phänomen des sogenannten plötzlichen Säuglingstodes (Sudden Infant Death Syndrome; SIDS)	13
1.1.3	Die infektiologische Hypothese	15
1.1.4	Die virusbedingte Herzmuskelentzündung - Myokarditis	18
1.2	Morphologische Diagnostik beim plötzlichen Säuglingstod	20
1.2.1	Äußere Leichenschau und makroskopische Obduktionsbefunde	20
1.2.1.1	Makroskopisch häufige Obduktionsbefunde beim plötzlichen Säuglingstod	21
1.2.1.2	Mikroskopische Diagnostik – Befunde an autoptisch entnommenen Organproben (außer Myokard)	21
1.2.3	Mikroskopische Befunde an Myokardproben	23
1.3	Serologisch-mikrobiologische bzw. virologische Untersuchungen	25
1.4	Pathophysiologie und Diagnostik der viralen Myokarditis	25
1.5	Myokarditiden im Säuglings- und Kindesalter	29
2.	Untersuchungen zur Diagnostik virusbedingter Herzmuskelentzündungen -Fragestellungen	29

3.	Material und Methoden	31
3.1	Material	31
3.1.1	SIDS-Kollektiv	31
3.1.2	Altersgleiches Kontrollkollektiv	33
3.1.3	Zusatzkollektiv für molekularpathologische Untersuchungen	34
3.1.4	Asservation	35
3.1.5	Fixative, Verwendete Substanzen, Antikörper	36
3.1.5.1	Phosphatgepuffertes Neutralformalin (pH 7,0)	36
3.1.5.2	NoTox (alternatives Fixativ)	37
3.1.5.3	Molekularpathologische Virusdiagnostik	37
3.2	Serologisch-mikrobiologische Untersuchungen	41
3.3	Chemisch-toxikologische Untersuchungen	41
4.	Auswertung	43
4.1	Konventionell-histologische Diagnostik	43
4.2	Immunhistochemie	43
4.3	Auswertung: Neutral phophat-gepuffertes Formalin versus NoTox	43
4.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	44
4.4.1	Zählmethode	44
4.4.2	LCA, CD45R0, CD68 – Qualifizierung und Quantifizierung	45
4.4.3	MHC-Klasse-II-Moleküle	45
4.4.4	VP1-Kapsid-Protein	45
4.4.5	C5b-9-Komplement-Komplex	45
4.4.6	Weitere getestete Primärantikörper	45
4.5	Auswertung der molekularpathologischen Untersuchungen	46
5.	Ergebnisse	47

5.1	Konventionell-histologische Diagnostik	47
5.1.1	Altersgleiches Kontrollkollektiv	47
5.1.2	SIDS-Kollektiv	47
5.2	Immunhistochemie	50
5.2.1	LCA, CD45R0, CD68	50
5.2.2	MHC-Klasse-II-Moleküle	54
5.2.3	C5b-9-terminaler Komplement-Komplex	60
5.2.4	VP1-Kapsid-Protein der Enteroviren	60
5.3	Molekularpathologische Untersuchungen	61
5.3.1	SIDS-Kollektiv	61
5.3.2	Kontrollkollektiv und Zusatzkollektiv	67
5.4	Vergleichende Betrachtung der immunhistochemischen Quantifizierung interstitieller myokardialer Leukozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen im SIDS- und Kontrollkollektiv	69
5.4.1	Immunhistochemische Qualifizierung und Quantifizierung	69
5.4.2	Auswertung bei Annahme von diagnostischen Grenzwerten	73
5.5	Serologisch-Mikrobiologische Untersuchungen	74
6.	Diskussion	79
6.1	Infektiologische Genese des plötzlichen Säuglingstodes und Myokarditis	80
6.2	Asservation, Autolyse, Fixation, Detektion – Immunhistochemie	81
6.3	Konventionell-histologische und immunhistochemische Myokarditisdiagnostik	83
6.4	Zelluläre und nicht-zelluläre immunhistochemische Myokarditisdiagnostik	84
6.4.1	Zählmethode	84
6.4.2	Diagnostisch verwertbare Grenzwerte – Leukozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen	85
6.4.2.1	LCA ⁺ -Leukozyten	85
6.4.2.2	CD45R0 ⁺ -T-Lymphozyten	86
6.4.2.3	CD68 ⁺ -Makrophagen	86
6.5	Diagnostische Grenzwerte zellulärer immunhistochemischer Marker für das Säuglingsalter	87

6.6	MHC-Klasse-II-Moleküle	89
6.7	C5b-9-terminaler Komplement-Komplex	90
6.8	Molekularpathologische Diagnostik – Methodik	91
6.9	Molekulare Pathologie der Viren	93
6.9.1	Enteroviren	93
6.9.2	Parvovirus B19	95
6.9.3	Adenoviren	96
6.9.4	Epstein-Barr-Virus	97
6.10	Interpretation des intramyokardialen Virusnachweises	98
6.11	Mikrobiologisch-serologische Untersuchungen	101
7.	Zusammenfassung	102
8.	Ausblick	105
9.	Literaturverzeichnis	106
10.	Anhang	141

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

AV	Adenoviren
bp	Basenpaare
CAR	Coxsackie-ade noviraler Rezeptor
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CVB3	Coxsackievirus B3
DAD	Dioden-array-Detektion
DNA	Desoxiribonucleid acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
ESPID	European Society for the Prevention of Infant Deaths
EV	Enteroviren
GC / MS	Gaschromatographisch / Massenspektro- metrisch
HHSV6	Humanes Herpes Simplex Virus Typ 6
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPF	High Power Field
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule-1
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KBR	Komplementbindungsreaktion
KO	Kontrolle
LCA	Leucocyte Common Antigen
LSAB	Labeled (Strept-)Avidin-Biotin
mAK	monoklonaler Antikörper

MHC	Major Histocompatibility Complex
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nucl. Pos.	Nucleotid Position
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVB19	Parvovirus B19
RNA	Ribonucleic Acid
RSV	Retikulo-syncytiales Virus
RT	Reverse Transcriptase
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
TCR	T-Cell-Receptor
UpM	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VP	Virales Protein