

**Eignung**  
**kommerziell erhältlicher**  
**Enzym-Immun-Testsätze**  
**zum Nachweis**  
**von Antikörpern gegen Enteroviren**  
**für die Diagnostik, insbesondere bei**  
**kardialer Symptomatik**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Dokortitels der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von  
Fröhlich, Uwe, geb. Reinhard  
aus Pforzheim

Giessen, 2006

Aus dem  
Institut für Medizinische Virologie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor/Leiter:

Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfram Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Gerlich

Gutachter: HDoz. Dr. M. Niepmann

Tag der Disputation: 01.03.2007

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>A.</b>	<b>Abkürzungen</b>	5
<b>B.</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	6
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	8
1.1.	Die Enteroviren	8
1.1.1.	Klassifizierung	8
1.1.2.	Antigencharakteristik	9
1.1.3.	Pathogenese und Pathologie	9
1.1.4.	Erkrankungen	10
1.1.4.1.	Allgemein	10
1.1.4.2.	Myokarditis	10
1.1.5.	Diagnostik	13
1.2.	Problemstellung	17
<b>2.</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	21
2.1.	Patienten und Material	21
2.2.	Methoden	23
2.2.1.	Testprinzip	23
2.2.2.	Methodik der unterschiedlichen Testfabrikate im Einzelnen	25
2.2.2.1.	Test der Firma invitro	25
2.2.2.2.	Test der Firma Virofem	26
2.2.2.3.	Test der Firma Virotech	26
2.2.3.	Durchführung der Adsorption	27
2.2.3.1.	Tests der Firmen invitro und Virofem	27
2.2.3.2.	Test der Firma Virotech	27
2.2.4.	Normierung der Ergebnisse	27
2.3.	Statistische Auswertung	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	29
3.1.	Daten aus den Einsendeformularen und aus den Krankenakten	29
3.1.1.1.	Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Verdacht auf Myokarditis	29
3.1.1.2.	Statistische Auswertung der Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Verdacht auf Myokarditis	30
3.1.2.1.	Jahreszeitliche Verteilung des Erkrankungsbeginns	33
3.1.2.2.	Statistischen Auswertung der jahreszeitlichen Verteilung des Erkrankungsbeginns	34
3.1.3.1.	Verteilung der Einsendedaten	35
3.1.3.2.	Statistischen Auswertung der Verteilung des Einsendedatums	36

3.2.	ELISA-Testergebnisse	36
3.2.1.	Ergebnisse des Tests der Firma invitro	36
3.2.2.	Ergebnisse des Tests der Firma Virofem	37
3.2.3.	Ergebnisse des Tests der Firma Virotech	37
3.2.4.	Testergebnisse im prozentualen Überblick	38
3.2.5.	Statistik der Testergebnisse	39
3.2.6.	Testergebnisse von Proben, die mit allen drei Testsätzen untersucht wurden	40
3.2.7.	Vergleich der Testsätze mit anderen Methoden	40
3.2.7.1.	ELISA-Testergebnisse aus Serumproben von Patienten mit Enterovirus-Nachweis	40
3.2.7.2.	ELISA-Testergebnisse aus Serumproben mit positivem Befund im Coxsackie-IgM-Antikörper-NT	43
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1.	Alters- und Geschlechtsverteilung	45
4.2.	Verteilung des Erkrankungsbeginns	45
4.3.	Verteilung des Einsendedatums	46
4.4.	ELISA Testergebnisse	47
4.4.1.	Ergebnisse der Testssätze einzeln betrachtet	47
4.4.2.	Vergleich der Testergebnisse der drei Testsätze	48
4.5.	Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit anderen Methoden	48
4.5.1.	Virotech und Virofem ELISA-Testergebnisse aus Serumproben von Patienten mit Enterovirus-Nachweis	48
4.5.2.	ELISA-Testergebnisse aus Serumproben mit positivem Befund im Coxsackie-IgM-Antikörper-NT	49
5.	Zusammenfassung/Abstract	51
6.	Literatur	53
7.	Danksagung	57
8.:	Lebenslauf	58
9.	Anhang	59

## A. Abkürzungen

Ak	–	Antikörper
ELISA	–	Enzyme linked immuno sorbent assay
EKG	–	Elektrokardiogramm
HHT	–	Hämagglutinationshemmtest
JLU	–	Justus-Liebig-Universität Gießen
KBR	–	Komplementbindungsreaktion
PBS	–	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	–	Polymerasekettenreaktion
RNA	–	Ribonukleinsäure
NT	–	Neutralisationstest
UV	–	Ultraviolett
z. n.	–	zitiert nach

## **B. Verwendete Materialien**

Waschapparat für Mikrotiterplatten der Firma SORIN

Photometer für Mikrotiterplatten der Firma Behring (Behring ELISA Prozessor)

### invitro:

- mit Coxsackie Virus Antigen (Typ B5, hitzeinaktiviert) beschichtete Mikroteststreifen mit je 8 Vertiefungen
- Coxsackie Virus IgM-positive Kontrolle, human, gebrauchsfertig, enthält 0,1 % Natriumazid
- Coxsackie Virus IgM-negative Kontrolle, human, gebrauchsfertig, enthält 0,1 % Natriumazid
- Coxsackie Virus IgA-positive Kontrolle, human, gebrauchsfertig, enthält 0,1 % Natriumazid
- Coxsackie Virus IgA-negative Kontrolle, human, gebrauchsfertig, enthält 0,1 % Natriumazid
- Anti-Human-IgM von der Ziege, Enzym-konjugiert, 100 x konzentriert, enthält 0,02 % Thimerosal
- Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline - PBS) mit Tween 20 für 1000 ml deionisiertes Wasser
- Additiv (Phenolrot-Lösung)
- Tetramethylbenzidin (Substrat für ELISAs, gebrauchsfertig)
- 1 M Schwefelsäure (Stopplösung für ELISAs)
- gebrauchsfertige Reaktionsbehälter mit Protein G-Voradsorptionslösung zur Entfernung von IgG-Ak

### Virofem:

- Mikrotiterplatten
- gebrauchsfertige Negativkontrolle
- gebrauchsfertige Positivkontrollen für IgA und IgM
- gebrauchsfertige IgA- und IgM-Konjugate

- Chromogen- und Substratlösung, kurz vor Gebrauch 1:1 zu mischen, enthält Tetramethylbenzidin
- gebrauchsfertige Stopplösung, 1 M Schwefelsäure
- Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) als Waschlösung
- gebrauchsfertige Reaktionsbehälter mit Protein G-Voradsorptionslösung zur Entfernung von IgG-Ak (identisch mit invitro, keine Angabe der Firma über genaue Zusammensetzung)

#### Virotech:

- Teststreifen mit je 8 Vertiefungen
- PBS, pH 7,2, mit Tween 20 und Merthiolat
- gebrauchsfertige menschliche Kontrollseren, negativ für anti-Enterovirus-IgM bzw. -IgA, stabilisiert mit Merthiolat
- gebrauchsfertige IgM- und IgA-Grenzwert („cut-off“)-Kontrollen, stabilisiert mit Merthiolat
- gebrauchsfertige menschliche Kontrollseren, positiv für anti-Enterovirus-IgM bzw. -IgA, stabilisiert mit Merthiolat
- Anti-human-IgM und -IgA vom Schaf, mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert
- Tetramethylbenzidin (Substrat für ELISAs, gebrauchsfertig)
- Citrat-Stopplösung
- „RF-SorboTech“ (gebrauchsfertige Lösung zur Entfernung von IgG-Ak, besteht aus anti-human IgG von der Ziege)

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Enteroviren**

#### **1.1.1. Klassifizierung**

Die Enteroviren sind ein Genus in der Familie der Picornaviridae. Neben den Enteroviren gibt es noch zwei weitere Genera von menschenpathogenen Picornaviren, die Rhinoviren und die Hepatoviren. Auch das in Ausnahmefällen menschenpathogene Maul- und Klauenseuchevirus gehört zur Familie der Picornaviren. Die ikosaedrischen Picornaviren haben einen Durchmesser von ungefähr 30 nm und enthalten als Genom eine (+)-Strang RNA. Die RNA ist von einem sphärischen Kapsid aus 60 identischen Untereinheiten, die aus je 4 Proteinen aufgebaut sind, umgeben. (02Doe).

Die Enteroviren unterteilt man in Polioviren (3 Serotypen), Coxsackie A Viren (23 Serotypen), Coxsackie B Viren (6 Serotypen), Echoviren (28 Serotypen) und Enteroviren (4 Serotypen). Einige der früher zu den Enteroviren gerechneten Serotypen wurden reklassifiziert und werden jetzt als eigene Genera geführt (02Doe). Das Hepatitis-A-Virus, zeitweise ebenfalls zu den Enteroviren gerechnet (Enterovirus 72), wird heute im Genus Hepatovirus geführt (01Fie, 02Doe). Es wird auch an einem neuen Klassifikationsschema für Picornaviren gearbeitet, in dem das Genus Enteroviren in Polioviren, Humane Enteroviren A-D, Rinder Enteroviren und Schweine Enteroviren A-B unterteilt wird (01Fie). Die Serotypen der Enteroviren können immunologisch durch Neutralisation (Blockierung der Infektiosität) mit spezifischen Antikörpern unterschieden werden, die nur auf das homotypische Virus, also das Virus des gleichen Serotyps, wirken.

Das Poliovirus war das erste identifizierte Enterovirus. Die Entdeckung und Einteilung der Coxsackie- und Echoviren war ein Nebenprodukt der Polioforschung.

Enteroviren sind weltweit verbreitet und verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen, die unter 1.1.4. näher behandelt werden. Die Enteroviren werden durch UV-Licht und Formaldehyd (0,3 %) inaktiviert. Bei Temperaturen von 50 °C werden die Viren schnell zerstört, aber sie können tiefgefroren mehrere Jahre infektiös bleiben. Als nicht lipidumhüllte („nackte“) Viren sind sie resistent gegen lipidlösende Mittel wie z.B. Ether und generell in extrazellulärem Milieu relativ stabil. Auch bei Kontakt mit Säuren können Enteroviren intakt bleiben, was erklärt, warum die Infektiosität der Enteroviren, im Gegensatz zu derjenigen der säurelabilen Rhinoviren, die Magenpassage übersteht (02Doe, 01Fie).

### 1.1.2. Antigencharakteristik

Viren können durch ihre Proteine eine spezifische Immunantwort induzieren. Die verschiedenen Serotypen der Enteroviren unterscheiden sich durch ihre Antigenstruktur. Es gibt serotypspezifische und gruppenspezifische Epitope. So können Antikörper, die gegen einen Serotyp gebildet worden sind, einen anderen Serotyp nicht binden, wenn diese Antikörper gegen serotypspezifische Antigenstrukturen gebildet wurden und nicht gegen kreuzreagierende, gruppenspezifische Antigenstrukturen. Bei mehreren Enteroviren sind kreuzreagierende Antigenstrukturen bekannt, unter anderem zwischen Coxsackievirus A3 und A8, A11 und A15 oder Echovirus 1 und 8 (01Fie). Auch innerhalb eines Serotyps können antigene Unterschiede zwischen unterschiedlichen Isolaten vorkommen, was auf Mutationen zurückzuführen ist. Bei RNA-Viren ist die Mutationsfrequenz sehr hoch, da RNA-Polymerasen keine Fehlerkorrektur haben (02Doe). Durch eine Mutation kann ein Hauptstamm (Prime Strain) entstehen, der sich durch Antikörper, die gegen den ursprünglichen Stamm, den so genannten Prototyp, gebildet wurden, nur schlecht neutralisieren läßt. Die Antikörper, die gegen den Hauptstamm gebildet werden, neutralisieren aber den Prototyp. Diejenigen Epitope des Prototypstammes, die komplementbindende Antikörper induzieren, kreuzreagieren immer auch mit denen des Hauptstamms. Entsprechende Mutationen können also nicht anhand dieser Antigene des Prototyps unterschieden werden (01Fie).

### 1.1.3. Pathogenese und Pathologie

Eintrittspforte einer Enterovirusinfektion sind in der Regel die Schleimhäute von Mund, Augen oder des Respirationstraktes, weil Enteroviren hauptsächlich durch fäkal-orale Schmierinfektion übertragen werden, manchmal auch mit Rachen- oder Konjunktivalsekret.

Infektionen mit Enteroviren treten in den gemäßigten Klimazonen hauptsächlich in den Sommermonaten, in tropischen Zonen ganzjährig auf. Niedrige Hygienestandards begünstigen die Verbreitung von Enteroviren in einer Population (02Doe, 01Fie, 94Sch). Die Inkubationszeit liegt normalerweise zwischen 7 und 14 Tagen, kann aber in Einzelfällen auch 2 bis 35 Tage betragen (02Doe, 01Fie, 94Sch). Bei Versuchen im Labor war für die Infektion einer Zelle eine große Anzahl an physikalischen Viruspartikeln (ca. 60-100) notwendig. Nach Adsorption (Anheften des Virus an entsprechende, spezifische Rezeptoren der Zelle), Penetration (Aufnahme des Virus in die Zelle) und Uncoating (Freisetzen des Virusgenoms aus dem Kapsid), verläuft die Produktion neuer Partikel sehr schnell (78Lur z.n. 80Woo, 02Doe). Am Ende eines Zyklus können in einer infizierten Zelle bis zu  $10^4$ - $10^5$  neue Viren entstehen (02Doe). Im

Organismus vermehren sich die Enteroviren zu Beginn vermutlich im lymphatischen Gewebe des Pharynx und des Darms. Es kann zu einer „kleinen“ Virämie kommen mit Absiedlung der Viren in das Retikulo-endotheliale System und die Zielorgane. Später kann es zu einer „großen“ Virämie kommen (01Fie). Die Enteroviren können für mehrere Wochen mit dem Stuhl ausgeschieden werden und sind in den ersten Tagen nach Beginn der Symptome in Pharynxsekreten nachweisbar. Oft wird durch die Vermehrung eines Serotyps der Enteroviren die Vermehrung eines gleichzeitig vorhandenen anderen (heterologen) Serotyps gehemmt, was als Interferenz bezeichnet wird (02Doe).

#### **1.1.4. Erkrankungen**

##### **1.1.4.1. Allgemein**

Zwischen 90 und 95 % der Infektionen durch Enteroviren verlaufen subklinisch. Die durch Coxsackie A Viren und Echoviren ausgelösten Krankheitszeichen sind bei Kindern im Allgemeinen schwächer als bei Erwachsenen. Coxsackie B Virusinfektionen verlaufen bei Kindern hingegen häufig besonders stark(02Doe).

Enteroviren können eine Vielzahl von Symptomen hervorrufen, die von Meningitis über Atemwegserkrankungen und Konjunktivitis bis hin zu kardialen Erkrankungen mit Beteiligung des Endo-, Peri- und Myokards reichen. Enteroviren sind auch für ein Krankheitsbild bei Neugeborenen verantwortlich, bei dem es durch Simultaninfektion von Herz, Leber, Nebennieren, Gehirn und anderen Organen zu einem schweren Krankheitsverlauf mit hoher Letalität kommen kann (94Ray).

Obwohl manche Enterovirusserotypen häufiger für bestimmte Syndrome verantwortlich sind, ist es grundsätzlich möglich, daß alle klinischen Symptome des Enteroviruspektrums von verschiedenen bis allen Enterovirusserotypen ausgelöst werden können (01Fie).

##### **1.1.4.2. Myokarditis**

Die Myokarditis ist eine umschriebene oder diffuse entzündliche Erkrankung des Herzmuskels, die verschiedene Ursachen haben kann. Sie kann im Laufe eines rheumatischen Fiebers (autoimmunologischer Prozeß nach Infektion mit Streptokokken der Gruppe A) oder einer Sarkoidose (Entzündung des Herzmuskels mit Granulomen) vorkommen. Desweiteren gibt es idiopathische, allergische, para- und postinfektiöse Myokarditiden. Eine virale Infektion kann eine para- oder postinfektiöse Myokarditis verursachen. Sie kann beim Menschen nach Infektionen mit vielen verschiedenen Viren auftreten, wie z.B. Influenza-Viren der Gruppen A und

B, Mumps- und Rötelnviren, Herpes- und Adenoviren. RNA Viren dominieren hierbei. Am häufigsten werden Viren aus der Familie der Picornaviren als Ursache einer viralen Myokarditis gefunden (80Woo).

Bei Versuchen zur Aufklärung der Pathogenese enterovirusverursachter Myokarditiden zeigte sich im Tierversuch eine Zerstörung der Wirtszelle direkt durch das Virus, welches die Zelle im Rahmen seiner Vermehrung zerstört. Bei Infektionen mit bestimmten Stämmen des Coxsackie B3 Virus scheinen durch T-Zellen ausgelöste zytotoxische Effekte im Rahmen einer Autoimmunreaktion eine Rolle zu spielen, was aber noch nicht sicher bewiesen ist (01Fie).

In zunehmendem Maße wurden Coxsackie B Viren als Ursache bei primären Myokardkrankungen erkannt (02Doe), vor allem Coxsackievirus B3 (01Fie).

In einer Studie hatten von 259 Patienten mit Perikarditis, Myokarditis oder Pleurodynie 27 % IgM Antikörper gegen Coxsackieviren der Gruppe B (B1 bis B6) (73Sch). Bei Myokarditis und Perikarditis werden neben Coxsackie B Viren auch Coxsackie A4, A14, A16 und Echoviren 1,6, 9 und 19 mit einer kardialen Symptomatik assoziiert (02Doe).

Bei Patienten mit kardialer Symptomatik war in einer Studie in Neuseeland in der Altersgruppe von 20 bis 39 Jährigen häufiger eine Coxsackie B Virus Infektion als Ursache der kardialen Symptome festgestellt worden als in anderen Altersgruppen. Unter den Patienten mit nicht-kardialer Symptomatik war der Prozentsatz der durch Coxsackie B Virus Infektionen ausgelösten Erkrankungen unter den 0- bis 19-jährigen am höchsten (83Lau).

Bei drei Studien von Autopsien lag die Prävalenz von vermutlich viraler Myokarditis zwischen 2,3 % und 5,0 %. Die hierbei untersuchten Fälle waren 40000 aufeinander folgende Autopsien unabhängig von der Todesursache (47Gor z.n. 80Woo), Autopsien von 417 männlichen Unfalltoten im jungen bis mittleren Alter (70Ste z.n. 80Woo) und von 214 Kindern, die an einem gewaltsamen Tod verstorben waren (79Ban z.n. 80Woo).

Aufgrund solcher Studien und klinischen Studien von kardiovaskulären Symptomen während Enterovirusepidemien wird geschätzt, daß ungefähr 5 % einer durch Enteroviren infizierten Population eine kardiale Beteiligung aufweisen (80Woo). Man vermutet, dass 1,5 % der Infektionen durch Coxsackieviren und 3,2 % der Coxsackie B Virusinfektionen eine kardiale Symptomatik zeigen (78Gri z.n. 01Fie).

Körperliche Anstrengung, Cortisoneinnahme, Alkohol, Schwangerschaft und Unterernährung können den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussen. Männer scheinen häufiger betroffen und bei ihnen scheinen die meisten dieser Faktoren schwerer ins Gewicht zu fallen als bei Frauen (02Doe, 94Wyn). Im Tierexperiment wurde nachgewiesen, daß eine akute, gutartige

Erkrankung durch Anstrengung in eine fortschreitende, tödliche Erkrankung umgewandelt werden kann (70Gat z.n. 80Woo).

Bei Neugeborenen kommt es bei einer Coxsackie B Virusinfektion verglichen mit Kindern, die älter sind als ein Jahr, relativ häufig zu einer Myokarditis (73Gea z.n. 80Woo). Im Anschluß an die Neugeborenenperiode ist es in der frühen Kindheit eher ungewöhnlich, daß eine Infektion mit Coxsackieviren zu einer Myokarditis führt. Die Häufigkeit der Erkrankung nach Infektion steigt während der späten Kindheit und in der Pubertät wieder an. Am höchsten ist der Prozentsatz im Erwachsenenalter. Insgesamt sind die meisten Patienten mit infektiöser Myokarditis männlich (69Gri z.n. 80Woo, 68Sai z.n. 80Woo).

Die klinische Symptomatik der infektsbedingten Myokarditis ist bei Neugeborenen meist schwerer und ausgeprägter als bei Erwachsenen und die Krankheit verläuft in der Neugeborenenperiode nicht selten tödlich. Die durchschnittliche Sterberate liegt in dieser Altersgruppe bei bis zu 50 % (73Gea z.n. 80Woo). Bei Infektionen mit Coxsackie B Viren kommt es bei Neugeborenen nicht selten zu einer Multiorganbeteiligung, was zum Teil den schwereren Verlauf erklären könnte (73Gea z.n. 80Woo). Die Infektion beginnt bei Neugeborenen oft mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Tachykardie und deutlich verminderter Aktivität. Später können Tachypnoe, Zyanose und rasch fortschreitendes Kreislaufversagen folgen. Auf Röntgenbildern ist das Herz meist erst spät im Krankheitsverlauf vergrößert. Dann können auch Arrhythmien und systolische Herzgeräusche auftreten.

Ganz im Gegensatz dazu verläuft die virale Myokarditis bei Jugendlichen und Erwachsenen langsamer und ist nur in seltenen Fällen tödlich (73Gar z.n. 80Woo, 74Lew z.n. 80Woo).

Voraus gehen bei Jugendlichen und Erwachsenen oft Infektionen der oberen Atemwege oder gastrointestinale Beschwerden. Eine akute Herzbeteiligung wird normalerweise frühestens eine Woche später bemerkt und kann Symptome hervorrufen, die für eine Perikarditis, einen Koronararterienverschluß oder fortschreitendes Herzversagen sprechen (73Gar z.n. 80Woo, 74Lew z.n. 80Woo). Die Myokarditis kann mit verschiedenen anderen Symptomen wie Fieber, Muskel- und Kopfschmerzen einhergehen, wobei sich die kardiale Beteiligung eventuell nur aufgrund von EKG-Veränderungen feststellen läßt (73Gar z.n. 80Woo, 74Lew z.n. 80Woo). Hierbei können sich ST-Streckenveränderungen (94Wyn), Überleitungsstörungen und abnormale Q-Wellen (68Sai z.n. 80Woo) zeigen. Trotzdem sollten EKG-Veränderungen vorsichtig interpretiert werden, denn sie können auch durch die systemische Wirkung der Infektion zustande kommen und sind nicht notwendigerweise Beweis einer kardialen Beteiligung. Am häufigsten klagen Myokarditispatienten über Brustschmerz, obwohl Myokarditis

ohne perikardiale Beteiligung auch schmerzlos sein kann. Es können auch Tachykardien, Arrhythmien, Herzgeräusche, Herzreiben, Herzvergrößerung, Pleuraerguß und erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit auftreten. Der Tod durch Arrhythmien oder Herzversagen kann vorkommen, ist aber, wie bereits erwähnt ungewöhnlich (68Sai, 80Woo, 94Wyn). Eine virale Myokarditis verläuft in der Regel selbstlimitierend und heilt ohne Folgeerscheinungen aus, aber es kann in manchen Fällen dazu kommen, daß die akute Form in einen chronischen Verlauf übergeht (94Wyn).

Eine antivirale Therapie gegen die virale Myokarditis ist bisher nicht vorhanden. Die Therapie bei viraler Myokarditis ist symptomatisch und unterstützend. Es sollte Bettruhe eingehalten werden oder zumindest anstrengende Arbeit vermieden werden (73Abe z.n. 80Woo, 94Wyn). Weiterhin sollte eine Therapie versuchen, Komplikationen zu verhindern oder diese zu behandeln. Patienten, die während einer viralen Myokarditis eine Herzinsuffizienz entwickeln, können mit den üblichen Methoden (Digitalis, Diuretika, Salzrestriktion) behandelt werden (94Wyn).

Der Nutzen von Glukokortikoiden bei einer viralen Myokarditis ist umstritten. Die Anwendung von Glukokortikoiden kann den Krankheitsverlauf verschlimmern. Bei Tierversuchen mit Verwendung von Glukokortikoiden in der Frühphase der Infektion kam es zu einer Verschlimmerung der Erkrankung. Aber eine kleine Gruppe von Patienten mit Herzinsuffizienz und Myokarditis konnte von der Immunsuppression durch einen Rückgang der Entzündungsreaktion profitieren (94Wyn).

#### **1.1.5. Diagnostik**

Um eine Enterovirusinfektion zu diagnostizieren, kann versucht werden, die Viren ohne Vermehrung im Labor, also „direkt“ nachzuweisen z.B. über Antigen-ELISA, Elektronenmikroskopie, Immunfluoreszenztest oder PCR. Die PCR hatte sich bei Beginn dieser Arbeit allerdings noch nicht als Routinediagnostik durchgesetzt. Außer dem direkten Virusnachweis kann auch ein Virusnachweis durch Verimpfen verdächtigen Patientenmaterials (Blut, Liquor, Urin, Stuhlproben, Abstriche von Rachen, Rektum und Konjunktiven (02Doe, 01Fie)) auf Zellkulturen durchgeführt werden, wodurch das Virus anhand eines zytopathischen Effektes isoliert und anschließend identifiziert wird, z.B. mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern. Das Virus kann im Rachenabstrich bis 15 Tage nach Infektion und im Stuhl mindestens bis einen Monat nach der Infektion nachgewiesen werden (02Doe).

Die Isolierung von Enteroviren ist oft relativ einfach und schnell durchzuführen. Die Typisierung des Virus ist dagegen langwierig und teuer, wenn monospezifische Hyperimmunseren verwendet werden (01Fie). Jedoch wurde die Typisierung durch die Entwicklung von international standardisierten Hyperimmunseren, die zu Kombinations-Antisera-Pools kombiniert wurden, deutlich vereinfacht (73Mel z.n. 01Fie). Von Lim und Benyesh-Melnick wurden 8 sogenannte LBM-Antiserumpools (Pools A-H) etabliert, durch die ein unbekanntes Enterovirus anhand von einem Neutralisationsschema „sich überschneidender Seren“ (Intersecting-Serum-Schema) typisiert werden kann. Das Virus wird dabei durch eine Tabelle anhand der Antiserumpools, die es neutralisieren typisiert, z.B. Coxsackievirus B3 wird durch Neutralisation mit den Serumpools C und G typisiert (02Doe, 60Lim z.n. 01Fie). Trotzdem ist auch dieses Verfahren so aufwendig, daß es heute nicht mehr für die Routinediagnostik empfohlen wird, auch wenn der Virusnachweis mittels Zellkultur immer noch der Goldstandard ist. Ein negatives Ergebnis eines Virusnachweisversuchs schließt eine virale Ursache nicht aus, denn es kann z. B. sein, daß der Zeitraum verpaßt wurde, in dem das Virus ausgeschieden worden war.

Zudem vermehren sich die meisten Coxsackie A Viren nicht in den normalen Zellkulturen. Für ihren Nachweis werden Versuchstiere benötigt, was zum Zwecke der Routinediagnostik nicht mehr durchgeführt wird.

Es gibt auch die Möglichkeit, das Virusgenom mit molekularbiologischen Methoden nachzuweisen (Enterovirus-spezifische Nukleinsäureamplifikation und anschließende Sequenzierung zur Bestimmung des Serotyps), wobei diese Methoden wegen der starken Sequenzhomologie zwischen den Enteroviren nur eingeschränkt anwendbar sind (02Doe).

Neben den Methoden des Virus- und des Virusgenomnachweises kommen für die Diagnostik der Enterovirusinfektionen auch serologische Methoden zur Anwendung. Mit diesen Methoden wird versucht, Antikörper gegen das vermutete Virus nachzuweisen. Für gewöhnlich werden Antikörper bis zum Ende der ersten Woche nach der Infektion noch nicht gefunden. Die viruspezifischen IgM-Antikörper erreichen nach 2 bis 3 Wochen ein Maximum und sinken danach, meist in einem Zeitraum von wenigen Wochen, wieder bis unter die Nachweisgrenze ab. Nach ungefähr einem Monat dominiert das spezifische IgG (68Sch z.n. 80Woo, 92Mui). Um einen Hinweis auf die Phase der Infektion zu bekommen, ist es von Nutzen, die Immunglobulinklassen der nachgewiesenen Antikörper zu kennen oder zwei aufeinander folgende Serumproben zu testen. Hierfür bieten sich eine Serumprobe aus der akuten Phase, möglichst kurz nach Auftreten der ersten Symptome, und eine Probe 2 bis 3 Wochen später

an. In der ersten Serumprobe haben sich so kurz nach der Infektion oder dem Beginn der Symptomatik meist noch keine Antikörper gegen das verursachende Virus gebildet. Bis zur zweiten Serumprobe hatte der Körper genügend Zeit, auf das Virus zu reagieren und virusspezifische Antikörper zu bilden. Es findet sich dann beim Nachweis des Titers (Antikörperkonzentration ermittelt als die Verdünnungsstufe der zu untersuchenden Lösung, die noch eine deutlich positive Reaktion mit dem Antigen bewirkt) in der zweiten Probe ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur ersten Probe. Dies ist ein sicheres Zeichen einer akuten Infektion (02Doe, 01Fie, 80Woo).

Wenn nur eine Serumprobe vorhanden ist und in dieser ein hoher Antikörpertiter nachgewiesen wird, dann sollte die Probe zusätzlich auf spezifische IgM-Antikörper untersucht werden, um festzustellen, ob eine akute oder eine länger zurückliegende Infektion vorliegt. Bei einer Erstinfektion mit dem auslösenden Virus beruht der Antikörperanstieg zunächst auf einem Anstieg der IgM Fraktion mit schnell danach folgendem Anstieg der IgG-Fraktion. Bei Zweitkontakt oder Re-Infektion beruht der Antikörperanstieg meist auf einer schnellen und verstärkten IgG Antwort und, wenn überhaupt, nur einer geringen IgM Antwort (02Doe).

Um Antikörper nachzuweisen, wird deren Fähigkeit genutzt, Antigen zu binden. Zum einen kann man diese Bindung direkt nachweisen wie zum Beispiel mit dem ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) oder der Komplementbindungsreaktion (KBR). Zum anderen kann die Fähigkeit der Antikörper, die Interaktion der Viren mit Indikatorzellen zu hemmen, verwendet werden, was beim Hämagglutinations-Hemmungstest (HHT) verwendet wird, oder es wird die Neutralisation der Infektiosität der Viren durch die Antikörper genutzt, wie beim Neutralisationstest (NT) (80Woo).

Beim Neutralisationstest wird meist eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Serums mit einer konstanten Menge des spezifischen Virus gemischt und inkubiert (z. B. 30 Min. bei 37 °C). Die Infektiosität des Virus wird durch entsprechende im Serum vorhandene Antikörper blockiert: Die Antikörper binden an diejenigen viralen Moleküle, mit denen das Virus sonst an die Rezeptoren der Wirtszelle adsorbieren würde. Es wird bestimmt, bis zu welcher Verdünnung des Serums das Virus neutralisiert wird, was am ausbleibenden virusinduzierten zytopathischen Effekts (CPE) im Mikroskop erkannt werden kann. So kann der Antikörpertiter typenspezifisch bestimmt werden. Der Neutralisationstest ist auch gegenwärtig noch die beste Methode zur Bestimmung von Ak gegen Enteroviren. Nur dieser serologische Nachweis bestimmt serotypspezifische Antikörper (02Doe).

Das Prinzip der Komplementbindungsreaktion beruht auf der Fähigkeit von Antikörpern Komplement zu aktivieren. Das zu untersuchende Serum wird mit einer definierten Menge vorbereitetem Virusantigen inkubiert. Sind im Serum Antikörper gegen dieses Antigen vorhanden, so binden sie an das Antigen, wodurch sich eine strukturelle Veränderung im Bereich des Ig-F<sub>c</sub>-Teils der Antikörper ergibt. Dadurch wird das danach in definierter Menge hinzugefügte Komplement bei geeignetem Konzentrationsverhältnis durch die Reaktion mit den gebundenen Antikörpern verbraucht. Danach hinzugegebene, mit Antikörpern beladene Erythrozyten werden nur dann lysiert, wenn keine der gesuchten Antikörper im Serum vorhanden sind und das Komplement, welches die Hämolyse auslösen könnte, nicht verbraucht ist. Die Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses, bei dem das Komplement verbraucht ist, ist durch die bei der gesuchten Konzentration ausbleibende Hämolyse möglich. So ist eine quantitative Bestimmung der Antikörper möglich. Zum Nachweis einer akuten Infektion sollte die Komplementbindungsreaktion nach Möglichkeit immer mit einem Serumprobenpaar durchgeführt werden. Die Diagnose einer akuten Infektion wird bei einem vierfachen Titeranstieg gestellt, wobei das Problem besteht, dass in der ersten Probe bereits zuviele Antikörper vorhanden sein können um einen Anstieg noch nachzuweisen (01Fie). Für die meisten Enteroviren ist die Komplementbindungsreaktion wegen Kreuzreaktionen zwischen den Serotypen nur von geringer Aussagekraft und eignet sich nur um gruppenspezifische Antikörper nachzuweisen (02Doe). Bei breiter Reaktivität ist der Test wegen mangelnder Sensitivität (zuviele falsch negative Tests) nicht aussagekräftig (89Sch z.n. 90Sam).

Der Hämagglutinations-Hemmungstest funktioniert nur bei hämagglutinierenden Viren. Bisher sind nur für etwa ein Drittel der bekannten Enteroviren hämagglutinierbare Erythrozyten gefunden worden. Das Prinzip des Tests besteht darin, daß Antikörper gegen das Virus an dieses binden und die Strukturen des Virus, die für die Hämagglutination maßgebend sind, sterisch blockieren. In einer Serumverdünnungsreihe wird festgestellt, bis zu welcher Verdünnung die Hämagglutination noch völlig verhindert wird. Dabei sollte, genau wie bei der zuvor beschriebenen Komplementbindungsreaktion, ein Serumprobenpaar getestet werden, um anhand der Titerdifferenz das Ergebnis bewerten zu können.

Wenn mit dem NT oder dem HHT der IgM-Ak-Titer bestimmt werden soll, müssen die IgM-Ak von den anderen Ak in der Serumprobe abgetrennt werden, z.B. durch Ultrazentrifugation. Für die Ultrazentrifugation können die Proteine der zu untersuchenden Serumprobe fluoreszenzmarkiert werden (74Sch). Soll die zu gewinnende IgM-Fraktion später im NT verwendet werden, wird die Probe dann auf einen kontinuierlichen 7 bis 40 %igen Iodixanol- („OptiPrep

TM“, Fa. Axis-Shield) Dichtegradienten von ca. 10 ml geschichtet und für 15-16 Stunden bei 100.000 g zentrifugiert.

Dabei bilden sich aufgrund der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Proteine verschiedene, durch die Markierung sichtbare Banden im Röhrchen, wobei die untere Bande (die so genannte 19S Bande) der IgM-Fraktion, und die breite obere Bande den anderen Serumproteinen inklusive der IgA- und IgG-Fraktion (7S Bande) entspricht. Die IgM-Fraktion kann nun gewonnen werden, indem z.B. das Röhrchen unten zentral angestochen wird und die 19S Bande aufgefangen wird. Diese kann nun in den Test eingesetzt werden.

Mit der ELISA-Methode können die Patientenserum ohne aufwendige Vorbereitungen auf die verschiedenen Antikörperklassen untersucht werden. Die Methode des ELISA ist im Teil „Patienten, Material und Methoden“ unter 2.2.1. genauer beschrieben. Zusätzlich sollen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ELISA-Testsätze auch spezifische IgA Antikörper bestimmen können. Über die Erkenntnisse in der Literatur hinsichtlich der IgA Antikörper wird im nächsten Kapitel (1.2.) berichtet.

## **1.2. Problemstellung**

Die kommerziell vertriebenen Testsätze zum Nachweis von Ak gegen Enteroviren benötigen derzeit aufgrund der Vorschriften über die Zulassung und staatliche Chargenprüfung auf Tests zur in-vitro-Diagnostik (00Bun) keine Zulassung durch das Paul-Ehrlich-Institut in Langen, da sie in dieser Verordnung nicht aufgeführt sind. Deshalb ist ihre Funktionsfähigkeit vor der Markteinführung nicht amtlich belegt. Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Spezifität (Verhältnis von negativen Testergebnissen zu Enterovirus negativen Seren) und Sensitivität (Verhältnis von positiven Testergebnissen zu den tatsächlich Enterovirus positiven Seren) der ELISA Testsätze, die für Bestimmungen von Antikörpern der Klasse IgA und IgM gegen Enteroviren vertrieben werden, ausreicht, um bei Seren von Patienten mit dem Verdacht auf Myokarditis den Nachweis einer akuten Enterovirusinfektion erbringen zu können.

Eine Grundlage für diese Arbeit war die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass bei einem großen Teil der infektiösen Herzerkrankungen Enteroviren nachweisbar sind (96And, 01Fie, 80Woo).

Ein schneller und sicherer Nachweis von Antikörpern gegen Enteroviren bei kardialer Symptomatik wäre eine Möglichkeit, die Suche nach der Ursache der Symptome zu beschleunigen

und dadurch den Patienten eventuell überflüssige und kostspielige weitere Diagnostik ersparen zu können. Die bis jetzt verwendeten Nachweismethoden sind sehr zeit- und arbeitsaufwendig, wie zum Beispiel der bisher im Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen eingesetzte Neutralisationstest. Zudem deckt der Neutralisationstest nur jeweils einen Serotyp ab und jeder weitere Serotyp, der überprüft werden soll, benötigt einen eigenen Testansatz. So wären für eine annähernd komplette Abdeckung der für kardiale Symptomatik ätiologisch in Frage kommenden Enteroviren mit dem NT mehr als 15 verschiedene Testansätze nötig, was für die Routinediagnostik nicht praktikabel ist. Auch die KBR und der HHT sind für die Suche nach Antikörpern gegen möglichst viele Enterovirusserotypen ungeeignet, wie schon im vorigen Kapitel erwähnt.

Die angebotenen ELISA Testsätze sollten laut Herstellerangaben IgG, IgM und IgA Antikörper gegen Enteroviren finden können, und zwar nicht nur gegen einen Serotyp je Ansatz, sondern gegen mehrere. Ein in der Literatur beschriebener ELISA, auf dessen Basis die in dieser Arbeit verwendeten Testsätze entwickelt wurden, war als ein breit reagierender und verlässlicher Test bei gegenwärtigen und kürzlich abgelaufenen Enterovirusinfektionen beschrieben worden (92Bom). In dieser Untersuchung wurden die Proben nur auf IgM und IgA Antikörper untersucht, in der Annahme, daß jeder Mensch relativ früh mit den ubiquitär vorkommenden Enteroviren konfrontiert wird und so ein IgG Antikörpernachweis keine Differenzierung zwischen einer frischen oder länger zurückliegenden Infektion ermöglichen würde. So lag die Erwartung nahe, mit diesen Testsätzen, neben Arbeits- und Zeitersparnis, eine schnellere und vor allem breitere Diagnostik (bessere Abdeckung der verschiedenen Serotypen) zu erreichen. In der Literatur sind, über die bereits erwähnte Arbeit hinaus, Enterovirus-ELISAs beschrieben, die Coxsackievirus B1-Antigen (93Swa) oder Coxsackievirus B5-Antigen (92Bom) benutzen. Durch Denaturierung der nativen Virusstruktur durch Erhitzen werden die serotypischen Eigenschaften (N-Antigen) zerstört und die gruppenspezifischen Eigenschaften freigelegt (H-Antigen) (93Swa, 92Bom). So wird erreicht, daß nicht nur Antikörper gegen einen Serotyp der Enteroviren gefunden werden können, sondern Antikörper gegen eine Vielzahl von Serotypen.

Der ELISA mit Coxsackievirus B1-Antigen zum Beispiel wurde bei Seren mit Infektionen durch folgende Serotypen getestet und hat diese erkannt (93Swa):

Echoviren 6, 7, 9, 11, 14, 19, 25, 30

Coxsackieviren B1, B2, B4, B5

Poliovirus Typ 3.

Der ELISA mit Coxsackievirus B5-Antigen hat Infektionen durch folgende Serotypen erkannt (92Bom): Echoviren 5, 11, 15, 17, 22, 23, 33  
Coxsackieviren A9, B2, B4, B5.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Testsätze verwendet, die mit Antigen von Coxsackievirus B5 (Virofem und invitro) oder mit Antigen von Coxsackievirus B5 und Echovirus 24 (Virotech) arbeiten. Wie bereits erwähnt war der von Bomann 1992 beschriebene Test (92Bom) Basis für die Entwicklung dieser Testsätze. In den Gebrauchsanleitungen für die kommerziell erhältlichen Tests, die in dieser Arbeit untersucht wurden, ist nicht explizit angegeben, welche Ak-Spezifitäten gefunden werden sollen, außer daß Ak „gegen Enteroviren“ erkannt werden. Die verwendeten Antigene sind jedoch auch bei diesen Tests denaturiert, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß die Testsätze eine ähnliche diagnostische Breite besitzen wie die in den zitierten Arbeiten beschriebenen Tests.

Bei Myokarditis, die durch Enteroviren ausgelöst wird, gibt es für die Diagnostik neben der Vielzahl der potentiell Myokarditis verursachenden Enterovirusserotypen das Problem, daß die Symptome der Myokarditis oft nicht direkt nach der Inkubationsphase beginnen, sondern gewöhnlich eher als Spätmanifestation der Infektion auftreten (92Mui, 93Swa). Damit ist die Virusisolierung zur Diagnostik nicht mehr einsetzbar, und auch der zwischen zwei Seren mit zeitlichem Abstand zu findende Antikörpertiteranstieg ist meist nicht mehr nachweisbar, weil der Antikörpertiter zum Zeitpunkt der kardialen Symptomatik schon auf die maximale Höhe angestiegen ist (92Mui). Ein Nachweis der Antikörper, die ausschließlich in der floriden Phase der viral verursachten Myokarditis auftreten (IgM und evtl. IgA), ist deshalb die einzige Möglichkeit der Diagnostik bei Verdacht auf virale Myokarditis. IgM Antikörper gegen Enteroviren sind meist ab der zweiten Woche nach der Infektion für 5 bis 7 Wochen nachweisbar (93Swa, 80Elh). Im Extremfall können IgM-Antikörper gegen Enteroviren für mehrere Monate (92Mui) bis Jahre (80Hor) persistieren, wenn auch die Erkrankung persistiert (80Hor), was jedoch nicht die Regel ist.

Auch spezifische IgA-Antikörper können während der Akutphase einer viralen Infektion auftreten. Zu Beginn werden meist die dimeren IgA-Antikörper (zwei aneinander gebundene monomere Formen), später eher die monomere Form der IgA-Antikörper gebildet. Die dimere Form bindet Antigen bei weitem besser als die monomere Form, was für den Nachweis durch die ELISA-Methode in der akuten Phase von Bedeutung sein kann. Zu beachten ist, daß bei Patienten jüngeren Alters, speziell bei Neugeborenen, die Höhe des IgA-Antikörpertiters oft

nicht dem des Erwachsenenalters entspricht. Deshalb könnte es als alleiniger Marker für eine akute Infektion nicht verlässlich genug sein. In Verbindung mit der Suche nach IgM-Antikörpern lässt sich hier oft eine Diagnose stellen, wenn Kleinkinder entweder IgM oder IgA nur ungenügend produzieren (91Fri).

Spezifische IgA-Antikörper gegen Enteroviren sind bis zu fünf Wochen nach Beginn der kardialen Symptomatik nachgewiesen worden (93Swa).

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der aus der Literatur vorliegenden Informationen (73Sch, 80Hor, 80Elh, 84Fri, 90Mui2, 91Fri) davon ausgegangen, daß für den Nachweis einer akuten Infektion mit Enteroviren IgM-Antikörper, IgA-Antikörper oder beide in einem Zeitrahmen von 30 Tagen nach Beginn der kardialen Symptomatik nachweisbar sein sollten, wenn Enteroviren die Auslöser der Myokarditis sind. Das im Vergleich zu den bisherigen Routine-testverfahren sehr schnelle und einfache Testverfahren des ELISA sollte durch diese Arbeit zeigen, ob es dazu in der Lage ist. Die Hoffnung war, daß dieses Verfahren (ELISA) das alte Verfahren (Neutralisationstest) ablösen könnte. Wenn diese Form der Diagnostik funktioniert, sollte u.a. ein jahreszeitlicher Verteilungsgipfel der durch Enteroviren ausgelösten Myokarditiden erkennbar sein, wie man ihn von akuten Enterovirusinfektionen in gemäßigten Klima in den Sommermonaten kennt.

Voraussetzung dafür war, daß der Abstand zwischen Infektion und Beginn der kardialen Erkrankung nicht zu groß oder zu variabel ist, da sonst keine repräsentative Aussage über den Zeitpunkt der Infektion zu treffen wäre. Also wurden aus einem Patientenkollektiv von 1991 bis 1997 mit kardialen Symptomen retrospektiv diejenigen ausgewählt, bei denen die Symptomatik bis zu 30 Tage vor Entnahme von Blutserum begonnen hatte. Sofern diese Serumprobe noch vorlag, wurde sie mit den zur Verfügung stehenden ELISAs getestet. Wenn die bisher beschriebenen Annahmen zutreffen, wovon in dieser Arbeit ausgegangen wurde, sollten die Testergebnisse eine jahreszeitliche Verteilung mit einem Gipfel in den Sommermonaten zeigen, wie dies für Enterovirusinfektionen im gemäßigten Klima charakteristisch ist (94Sch, 01Fie). Wenn in den Testergebnissen kein entsprechender Gipfel nachweisbar ist, funktionieren entweder die Testsätze nicht wie erwartet, der Abstand ist variabler als bisher gedacht, oder die Myokarditiden der untersuchten Patienten sind nicht durch Enteroviren verursacht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten und Material

Für diese Arbeit wurden Serumproben aus den zur Routinediagnostik in das Institut für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität (JLU) in Gießen eingesandten Serumproben aus den Jahren 1991 bis Anfang 1997 nach den im Folgenden beschriebenen Kriterien ausgewählt. Ein entscheidendes Kriterium war, daß die Seren von Patienten stammen sollten, bei denen aufgrund der Symptomatik der Verdacht auf eine akute Myokarditis bestand. Zunächst erleichterte eine seit 1994 aufgebaute Datenbank die Suche nach diesen Patienten, in die nach Möglichkeit für jedes eingesandte Material Diagnoseschlüssel eingegeben worden waren. So wurden Proben mit dem Diagnoseschlüssel „Herzerkrankung“ ausgewählt. Um die Patienten mit Verdacht auf Myokarditis aus der Gruppe der „Herzerkrankungen“ herauszusuchen, wurden alle entsprechenden Einsendeformulare neu ausgewertet. Oft war die Diagnose „Verdacht auf Myokarditis“ direkt angegeben, ohne Angaben von Symptomen. Sonst wurden Symptome wie zum Beispiel akute Thoraxschmerzen, vor kurzem aufgetretene Rhythmusstörungen oder Perikarderguß, plötzliche Tachykardien oder Bewußtseinverluste und Dyspnoe als Verdacht auf eine akute Myokarditis angesehen. Nicht für die vorliegenden Untersuchungen herangezogen wurden Serumproben von Patienten, bei denen eine andere nichtentzündliche oder bakteriell verursachte Herzerkrankung angegeben war (Herzinfarkt, Endokarditis, etc.) oder bei denen eine chronische Herzauffektion (dilatative Kardiomyopathie, chronischer Perikarderguß, etc.) vorlag. Auch chronische Herzerkrankungen können durch Enteroviren bedingt sein, jedoch ist dabei die serologische Antikörperdiagnostik durch Abstand der Herzerkrankung zur akuten Enterovirusinfektion erschwert. Deshalb wurden nur die akuten Fälle ausgewählt.

Patienten, die im EDV-System versehentlich fälschlicherweise die Diagnose „Herzerkrankung“ erhalten hatten, wurden aus dem Kollektiv ausgesondert. Um auch die Proben zu finden, bei denen eventuell fälschlicherweise der Diagnoseschlüssel „Herzerkrankung“ nicht eingegeben worden war, wurde die Datenbank weiterhin nach Proben durchsucht, bei denen Cocksackie-Neutralisationstests (B2, B3, B4) durchgeführt worden waren. Die Untersuchungsanforderung für diesen Neutralisationstest war bei Verdacht auf Myokarditis fast immer üblich. Es wurden tatsächlich noch einige zusätzliche Serumproben gefunden. Beim Durchsehen der entsprechenden Einsendeformulare zeigte sich, daß vor allem bei älteren Seren ein Fehler bei der Diagnosenangabe im EDV-System vorhanden war, was sich durch die elektronische Übernahme älterer Datensätze aus dem zuvor verwendeten EDV-System in das 1994 neu eingeführte EDV-System erklären ließ. Mit Hilfe der geschilderten Suchaktionen wurden 492

Serumproben gefunden, die von Patienten mit Verdacht auf Myokarditis stammten. Diese Proben waren im Zeitraum von November 1991 bis Oktober 1997 eingesandt worden.

Die Daten des Erkrankungsbeginns konnten zum Teil direkt aus den Einsendeformularen entnommen werden. Meist war auf den Einsendeformularen jedoch kein Erkrankungsbeginn vermerkt, weshalb diese Daten mit aufwendiger Handarbeit direkt aus den Krankenakten der verschiedenen Archive (Innere Medizin, Pädiatrie, Psychiatrie, usw.) des Universitätsklinikums gesucht werden mußten. Durch das Studium der Krankenakten bot sich zusätzlich die Möglichkeit, die Symptomangaben auf den Einsendeformularen stichprobenartig zu überprüfen und gegebenenfalls zu ergänzen.

Um nun nur die Serumproben zu testen, bei denen die in der akuten Phase vorkommenden Antikörper bei einer Infektion durch Enteroviren zu erwarten wären, wurden von allen 492 Proben die Proben ausgewählt, die von Patienten stammten, bei denen die Erkrankung 30 oder weniger Tage vor dem Einsendedatum begonnen hatte. Es wurde der Zeitraum von 30 Tagen gewählt, weil in der Literatur beschrieben war, daß IgM am ehesten in diesem Zeitraum nach Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden kann (73Sch). Auch IgA ist für etwa 4 bis 5 Wochen nach dem Erkrankungsbeginn nachweisbar (93Swa), was ebenfalls in dem gewählten Zeitraum liegt. Die Anzahl der Seren in dieser Gruppe betrug 382. 186 dieser Seren wurden mit allen drei Testsätzen (invitro, Virotech und Virofem) auf IgM und IgA Antikörper getestet. Insgesamt wurden mit dem Testsatz der Firma invitro 190 Seren, mit dem Testsatz der Firma Virofem 193 und mit dem Testsatz der Firma Virotech 375 Seren getestet. Die jüngsten Seren (1996 und 1997) wurden, bis auf wenige Ausnahmen mit allen drei Testsätzen getestet. Die Ausnahmen betreffen Seren, von denen nicht mehr genug Volumen für alle drei Testdurchgänge übrig war.

Im Laufe der Untersuchungen kamen aufgrund mangelnder Übereinstimmung der Testergebnisse der verschiedenen Testsätze Zweifel an der Funktionsfähigkeit der Testsätze auf. Um die Funktionsfähigkeit der Testsätze zu kontrollieren wurden Proben aus den Jahren 1975 bis 1984 von Meningitispatienten ausgewählt. Auswahlkriterium war ein gelungener Virusnachweis von Enteroviren im Rahmen der Routinediagnostik.

Von 18 Seren war noch ausreichend Volumen vorhanden, um einen Test durchzuführen. Diese Seren wurden mit den Testsätzen von Virotech und Virofem getestet. Das Alter dieser Seren lag zwischen 10 und mehr als 20 Jahren, was trotz des Virusnachweises zu möglicherweise berechtigten Zweifeln an noch nachweisbaren Antikörpern in diesen Seren hätte führen können. Deshalb wurde zusätzlich das im Folgenden beschriebene Serumkollektiv getestet,

um festzustellen, wie sensitiv und spezifisch die Testsätze im Vergleich zu den bisher in der Routinediagnostik angewandten Tests waren. Dies sollte eine genauere und direktere Kontrollmöglichkeit der Testsätze ermöglichen, um entweder die Zweifel an der Funktionsfähigkeit auszuräumen oder zu bestätigen.

Für diese weitere Kontrolle der Testsätze wurden Seren aus den gesamten zur Routinediagnostik eingesandten Seren der medizinischen Virologie der JLU-Gießen ausgewählt, bei denen ein Ergebnis der Coxsackie-IgM-NTs positiv ausgefallen war. Zu den positiv ausgefallenen Ergebnissen wurden alle Neutralisationstiter größer oder gleich 1:8 gezählt. Es wurden 40 solcher Seren gefunden und getestet. Es bestand kein Grund zum Zweifel an den im Rahmen der Routinediagnostik erhobenen Ergebnisse, die zum Teil mit Hilfe von Testwiederholungen gesichert worden waren, was sich aber als nicht notwendig erwiesen hatte. Die mit der Durchführung betrauten medizinisch technischen Assistentinnen waren durchweg erfahren in dieser Methodik und die Ergebnisse immer wieder stichprobenartig als reproduzierbar nachgewiesen.

## **2.2. Methoden**

Für diese Arbeit wurden der medizinischen Virologie der JLU-Gießen von drei Firmen ELISA Testsätze zur Erkennung von IgM, IgA und IgG Antikörpern gegen Enteroviren zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um die Firmen invitro (Mainz-Kastel), Virotech (Rüsselsheim) und Virofem (Mainz).

Die drei Testsätze funktionieren alle nach einem ähnlichen Prinzip mit denaturiertem Antigen und sollen laut den Herstellern IgM-, IgA- und IgG-Antikörper gegen Enteroviren erkennen.

Die Denaturierung erfolgt durch Hitzeinaktivierung von Virionen, wobei sich Antigenität von typenspezifisch (N-Antigene) in gruppenspezifisch (H-Antigene) ändert (Swa93).

Virofem und invitro verwenden in ihren Tests hitzeinaktiviertes Antigen von Coxsackievirus B5, wohingegen im Test der Firma Virotech hitzeinaktiviertes Antigen von Coxsackievirus B5 und Echovirus 24 verwendet wird.

Die Tests wurden zwischen Dezember 1996 und Oktober 1998 durchgeführt.

### **2.2.1. Testprinzip**

Die Enteroviren-ELISA-Testsätze funktionieren nach dem Prinzip der indirekten ELISA Methode.

Auf der inneren Oberfläche der Reaktionsmulden von Mikrotiterplatten ist das verwendete Antigen fixiert. In diese Vertiefungen wird neben den Kontrollen (Leerwert, negative und positive Kontrolle) das 1:100 mit Verdünnungspuffer verdünnte Patientenserum gegeben. Nun binden die im Serum eventuell vorhandenen Antikörper, die gegen das fixierte Antigen gerichtet sind, an das Antigen. Nach einer Inkubationszeit werden die nichtgebundenen Serumbestandteile mit PBS herausgewaschen.

Nun werden, je nachdem welche Antikörper erkannt werden sollen, Antikörper gegen humane IgG-, IgM- oder IgA-Antikörper einpipettiert. Diese Antikörper sind mit einem Enzym markiert. Die verwendeten Testsätze benutzen Peroxidase um die sekundär einpipettierten Antikörper zu markieren.

Nach einer Inkubationszeit wird erneut gewaschen um nicht gebundene Anteile zu entfernen. Danach wird das Peroxidase-Substrat zugefügt und inkubiert. Alle drei Testsätze verwenden Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat. Durch Spaltung dieses ungefärbten Substrates entsteht ein blauer Farbstoff. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet, welche bei invitro und Virofem aus 1 molarer Schwefelsäurelösung und bei Virotech aus „Citrat-Stopplösung“, einem in der Testanleitung nicht näher beschriebenen Säuregemisch besteht. Hierdurch schlägt die Blaufärbung in eine Gelbfärbung um. Für die Auswertung wird in einem Photometer die Farbintensität der Gelbfärbung in jeder Vertiefung bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm zum Vergleich der Messung der Lösung mit Referenzwerten des Photometers gemessen.

Zum Abschluß wird kontrolliert, ob die Testergebnisse der positiven und negativen Kontrollen im vorgeschriebenen Bereich liegen.

In den Testanleitungen sind für die Referenzwellenlänge geringfügig tiefere Werte angegeben (invitro und Virofem: 630 nm, Virotech: 620 nm). Es wurde für diese Arbeit davon ausgegangen, daß das vorhandene Photometer, welches auf eine Wellenlänge von 650 nm eingestellt war, den Testanforderungen genüge. Dies wurde von Mitarbeitern der Firmen, welche die Testkits vertreiben, bestätigt.

Für den IgM-ELISA wird von allen Herstellern empfohlen, eine so genannte Voradsorption der Patientenseren durchzuführen, um erregerspezifische IgG-Ak aus dem Serum zu entfernen.

Einerseits kann es vorkommen, daß IgG-Ak und IgM-Ak um die Bindungsstellen des EV (Enterovirus) -Antigens konkurrieren und die IgG-Ak wegen höherer Konzentration im Vergleich

zu IgM-Ak und wegen der geringeren Größe schnellerer Diffusion die Bindungsstellen blockieren. So kann ein falsch negatives Ergebnis beim IgM-ELISA entstehen.

Andererseits kann durch eventuell vorhandene Rheumafaktoren bei nicht voradsorbierten Seren aus dem im Folgenden beschriebenen Grund ein falsch positives Ergebnis entstehen.

Rheumafaktoren sind Autoantikörper, die gegen den Fc-Teil der menschlichen IgG-Ak gerichtet sind. Sie binden in vivo an IgG-Ak, die ihrerseits im Test an das EV-Antigen binden.

Die Rheumafaktoren der Klasse IgM sind, werden als gebundene IgM-Antikörper vom Konjugat erkannt und verursachen so ein falsch positives Ergebnis. Rheumafaktoren können bei der Hälfte aller Menschen mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden. Sie können aber auch bei anderen Erkrankungen vorkommen und sind sogar bei ungefähr 5 % der gesunden Bevölkerung nachweisbar (98Wal).

### **2.2.2. Methodik der unterschiedlichen Testfabrikate im Einzelnen**

Alle Tests wurden nach Herstellervorschrift durchgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte für jeden Hersteller kurz angegeben.

#### **2.2.2.1. Test der Firma invitro**

Die Anleitung empfiehlt zur Kontrolle des Testergebnisses einen Leerwert für das Substrat (blank), eine negative Kontrolle und zwei positive Kontrollen.

Die in die Teststreifen einpipettierten Kontrollen und die 1:100 mit Verdünnungspuffer verdünnten Patientenserum werden abgedeckt und bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert.

Danach werden die Teststreifen mit 300 µl Waschlösung pro Nöpfchen des Teststreifens 5 mal ausgewaschen und danach kräftig ausgeklopft. Die dann mit Konjugat gefüllten Teststreifen werden abgedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Konjugat muß unmittelbar vor Gebrauch mit Verdünnungspuffer/Waschlösung gemischt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Teststreifen wieder wie oben beschrieben ausgewaschen.

Jetzt wird das gebrauchsfertige Substrat einpipettiert und die Teststreifen werden für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung beendet. Die Teststreifen können jetzt im Photometer gemessen werden. Um Adsorptionsmaterial zu sparen, wurde von der Firma empfohlen, bei IgM-ELISA-Durchführung die Vorbehandlung der Seren durch Adsorption der erregerspezifischen IgG-Antikörper nur bei Seren durchzuführen, die in einem vorigen Test entweder positiv oder grenzwertig gewesen waren. Die für die Auswertung der Testergebnisse benötigten Grenzwert-

te sind auf mitgelieferten Qualitätskontrollzertifikaten zu finden und betragen für IgA 0,3 OD (optische Dichte) und für IgM 0,45 OD.

#### **2.2.2.2. Test der Firma Virofem**

Die Testdurchführung bei Virofem ist nahezu identisch mit der Testdurchführung bei invitro.

Die Unterschiede sind das bei Virofem bereits gebrauchsfertige Konjugat, das, ohne verdünnt werden zu müssen, direkt im Test eingesetzt werden kann, und das kurz vor Gebrauch zu mischende Substrat (Chromogen), das in geringerer Menge als beim invitro Testsatz eingesetzt wird. Mit der Adsorption der erregerspezifischen IgG-Antikörper wurde ebenso verfahren, wie beim Testsatz von invitro.

Die Grenzwerte werden ebenfalls in der Anleitung mitgeliefert und betragen für IgA 0,2 OD und für IgM 0,25 OD. Bei Abweichen der Werte der Positivkontrollen von dem Richtwert 1,0 OD, wurde der gemessene Wert der Positivkontrolle als Kalibrator für die Grenzwerte benutzt, das heißt der gemessene Wert für die Positivkontrolle wurde mit dem vorgegebenen Cutoffwert, der für die Auswertung der Ergebnisse nötig war, multipliziert um den Cutoffwert anzupassen. So konnte das Testergebnis korrekt mit den anderen Testsätzen verglichen werden, ohne daß erhöhte Messungen im Photometer das Ergebnis beeinflussen.

Die von der Firma angegebenen Varianzwerte betragen für die Intratestvarianz 4,8 % und für die Intertestvarianz 8,2 %

#### **2.2.2.3. Test der Firma Virotech**

Der größte Unterschied zu den beiden vorhergehenden Testsätzen liegt darin, daß Virotech von den Testergebnissen Referenzwerte, die ebenfalls für jedes Serum gemessen werden müssen, abzieht. Dies bedeutet, daß für jedes zu messende Serum, ein Testwert und ein Referenzwert gemessen werden muß. Für den Referenzwert ist ebenfalls ein Nöpfchen vorhanden, in dem ein Kontrollantigen (Antigen von Zellen, die nicht durch Enteroviren infiziert waren), fixiert ist.

Neben dem Leerwert, der positiven und der negativen Kontrolle wird bei Virotech für jeden Testdurchgang auch eine Doppelbestimmung des Grenzwertes durchgeführt. Die Hälfte der Summe dieser beiden Grenzwerte ist dann der für die Auswertung zu verwendende Grenzwert.

Nachdem der Leerwert, die Kontrollen, die vorgegebene Flüssigkeit für die Grenzwerte und die verdünnten Patientenserum einpipettiert wurden, wird die Test- und Referenzstreifen ent-

haltende Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Waschen danach erfolgt 4 mal mit 300µl je Vertiefung. Dann werden die kurz zuvor anzusetzenden Konjugate (enzymmarkierte Antikörper gegen humanes IgA oder IgM, je nachdem, welche Antikörper gefunden werden sollen) einpipettiert und die Platte erneut bei 37 °C für 30 Minuten in feuchter Kammer inkubiert.

Gewaschen wird danach wieder wie zuvor.

Jetzt wird das gebrauchsfertige TMB-Substrat einpipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C in feuchter Kammer im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird durch Zufügen der Stopplösung beendet und die Platte kann im Photometer gemessen werden. Für die IgM-Bestimmung wurde bei allen Seren eine Adsorption durchgeführt.

### **2.2.3. Durchführung der Adsorption**

#### **2.2.3.1. Tests der Firmen invitro und Virofem**

Um die Adsorption durchzuführen, werden 10 µl des zu untersuchenden Serums in das mit dem Testsatz gelieferten Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits 190 µl Lösung Protein G vom Hersteller vorbereitet sind, und gut gemischt. Eine genauere Angabe bezüglich des Inhalts war den für die Arbeit vorliegenden Anleitungen nicht zu entnehmen. Die Mischung kann zentrifugiert werden oder für 15 Minuten stengelassen werden. Der klare Überstand wird 1:10 verdünnt und wird in dem Test verwendet.

#### **2.2.3.2. Test der Firma Virotech**

Für die Adsorption wird ein Tropfen der Adsorbenslösung, bestehend aus Antihuman-IgG (Ziege), in ein geeignetes Reaktionsgefäß gegeben, 5 µl Serum hinzu pipettiert und gut gemischt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit werden 450 µl Verdünnungspuffer/Waschlösung einpipettiert. Es wird empfohlen die Probe bei 650 g für 5 Minuten zu zentrifugieren.

Der klare Überstand kann in dem Test eingesetzt werden.

### **2.2.4. Normierung der Ergebnisse**

Um die Ergebnisse der verschiedenen Testsätze vergleichen zu können wurden die jeweiligen Testergebnisse (in optischer Dichte gemessen) folgendermaßen umgerechnet. Bei dem Test der Firma Virotech wurden zunächst die gemessenen Referenzwerte von den gemessenen Test- bzw. Grenzwerten subtrahiert. Bei den Tests der Firmen invitro und Virofem war es nicht notwendig, einen Referenzwert zu messen und zu subtrahieren. Diese Werte der Seren

wurden durch den im jeweiligen Testdurchgang gemessenen (bei Virotech zusätzlich umgerechneten) Grenzwert dividiert. Das dimensionslose Ergebnis (keine Einheit, da optische Dichte durch optische Dichte dividiert wurde) wurde bei Werten kleiner als 0,9 als negativ, bei Werten über 1,1 als positiv und bei Werten von 0,9 bis 1,1 als grenzwertig gewertet.

Laut der Testanleitung der Firma Virotech wurde empfohlen, diesen Wert mit 10 zu multiplizieren, wobei 9 oder kleiner als negativ, 9 bis 11 als grenzwertig, und Ergebnisse über 11 als positiv gewertet werden sollten. Diese Umrechnung wurde hier nicht vorgenommen, da zwischen beiden Auswertungsformen kein Unterschied im Ergebnis besteht. In den Anleitungen der Firmen invitro und Virofem wurde eine andere Auswertung empfohlen, bei der die gemessene optische Dichte mit einem für jede Testcharge in der Anleitung angegebenen Faktor multipliziert werden sollte. Das Ergebnis (Einheit: U/ml) sollte bei 60 bis 70 als grenzwertig gerechnet werden, bei Werten darüber als positiv und bei Werten darunter als negativ. Mitarbeiter der Firma invitro und Virofem bestätigten, dass eine Auswertung, wie hier vorgenommen ebenfalls möglich sei. Aus diesem Grund und wegen der einfacheren Vergleichsmöglichkeiten wurde die zuerst beschriebene Methode gewählt.

### **2.3. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten und der jahreszeitlichen Verteilung von Erkrankungsbeginn und Einsendedatum der Serumproben erfolgte nach dem  $\chi^2$ -Test, um feststellen zu können, ob statistisch signifikante Unterschiede vorlagen. Hierfür wurden die gefundenen Werte mit den für eine Gleichverteilung zu erwartenden Werten in den  $\chi^2$ -Test eingefügt. Diese erwarteten Werte wurden als Durchschnitt der gesamten Werte errechnet. Der ausgerechnete  $\chi^2$ -Wert wurde mit den vorgegebenen statistischen Tabellen für diesen Test (92Sac) verglichen um festzustellen, ob eine statistisch signifikante Abweichung von der Gleichverteilung vorlag.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Daten aus den Einsendeformularen und aus den Krankenakten

##### 3.1.1.1. Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Verdacht auf Myokarditis

Um festzustellen, ob unter den in diese Studie aufgenommenen Patienten eine Gruppe, bezogen auf Alter und Geschlecht, besonders häufig mit Myokarditis betroffen war, wurde nach Alter und Geschlecht sortiert. Bei Patienten, von denen mehrere Seren während derselben Erkrankung eingesandt wurden, wurden die Daten für diese Auswertung singularisiert, das heißt es wurden die entsprechenden Daten (Alter, Erkrankungsbeginn etc.) nur einmal in die Auswertung übernommen.

Insgesamt wurden im Zeitraum von November 1991 bis Oktober 1997 Seren von 492 Patienten (Gesamt, **Abb. 1**) mit Verdacht auf Myokarditis in das Institut für Medizinische Virologie der JLU eingesandt. Von den 492 Seren waren 286 von männlichen Patienten (Männlich, **Abb. 1**) und 206 von weiblichen Patienten (Weiblich, **Abb. 1**).

Zum besseren Überblick wurde noch eine Tabelle mit einer größeren Einteilung erstellt (**Tab. 1**). Hierbei erscheinen die Altersgruppen zwischen 21 und 60 Lebensjahren besonders stark betroffen. Um darüber allerdings eine genaue Aussage machen zu können, wurde die Patientengruppe, wie in **Abb. 2** dargestellt, mit der Gießener Allgemeinbevölkerung verglichen, in der Annahme, daß die meisten Patienten, deren Seren im Institut für medizinische Virologie der JLU untersucht wurden, aus dem Großraum Gießen stammen. Um die von der Anzahl her sehr verschiedenen Dateien vergleichen zu können, wurde in der Grafik der jeweilig dargestellte Altersbereich in Bezug zur Gesamtzahl gesetzt und so eine prozentuale Darstellung erreicht.

<b>Alter</b>	<b>Alle Patienten</b>	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>
<b>Unter 21</b>	12 %	10 %	14 %
<b>21 bis 40</b>	35 %	38 %	31 %
<b>41 bis 60</b>	35 %	38 %	31 %
<b>Über 60</b>	18 %	14 %	24 %

**Tab. 1: Alters- und Geschlechtsverteilung von Myokarditispatienten in Prozentangabe**

Im Altersbereich zwischen 41 und 75 scheint der Anteil der Patienten mit Verdacht auf Myokarditis im Vergleich mit der Gießener Allgemeinbevölkerung besonders hoch zu sein, mit einem auf ersten Blick deutlichen Höhepunkt in der Altersklasse der 56- bis 60-Jährigen.

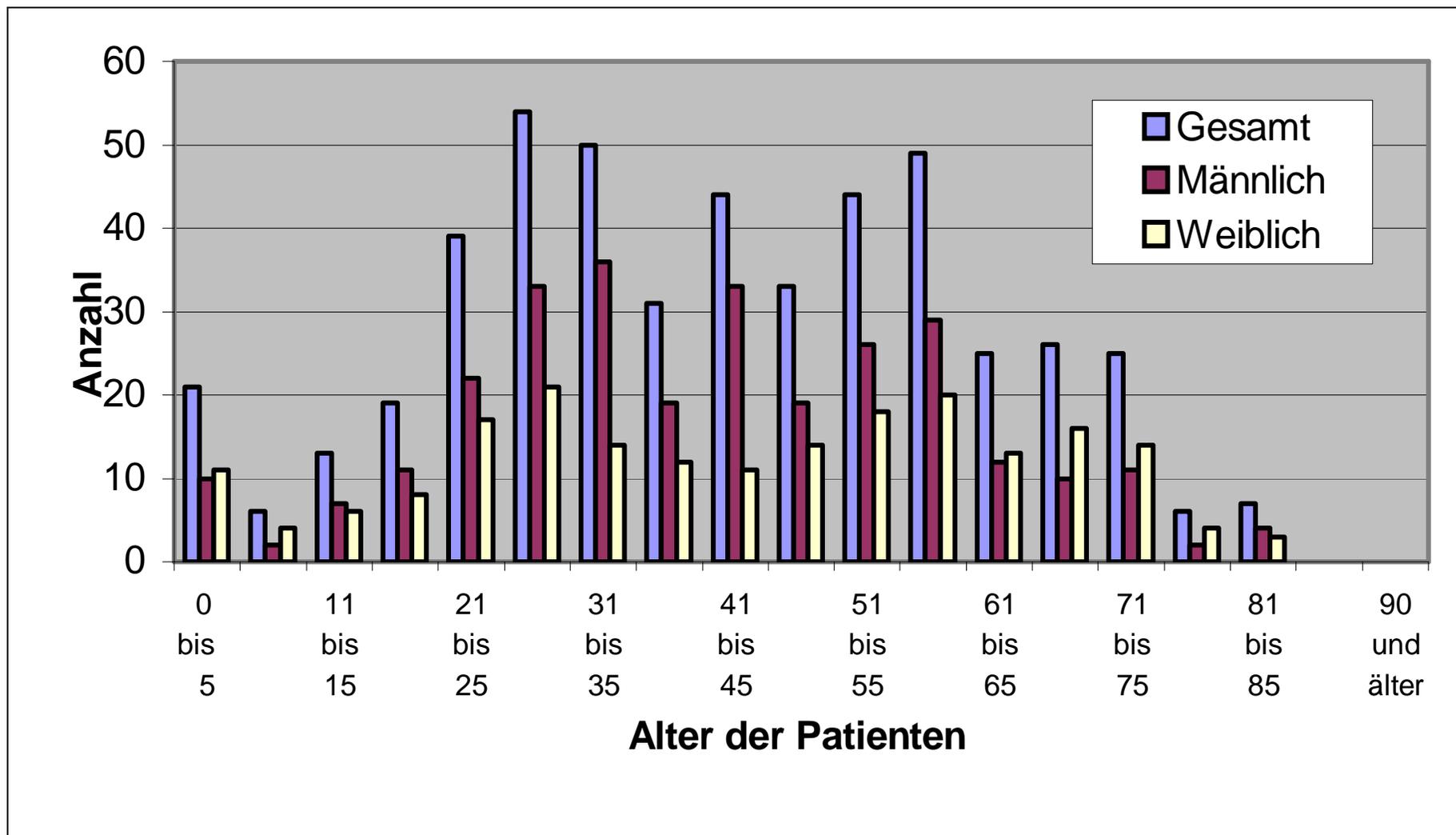
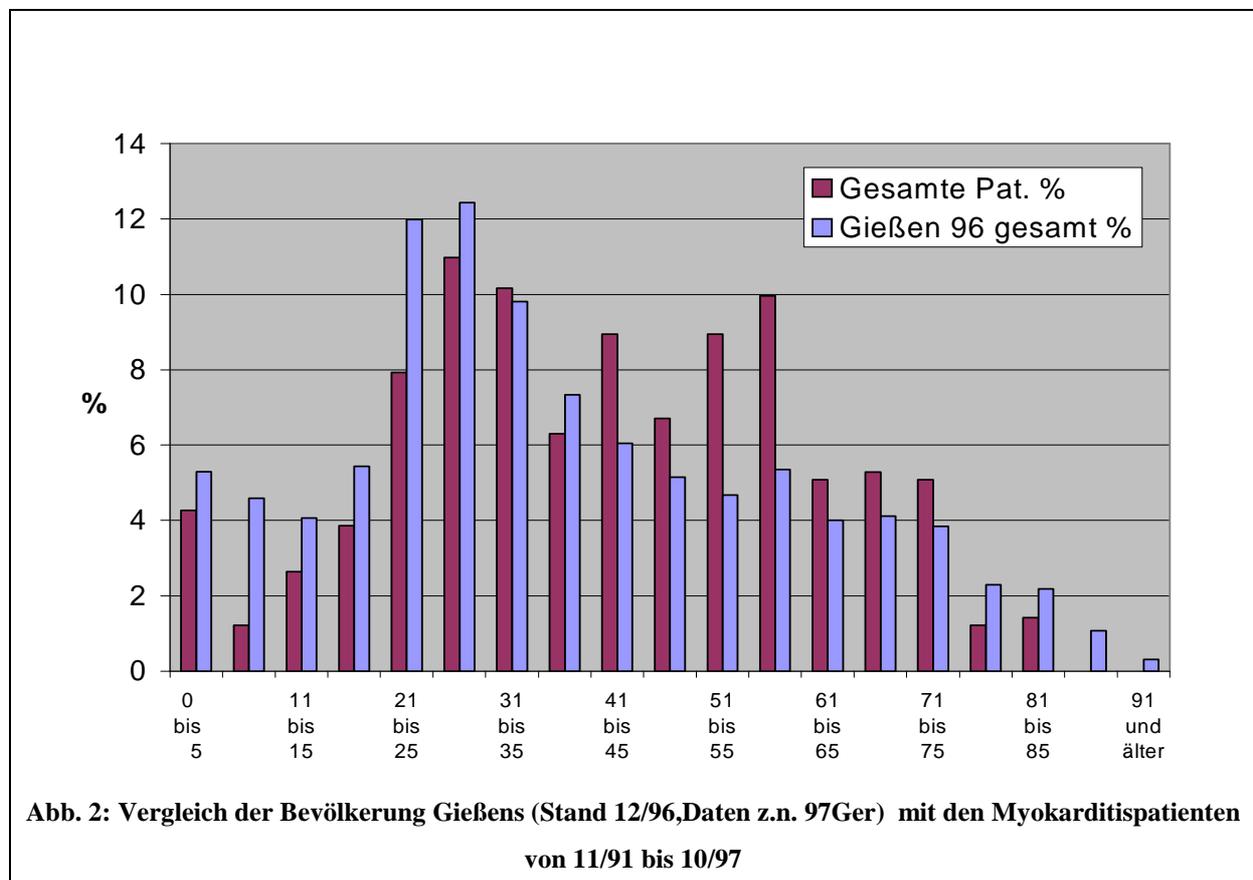


Abb. 1: Alters- und Geschlechtsverteilung von Myokarditispatienten im Zeitraum von 11/91 bis 10/97

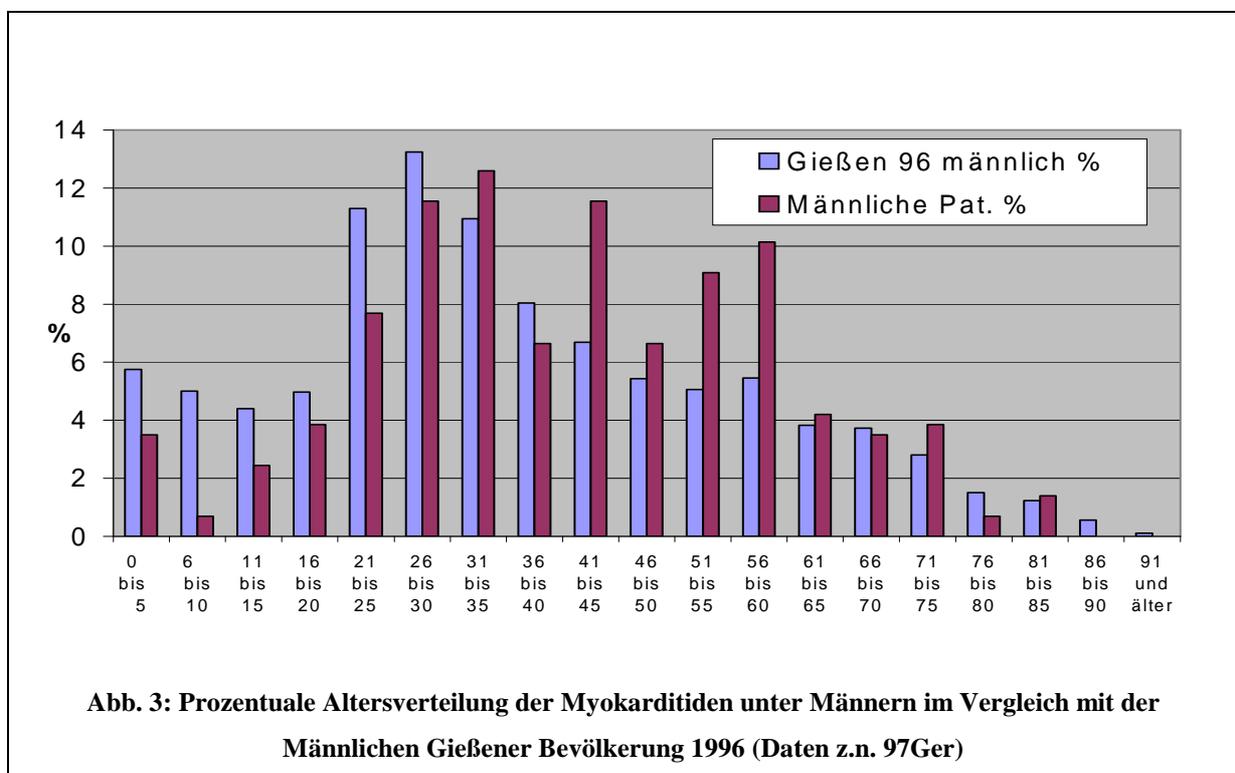
Der Vergleich der Altersstruktur der männlichen Patienten mit der Altersstruktur der männlichen Allgemeinbevölkerung von Gießen ist in **Abb. 3** dargestellt. Unter den 41 bis 45 Jahre und 51 bis 60 Jahre alten Männern scheint die Prävalenz der Myokarditis besonders hoch zu sein, wohingegen die Inzidenz bei den 6- bis 10-jährigen im Vergleich zur Altersstruktur der Allgemeinbevölkerung sehr gering erscheint. In **Abb. 4** wird die Altersverteilung der weiblichen Allgemeinbevölkerung Gießens mit der Altersverteilung der weiblichen Myokarditispatienten verglichen. Auch hier ist eine niedrige Prävalenz unter den 6- bis 10-jährigen festzustellen. Im Altersbereich von 46 bis 75 Jahren ist bei den weiblichen Patienten eine hohe Prävalenz festzustellen, mit dem Höhepunkt zwischen den 41- und 60-Jährigen.

### 3.1.1.2. Statistische Auswertung der Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Verdacht auf Myokarditis

Um eine statistische Auswertung des Patientenkollektivs zu ermöglichen wurde die Alters- und Geschlechtsverteilung der Bevölkerung Gießens (97Ger) mit der Verteilung des Patientenkollektivs verglichen. Die absoluten Zahlen wurden hierfür in Prozentangaben umgerechnet (**Abb. 2**).



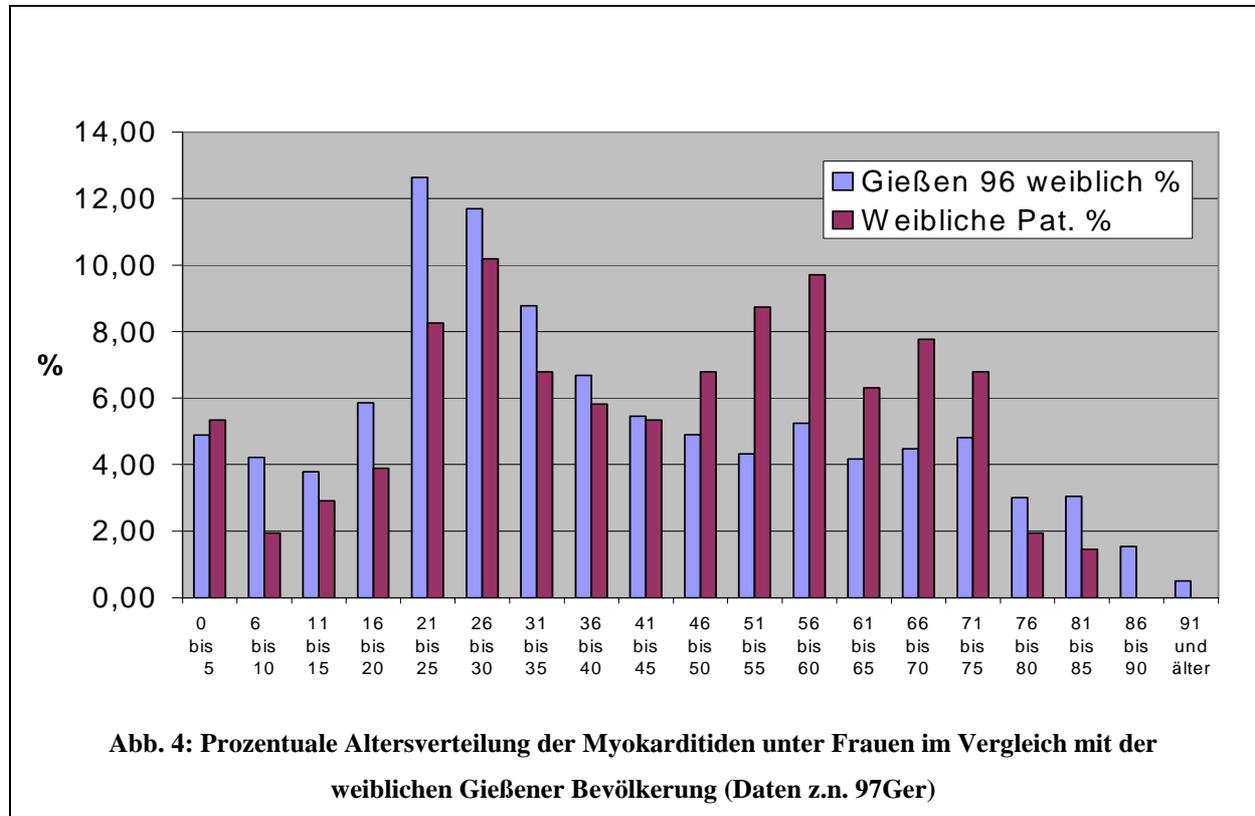
Der  $\chi^2$ -Wert für den Altersvergleich aller Patienten, unabhängig vom Geschlecht, mit der Bevölkerung Gießens beträgt 17,89 bei 16 Freiheitsgraden. Es ergeben sich 16 Freiheitsgrade in dieser Statistik, weil in den letzten beiden Kategorien (86 bis 90, 91 und älter) keine Patienten vorhanden sind und diese Kategorien dann mit der Kategorie 81 bis 85 zu der Kategorie 81 und älter zusammengezählt werden müssen. Ab einem  $\chi^2$ -Wert von 26,3 wäre mit einer 5 prozentigen Irrtumswahrscheinlichkeit eine Abweichung der Patientenverteilung von der Gesamtbevölkerung vorhanden. Demzufolge weicht die Altersstruktur der untersuchten Patienten nicht signifikant von der Altersstruktur der Gießener Bevölkerung ab und es ist im Vergleich zur Bevölkerung keine signifikante Häufung von Myokarditiden in einem bestimmten Alter festzustellen.



Nun wurde noch die Verteilung geschlechtsspezifisch betrachtet.

Der  $\chi^2$ -Wert für den Altersvergleich der männlichen Patienten mit der männlichen Bevölkerung Gießens beträgt 18,93 bei 15 Freiheitsgraden. Es ergeben sich 15 Freiheitsgrade, weil die Kategorien mit weniger als 1 % zu der vorangehenden Kategorie hinzugezählt werden müssen. Ab einem  $\chi^2$ -Wert von 25,0 wäre mit einer 5 prozentigen Irrtumswahrscheinlichkeit eine Abweichung der Patientenverteilung zur gegebenen Bevölkerungsverteilung vorhanden, also weicht die Altersstruktur der Patienten auch nicht signifikant von der Altersstruktur der Gie-

ßener Bevölkerung ab, wenn man nur isoliert die männlichen Personen betrachtet. Demzufolge war in diesem Patientengut bei Männern keine statistisch signifikante Häufung von Kardi-  
tiden in einem bestimmten Alter zu beobachten.



Der  $\chi^2$ -Wert für den Altersvergleich der weiblichen Patienten mit der weiblichen Bevölkerung Gießens beträgt 20,97 bei 17 Freiheitsgraden. 17 Freiheitsgrade entstehen aus den bereits zuvor beschriebenen Gründen. Ab einem  $\chi^2$ -Wert von 27,59 wäre mit einer 5 prozentigen Irrtumswahrscheinlichkeit eine Abweichung der Patientenverteilung zur gegebenen Bevölkerungsverteilung vorhanden. Auch die Altersstruktur der Patientinnen weicht nicht signifikant von der Altersstruktur der weiblichen Gießener Bevölkerung ab.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Verteilung der Myokarditispatienten nach Alter und Geschlecht nicht statistisch signifikant von der Verteilung der Gesamtbevölkerung Gießens abweicht.

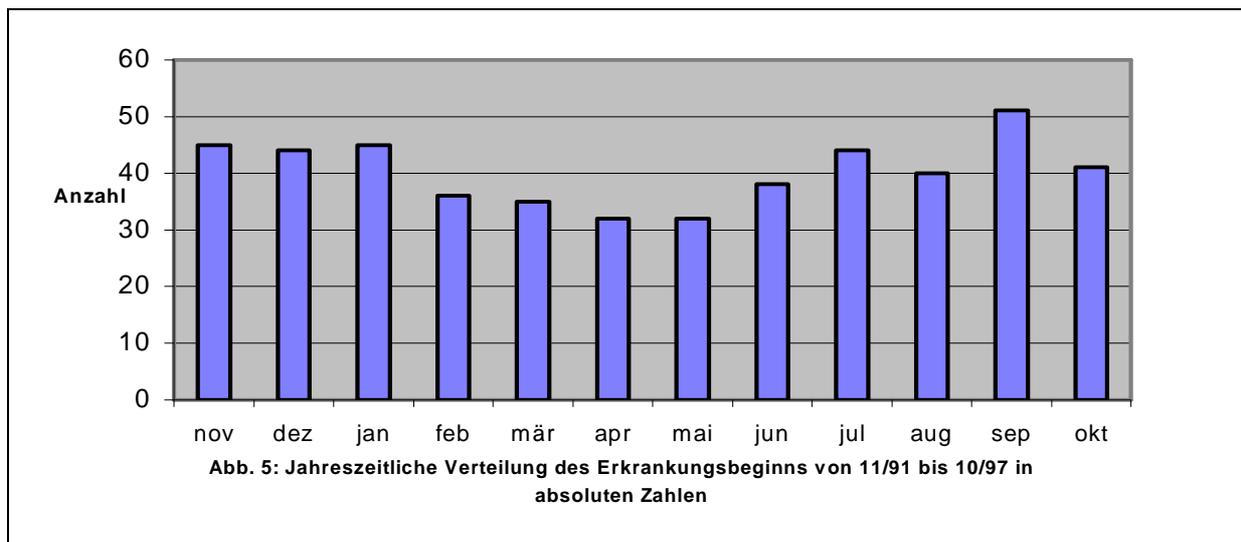
Nun wurde noch untersucht ob Männer, unabhängig vom Alter, häufiger betroffen waren als Frauen. Hierfür wurde ein Vierfeldertest durchgeführt. Verglichen wurden die männlichen Myokarditispatienten mit den weiblichen Patienten. Das ganze wurde ins Verhältnis gesetzt zur Gießener Bevölkerung. Bei 38610 männlichen und 41999 weiblichen Personen hätten für

eine Gleichverteilung bei 492 Patienten eine Anzahl von 236 männlichen und 256 weiblichen Patienten vorhanden sein sollen. Nun wurden die vorhandenen 286 männlichen und 206 weiblichen Patienten im Vierfeldertest mit diesen Zahlen verglichen. Es ergab sich dabei ein  $\chi^2$ -Wert von 20,4 bei einem Freiheitsgrad. Ab einem  $\chi^2$ -Wert von größer oder gleich 10,83 ist der Unterschied statistisch hochsignifikant. Es ergibt sich, daß Männer hochsignifikant häufiger betroffen sind als Frauen.

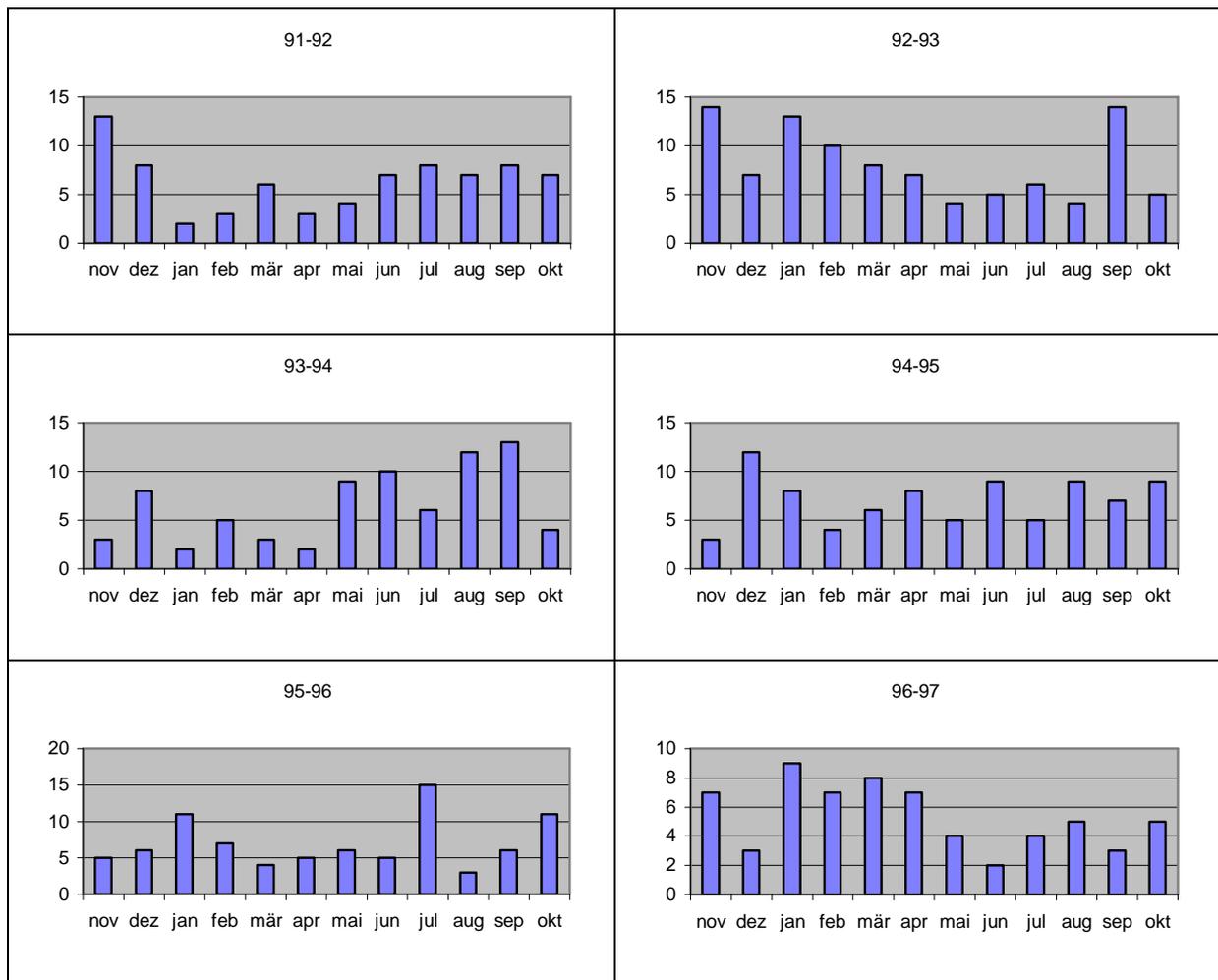
### 3.1.2.1. Jahreszeitliche Verteilung des Erkrankungsbeginns

Es war für diese Arbeit von Interesse, ob sich anhand des Erkrankungsbeginns der Myokarditis ein Hinweis auf einen Zusammenhang zu Enterovirusinfektionen erkennen läßt.

In der jahreszeitliche Verteilung des Erkrankungsbeginns von November 1991 bis Oktober 1997 scheinen die Erkrankungen ohne statistisch Auswertung im September ein Maximum zu erreichen (**Abb. 5**). Von Februar bis Mai liegen weniger Erkrankungsbeginne als in den restlichen Monaten vor.



Wenn man die Verteilung des Erkrankungsbeginns über die 6 Jahre von November 1991 bis Oktober 1997 in 12 monatige Abschnitte unterteilt (**Abb. 6**), ist festzustellen, daß es zwischen den Zeitabschnitten keine erkennbare Übereinstimmung gibt



**Abb. 6: Jahreszeitliche Verteilung des Erkrankungsbeginns unterteilt in jährliche Abschnitte in absoluten Zahlen**

### 3.1.2.2. Statistische Auswertung der jahreszeitlichen Verteilung des Erkrankungsbeginns

Bei der statistischen Auswertung der jahreszeitlichen Verteilung mit dem  $\chi^2$ -Test wurde ein  $\chi^2$ -Wert von 1,67 gefunden. Bei 11 Freiheitsgraden und einer 5 prozentigen Irrtumswahrscheinlichkeit wäre ein signifikantes Ergebnis ab einem  $\chi^2$ -Wert von größer oder gleich 19,68 gefunden worden. Somit fand sich keine Abweichung von der Gleichverteilung und es konnten folglich keine statistisch signifikanten Gipfel in der jahreszeitlichen Verteilung gefunden werden.

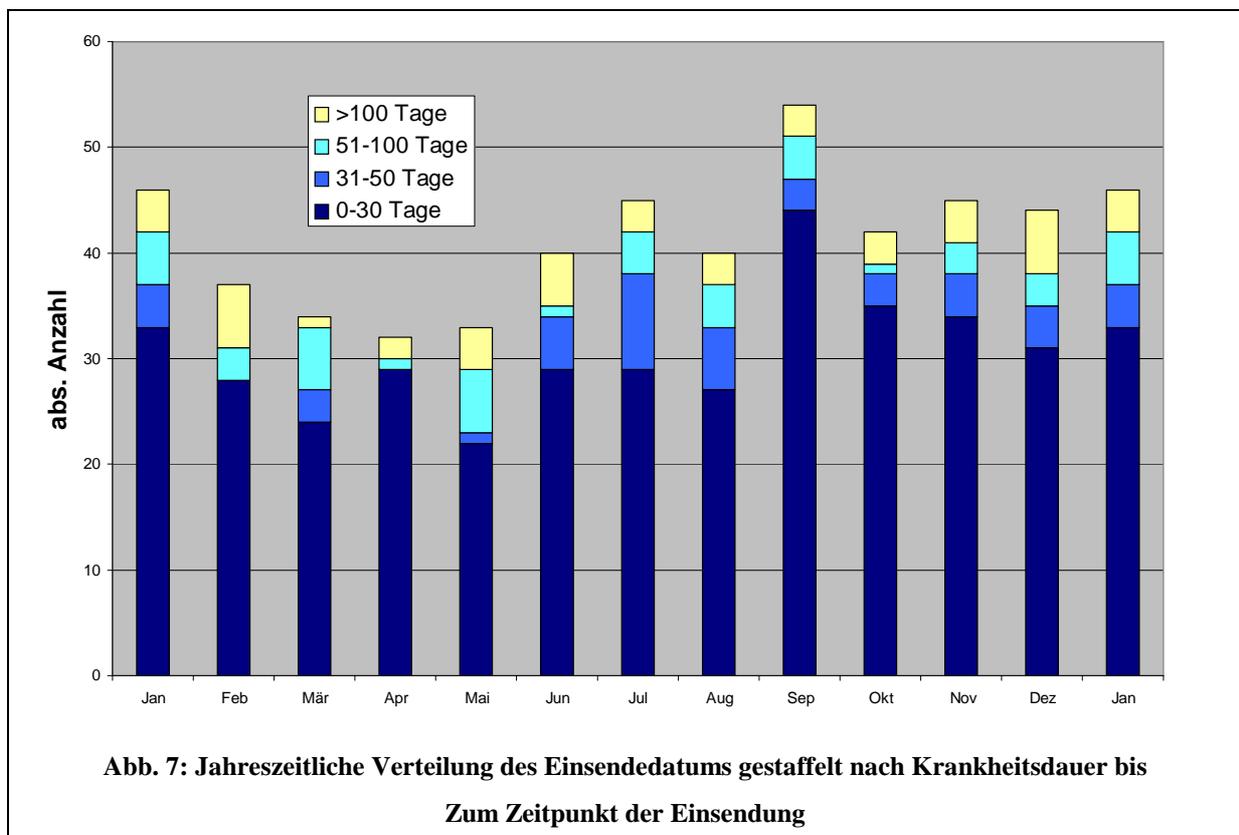
### 3.1.3.1. Verteilung der Einsendedataen

Das Einsenddatum wurde als Maß dafür genommen, wann die Erkrankung so ausgeprägt war, daß ärztliche Betreuung in einem Krankenhaus notwendig wurde.

Das Einsenddatum und der angegebene Erkrankungsbeginn waren nicht immer innerhalb desselben Monats. In 8 von 492 Fällen war der Erkrankungsbeginn über 1 Jahr vor dem Einsenddatum. Bei einem dieser 8 Fälle war der Erkrankungsbeginn sogar über 3 Jahre vor der Einsendung der Serumprobe.

Um festzustellen ob eine statistische Signifikanz in der Jahreszeitlichen Verteilung der Myokarditiden durch weniger akute oder eher chronische Verläufe nivelliert wurde, wurde die Verteilung der Einsendedataen nach Dauer der Erkrankung bis zum Einsenddatum gestaffelt. So konnten die akuten Fälle für diese Auswertung besser von weniger akuten bis chronischen Fällen unterschieden werden.

Die Grafik enthält das Einsenddatum aller 492 Serumproben (**Abb. 7**). Von jedem Patienten wurde nur das erste Einsenddatum für einen Erkrankungsfall in diese Auswertung aufgenommen, das heißt die Daten wurden singularisiert.



Es ist ein Gipfel im September zu sehen, der am deutlichsten wird, wenn man nur die Daten der kurz Erkrankten (Krankheitsdauer von 0 bis 30 Tagen) betrachtet. Im April wurden die wenigsten Seren eingesandt, was der Verteilung des Erkrankungsbeginns sehr ähnlich ist.

### 3.1.3.2 Statistischen Auswertung der Verteilung des Einsendedatums

Bei der Verteilung des Einsendedatums konnte ein  $\chi^2$ -Test durchgeführt werden. Der errechnete  $\chi^2$ -Wert betrug bei 11 Freiheitsgraden 10,9 für den gesamten Datensatz und 11,7 bei den Daten mit 30 oder weniger Tagen nach Erkrankungsbeginn. Bei 11 Freiheitsgraden und einer 5 prozentigen Irrtumswahrscheinlichkeit wäre ein signifikantes Ergebnis ab einem  $\chi^2$ -Wert von größer oder gleich 19,68 gefunden worden. Folglich konnte in beiden Fällen keine Abweichung von der Gleichverteilung festgestellt werden. Der vermeintliche Gipfel im September ist also nicht statistisch signifikant.

## 3.2. ELISA-Testergebnisse

### 3.2.1. Ergebnisse des Tests der Firma invitro

Es wurden 190 Seren mit dem Testsatz von invitro auf IgM und IgA Antikörper gegen Enteroviren getestet.

Ein einziges Serum war positiv in Bezug auf IgM Antikörper. Dieses Serum war ebenfalls positiv für IgA Antikörper.

**Tab. 2: Jahreszeitliche Verteilung der ELISA-Testergebnisse von invitro**

	Getestete Seren	Positive Seren	IgM positiv	IgA positiv	IgA+IgM positiv	Grenzwertige Seren	Negative Seren
Jan	13	2	0	2	0	1	10
Feb	15	3	0	3	0	4	8
Mär	16	1	0	1	0	4	11
Apr	13	1	1	1	1	3	9
Mai	10	2	0	2	0	1	7
Jun	18	1	0	1	0	4	13
Jul	12	4	0	4	0	0	8
Aug	21	3	0	3	0	3	15
Sep	19	4	0	4	0	1	14
Okt	27	1	0	1	0	1	25
Nov	10	2	0	2	0	1	7
Dez	16	3	0	3	0	2	12

Bei der Suche nach IgA Antikörpern fand der Testsatz von invitro 27 positive Seren, wovon eines auch ein positives Ergebnis im IgM-ELISA hatte.

25 Seren hatten mindestens ein grenzwertiges IgM oder IgA Ergebnis und bei 139 Seren waren beide Ergebnisse negativ.

Die jahreszeitliche Verteilung der Einsendedaten der Proben mit Ergebnissen ist in **Tab. 2** dargestellt.

### 3.2.2. Ergebnisse des Tests der Firma Virofem

Mit dem Testsatz von Virofem wurden 193 Seren auf IgM und IgA Antikörper gegen Enteroviren getestet. Bei zwei Seren war das Testergebnis für IgM positiv und bei 31 war es für IgA positiv. Es wurde kein Serum gefunden, das sowohl für IgM als auch für IgA positiv war. Bei 18 Seren war mindestens ein Ergebnis grenzwertig und bei 143 Seren waren beide Ergebnisse negativ. In **Tab. 3** ist die jahreszeitliche Verteilung der Einsendedaten mit den ELISA-Testergebnissen von Virofem dargestellt.

Der Testsatz der Firma Virofem fand zwei IgM Antikörper positive Seren, die beide IgA Antikörper negativ waren.

**Tab. 3: Jahreszeitliche Verteilung der ELISA-Testergebnisse von Virofem**

	Getestete Seren	Positive Seren	IgM positiv	IgA positiv	IgA+IgM positiv	Grenzwertige Seren	Negative Seren
Jan	13	3	0	3	0	1	9
Feb	14	3	0	3	0	0	11
Mär	16	4	0	4	0	0	12
Apr	12	2	0	2	0	1	9
Mai	10	2	0	2	0	2	6
Jun	17	0	0	0	0	2	15
Jul	13	3	1	2	0	0	10
Aug	23	3	0	3	0	3	17
Sep	20	5	1	4	0	3	13
Okt	29	2	0	2	0	2	25
Nov	10	2	0	2	0	2	6
Dez	16	4	0	4	0	2	10

### 3.2.3. Ergebnisse des Tests der Firma Virotech

375 Serumproben wurden mit dem Testsatz der Firma Virotech auf IgM und IgA Antikörper getestet.

14 dieser Seren waren IgM positiv, 17 waren IgA positiv und 3 waren sowohl IgA als auch IgM positiv, also hatten 28 Seren mindestens 1 sicher positives Ergebnis. Bei 30 Seren war mindestens 1 Ergebnis grenzwertig, was keine genaue Aussage darüber zulässt, ob die entsprechenden Antikörper im Serum vorhanden sind oder nicht. .

**Tab. 4: Jahreszeitliche Verteilung der ELISA-Testergebnisse von Virotech**

	Getestete Seren	Positive Seren	IgM Positiv	IgA Positiv	IgA+IgM positiv	Grenzwertige Seren	Negative Seren
Jan	26	3	3	2	2	0	23
Feb	27	1	0	1	0	3	23
Mär	31	2	1	1	0	2	27
Apr	30	1	0	1	0	3	26
Mai	20	4	3	1	0	1	16
Jun	29	1	1	0	0	2	26
Jul	27	2	1	1	0	4	21
Aug	33	2	1	1	0	2	29
Sep	41	3	2	1	0	3	35
Okt	44	1	1	0	0	1	42
Nov	23	4	0	4	0	3	16
Dez	44	4	1	4	1	6	35

Bei 319 Seren waren beide Testergebnisse, sowohl für IgM als auch für IgA, negativ.

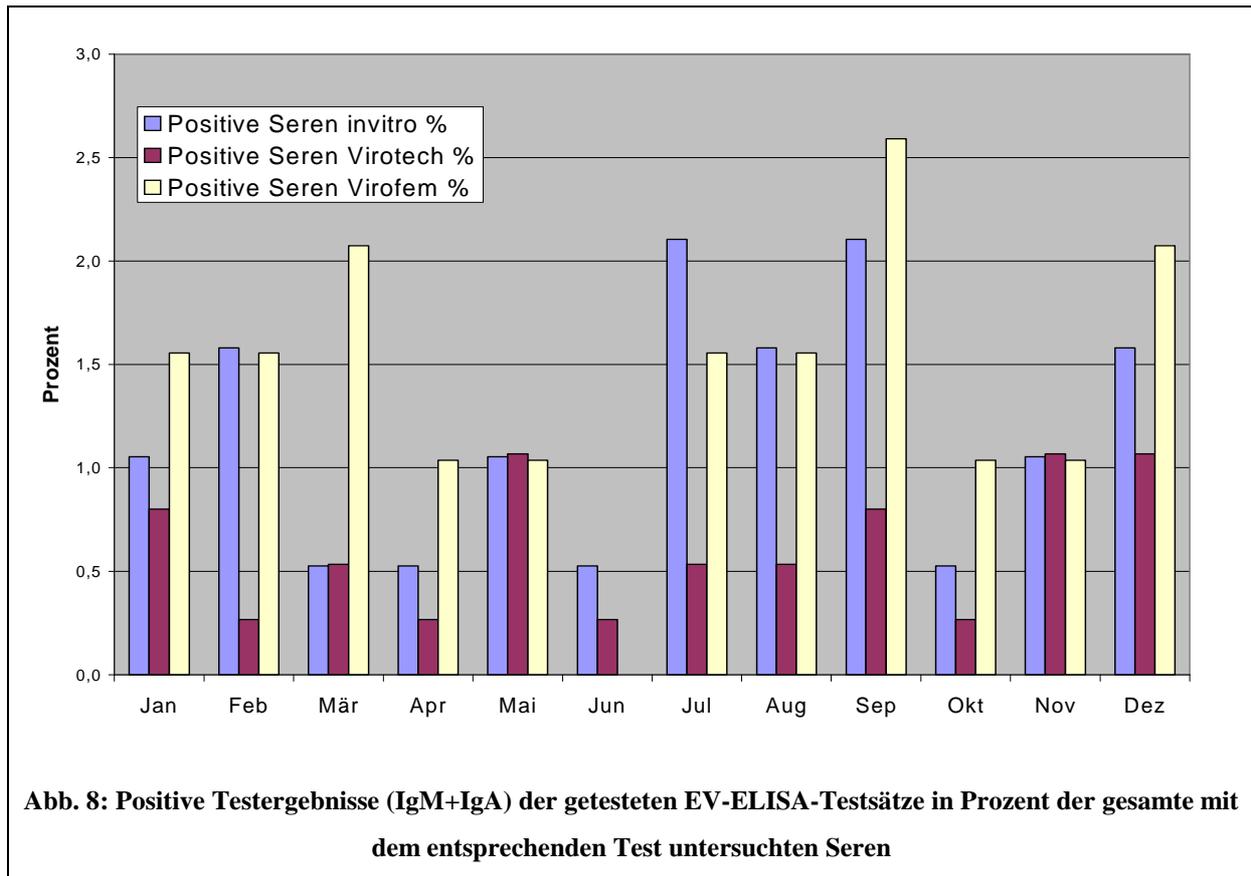
Die Jahreszeitliche Verteilung der Testergebnisse ist in **Tab. 4** dargestellt.

Bei 14 Seren wurden mit dem Testsatz der Firma Virotech IgM Antikörper gefunden. Bei 3 dieser Seren wurden auch IgA Antikörper gefunden.

### 3.2.4. Testergebnisse im prozentualen Überblick

Zum Überblick über die jahreszeitliche Verteilung der positiven Testergebnisse wurde eine Grafik erstellt, in der die positiven Ergebnisse prozentual zur Gesamtmenge der untersuchten Seren in einer jahreszeitlichen Verteilung dargestellt werden (**Abb. 8**).

Aufgrund der geringen Anzahl der positiven IgM Ergebnisse wurden die positiven IgA Ergebnisse hinzugenommen (s. dazu auch Kap. 1.2.). Seren, bei denen sowohl IgA als auch IgM positiv war, wurden nur einmal gewertet. Bei den mit dem Testsatz der Firma invitro getesteten Seren fand sich in 14 % ein positives Ergebnis. Mit den Testsätzen der Firmen Virofem und Virotech fanden sich entsprechend 17 % (Virofem) bzw. 8 % (Virotech).



### 3.2.5. Statistik der Testergebnisse

Bei der statistischen Auswertung der positiven IgM- und IgA -Ergebnisse (Abb. 8) mit dem  $\chi^2$ -Test konnte keine signifikante Abweichung von der Gleichverteilung in der jahreszeitlichen Verteilung gefunden werden. Eine Abweichung von der Gleichverteilung hätte eventuell zeigen können, ob positive IgM-Ergebnisse mit der bekannten jahreszeitlichen Häufung von Enterovirusinfektionen zusammenhängen. Bei 11 Freiheitsgraden betrug der  $\chi^2$ -Wert für die Ergebnisse mit dem Testsatz von invitro 6,33, für die Ergebnisse mit dem Testsatz von Virotech 7,14. Ab einem Wert von über 19,68 wäre eine signifikante Abweichung von der Gleichverteilung vorhanden gewesen. Bei den Ergebnissen mit dem Testsatz von Virofem ergab sich bei 10 Freiheitsgraden (aufgrund von fehlendem positiven Ergebnis in einem Monat) ein  $\chi^2$ -Wert von 6,63, wobei ab einem Wert von über 18,31 eine signifikante Abweichung von der Gleichverteilung bestanden hätte. Somit findet sich bei den Ergebnissen von allen Testsätzen keine jahreszeitliche Verteilung, die mit der bekannten jahreszeitlichen Häufung von Enterovirusinfektionen zusammenhängt.

### 3.2.6. Testergebnisse von Proben, die mit allen drei Testsätzen untersucht wurden

Unter den getesteten Seren war kein Serum, das bei allen drei Testsätzen ein positives IgM oder IgA Ergebnis gezeigt hat. Unter den positiven IgM Ergebnissen ist auch dann kein übereinstimmendes Testergebnis zu finden, wenn man zwei beliebige der drei Testsätze miteinander vergleicht. Anders bei positiven IgA Ergebnissen. Dort zeigen die Testsätze von invitro und Virofem bei 13 Seren (Insgesamt 27 positive Ergebnisse bei invitro und 31 bei Virofem) mit positivem IgA Ergebnis eine Übereinstimmung. Bei invitro und Virotech (Bei Virotech insgesamt 4 positive Ergebnisse) ist lediglich ein gemeinsam positives IgA Testergebnis zu finden und bei Virofem und Virotech kein einziges (**Tab. 5**).

**Tab. 5: Vergleich der Testergebnisse aller Seren, die mit allen Testsätzen getestet wurden (186 Seren)**

Testsätze	IgM positiv	IgM grenzwertig	IgM negativ	IgA positiv	IgA grenzwertig	IgA negativ
Nur invitro	1	8	177	27	16	143
Nur Virofem	2	6	178	31	11	144
Nur Virotech	5	3	178	4	10	172
Bei allen Tests gemeinsam	0	0	162	0	0	118
invitro und Virofem gemeinsam	0	0	169	13	0	124
invitro und Virotech gemeinsam	0	0	169	1	3	135
Virofem und Virotech Gemeinsam	0	1	171	0	0	135

### 3.2.7. Vergleich der Testsätze mit anderen Methoden

Aufgrund von Zweifeln an der Funktionsfähigkeit der Testsätze, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, um die Funktionsfähigkeit der Testsätze zu überprüfen. Hierfür wurden die Ergebnisse von bisher etablierten Untersuchungstechniken, dem Enterovirus-Nachweis und dem Neutralisationstest, mit den Ergebnissen der ELISA-Testsätze verglichen.

#### 3.2.7.1. ELISA-Testergebnisse aus Serumproben von Patienten mit Enterovirus-Nachweis

Zunächst wurden die Testsätze bei Seren angewandt, bei denen früher im Rahmen der Routinediagnostik bereits eine Enterovirusisolation gelungen war. Es handelte sich dabei nicht um Seren von Patienten, bei denen eine Myokarditis ablief. Es wurde davon ausgegangen, daß in

den meisten dieser Seren IgM-Ak nachweisbar sein sollten, wenn bei symptomatischen Patienten eine Virusisolation erfolgt war.

Dieser Test (**Tab. 6**) wurde nur mit den Testsätzen von Virofem und Virotech durchgeführt, da von den Testsätzen der Firma invitro für diesen Testdurchgang nicht mehr genügend Material vorhanden war und kein weiteres zur Verfügung stand.

Es zeigen sich nur sehr wenig positive Ergebnisse und keine Übereinstimmung der beiden Testsätze.

**Tab. 6: Testergebnisse des Virotech und des Virofem ELISAs bei Seren mit**

**Nachweis von Enteroviren (Optische Dichte umgerechnet nach in Kap. 2.2.4. beschriebener Methode)**

<b>Material</b>	<b>Isoliertes Virus</b>	<b>Virotech IgM</b>	<b>Virotech IgA</b>	<b>Virofem IgM</b>	<b>Virofem IgA</b>
75-8373	E25	0,3	0	0,3	0,1
76-2034 II	CB4	0,4	0,4	0	0
76-2206 V	CA9	0,3	0,1	0,6	0,2
76-2219 I	CB5	0,3	0,1	0	0
76-2292 III	CB5	<b>2,1</b>	0,2	0	0,3
77-821 II	CA9	0,2	0,2	0	0,2
77-1568 II	EV	0	0	0	0,1
78-1354 III	CA9	0,1	0,2	0,3	0
78-2467	CA9	0,3	0,1	0,3	0
78-2476 V	CA9	<b>1,5</b>	0,3	0,7	0,1
78-2493 II	CB3	0,3	0,2	0	0
78-2553 III	EV	0,5	0,3	0,2	0,5
78-2650 III	EV	0	0	0	<b>1,4</b>
81-4453 III	Echo 31	0,4	0,5	0	0,7
81-5435 I	CA9	0,6	<b>1,2</b>	0,2	0,1
82-2828 III	E9	0,2	0	0,1	0,1
83-3551 II	EV	0,7	<b>1,5</b>	0,2	0,5
84-4369 III	CB4	0,7	<b>2</b>	0	<b>2,1</b>

**Tab. 7a: Testergebnisse aller Testsätze bei Seren mit positivem IgM Coxsackie-B2/3/4-NT Titern.**  
**Grenzwertige (0,9-1,1) und positive (>1.1) Ergebnisse der ELISA´s sind dick geschrieben.**  
**(ELISA Ergebnisse: Optische Dichte umgerechnet nach in Kap. 2.2.4. beschriebener Methode**  
**NT Ergebnisse: Angabe der letzten Zahl des Titers einer Serumsverdünnungsreihe)**

Material-Code	IgM Virotech	IgM Virofem	IgM Invitro	IgM NT-B2	IgM NT-B3	IgM NT-B4
86/00308	0,1	0,1	0,6	8	0	0
85/03980	0,2	0,4 ; 0,3	<b>1,1 ; 0,9</b>	-	-	8
85/04221	0,8	0,1	<b>1</b>	0;0	0;0	8;0
85/04249	0,5	0,3	0,7	0;0	0;0	8;0
85/04740	0,3	0,3	<b>1</b>	8;8;8;8;8	0;0;0;0	0;0;0;0
86/00089	0,2	0,3	0,8	8;0	8	8
86/00699	0,1	0,3	<b>0,9</b>	-	-	8;0
86/00838	0,2	0,8	<b>1,1</b>	-	-	8;8;8;8
86/02661	0,3	0,2	0,7	-	-	8
86/03506	0,1	0,2	0,8	-	-	8
86/04092	0,4	0,4	<b>0,9</b>	8;8;8	-	8;8;8;8
86/06563	0,8	0,2	0,8	-	-	8;0
86/08440	<b>1,9 ; 1,6</b>	<b>1,0 ; 1,0</b>	<b>1,8 ; 1,6</b>	-	32;32;32;32	0;8;0;8
87/10313	0,1	0,3	0,7	-	8	-
88/02255	0,2	0,1	0,5	8	-	-
88/10245	0,3	0	0,3	0;8	-	-
88/12965	0,4	0,3	<b>1,1</b>	0	-	16
88/13035	0,2	0,1	0,2	8	-	0
89/00034	0,4	0,3	<b>0,9</b>	-	-	16
90/05371	0,2	0,2	0,5	-	8	-
90/06203	0,1	0,7	<b>1,1</b>	-	8	0
90/10083	<b>1,7 ; 2,1</b>	0,3 ; 0,1	0,6 ; 0,6	16	-	0
91/01908	0,4	0,3	<b>1,1</b>	-	-	16
91/02071	0,0 ; 0,1	0,1 ; 0,0	0,3 ; 0,2	32	-	-
91/04618	0,6	0,3	0,7	8	0	0
93/00287	0,3	0,3	<b>1</b>	-	-	8
93/04171	0,1 ; 0,3	0,1 ; 0,0	0,3 ; 0,3	-	-	32
93/14897	0,1	0,1	0,6	16	-	-
94/09601	0,3	0,4	0,5	-	8	-
95/06310	<b>1,7 ; 3,0</b>	0,1 ; 0,1	<b>3,4 ; 3,3</b>	0	64	0
96/10908	0,2 ; 0,3	0,1 ; 0,1	0,6 ; 0,6	32	-	-
96/11426	0,2	0,1	0,6	8	-	-
97/00387	0,2	0,2	0,7	16	-	-
97/01812	0,6	0,3	0,8	-	0	8
97/02648	0,2	0,1	0,8	-	-	16
97/05358	0,1	0,2	0,5	16	-	-
97/07593	0,1	0,3	0,5	-	-	16
97/08638	0,2	0,1	0,7	8	-	-
97/08760	0,1	0,2	0,6	-	-	8
97/10842	0,7 ; <b>0,9</b>	0,3 ; 0,3	<b>1,2 ; 1,0</b>	8	-	-

### 3.2.7.2. ELISA-Testergebnisse aus Serumproben mit positivem Befund im Coxsackie-IgM Antikörper-NT

Um die Testsätze mit einer etablierten Methodik zu vergleichen, welche genauso wie die Testsätze ebenfalls Antikörper im Serum nachweisen kann, wurden neben den zuvor erwähnten Seren auch Seren getestet, in denen im Rahmen der Routinediagnostik IgM-Antikörper gegen Coxsackieviren mit der in der Virologie der Justus-Liebig-Universität verwendeten Nachweismethode für Antikörper gegen Coxsackieviren, dem Neutralisationstest, gefunden worden waren. Hierfür konnte mit jedem der drei Testsätze ein Testdurchgang durchgeführt werden. Teilweise war aufgrund von Zweifeln an den Ergebnissen eine Doppeltestung durchgeführt worden, wobei beide Ergebnisse in die Tabelle (**Tab. 7a**) eingetragen wurden. Bei Doppeltestung wurde ein Ergebnis von negativ auf grenzwertig getestet und ein anderes von positiv auf grenzwertig. Die anderen Doppeltestungen bestätigten das vorangehende Ergebnis. Wie in **Tab. 7a** ersichtlich finden die ELISA-Testsätze nur bei einem Serum alle drei ein annähernd positives Ergebnis (2 Testsätze positiv, einer grenzwertig) und bei einem weiteren Serum sind die Ergebnisse von zwei Testsätzen positiv. Bei einigen Seren wurden zur Kontrolle Mehrfachtestungen durchgeführt. Deshalb finden sich an einigen Stellen der Tabelle mehrere Werte.

Bei allen anderen der insgesamt 40 Seren kommen nur wenige positive oder grenzwertige Ergebnisse vor. Zur besseren Übersicht wurde noch eine Tabelle, die die Anzahl der Übereinstimmungen der positiven Ergebnisse zwischen den verschiedenen Testsätzen zeigt (**Tab. 7b**). Die positiven Testergebnisse der Firmen Virotech und invitro zeigen zwar eine Übereinstimmung in 2 von 3 Fällen, im Vergleich zu den positiven Ergebnissen der Neutralisationstests lässt sich nur eine Übereinstimmung mit den höheren Titerergebnissen bei Testung auf IgM Antikörper gegen Coxsackievirus B3 feststellen.

Dies lässt zumindest Zweifel daran aufkommen, dass die Testsätze Antikörper gegen sämtliche Coxsackieviren, geschweige denn Enteroviren nachweisen können.

Zwar weißt der Neutralisationstest jeweils nur Antikörper gegen einen Serotypen der Enteroviren nach, aber die in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisse (**Tab.7a**) sind zuverlässig, zumal sie in der Routinediagnostik mit dem Goldstandard des Coxsackievirusantikörpernachweises, dem Neutralisationstest mit Ultrazentrifugation, erhoben wurden. An diesen Ergebnissen besteht kein Zweifel.

**Tab. 7b: Übereinstimmung der positiven Testergebnisse der verschiedenen Testsätze  
bei Seren mit positivem IgM Coxsackie-B2/3/4-NT**

Testsätze	Anzahl der positiven Ergebnisse
invitro	2
Virofem	0
Virotech	3
Bei allen Tests gemeinsam	0
Bei invitro und Virofem gemeinsam	0
Bei invitro und Virotech gemeinsam	2
Bei Virofem und Virotech gemeinsam	0

## 4. Diskussion

### 4.1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Es konnte in dieser Untersuchung keine statistisch signifikante Abweichung der Altersstruktur der Patienten mit Myokarditis von der der Gießener Bevölkerung gezeigt werden, unabhängig davon, ob die Myokarditis viral ausgelöst wurde oder eine andere Ursache zugrunde lag. Zwar sind in absoluten Zahlen angegeben die Erkrankungen in der Altersgruppe zwischen 20 und 39 Lebensjahren am höchsten, so daß man geneigt ist, sich den Untersuchungsergebnissen einer Studie mit neuseeländischen Patienten anzuschließen (83Lau), welche eben in dieser Altersgruppe auch die meisten durch Coxsackie B Viren ausgelösten kardialen Symptome gefunden hatte. Jedoch ist auch in der gesunden Bevölkerung diese Altersgruppe bei der Gießener Bevölkerung am stärksten vertreten, so daß es nicht verwunderlich erscheint, wenn unter den untersuchten Patienten diese Altersgruppe hervorsticht.

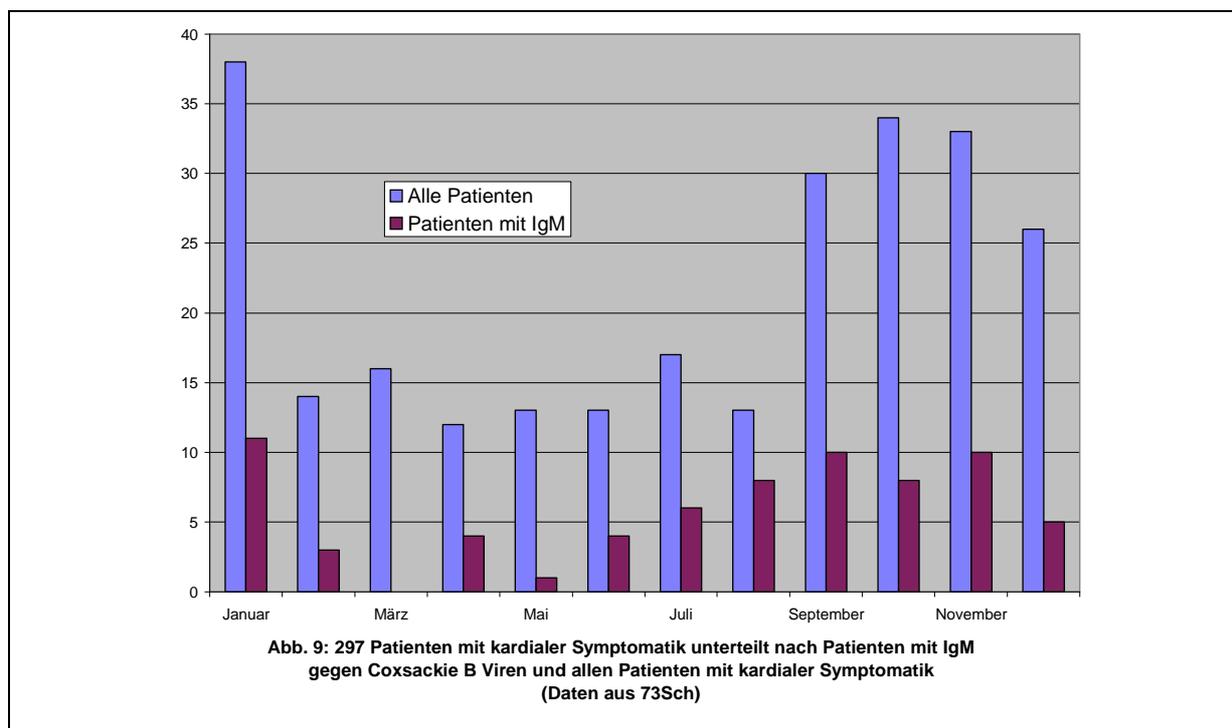
Obwohl laut Literatur bei Neugeborenen eine Myokarditis bei einer Infektion mit Coxsackieviren relativ häufig und auch mit schwerwiegenderer Symptomatik vorkommt (73Gea z.n. 80Woo), zeigte sich in dieser Untersuchung auch bei dieser Gruppe keine Häufung. Männliche Patienten waren jedoch, wie bereits zuvor beschrieben (69Gri z.n. 80Woo, 68Sai z.n. 80Woo), auch im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung mit 58 % deutlich häufiger betroffen als Frauen, obwohl Männer in der Gießener Allgemeinbevölkerung nur 48 % ausmachten.

Die Prävalenz von Myokarditiden lag bei dieser Untersuchung mit 492 Patienten aus einer Bevölkerung von 80609 bei ungefähr 0,6 %. In anderen Untersuchungen wird eine Prävalenz zwischen 2,5 % und 5,0 % angegeben (47Gor z.n. 80Woo, 70Ste z.n. 80Woo, 79Ban z.n. 80Woo). Jedoch sind die 0,6 % im Vergleich zu den aus der Literatur angegebenen Zahlen nur wenig aussagekräftig, weil hierbei nicht die gesamte Bevölkerung Gießen untersucht wurde, sondern nur behandlungsbedürftige Patienten in einem Zeitraum von 6 Jahren.

### 4.2. Verteilung des Erkrankungsbeginns

Die gefundene Verteilung des Erkrankungsbeginns der untersuchten Patienten über die Monate (**Abb. 5**) läßt zunächst eine Häufung der Myokarditiden von Ende Sommer bis Anfang Winter vermuten. Jedoch war die Verteilung, wenn sie in die einzelnen Jahre unterteilt wurde (**Abb. 6**) sehr unregelmäßig und ergab verschiedene jahreszeitliche Gipfel für jedes Jahr. In der statistischen Auswertung ließ sich keine signifikante Abweichung zur Gleichverteilung nachweisen. Bei anderen Untersuchungen war aus der Literatur (**Abb. 9** 73Sch) eine deutlichere Abgrenzung gefunden worden. Dabei war unter Myokarditispatienten und Patienten mit

Pleuraerguß nach IgM-Ak gegen Coxsackieviren mittels des Neutralisationstestes gesucht worden (73Sch). In **Abb. 9** lässt sich die Vermutung, daß Myokarditiden häufig durch Enteroviren verursacht werden, gut nachvollziehen, denn die Häufung der Myokarditiserkrankungen stimmen in etwa mit der bekannten jahreszeitlichen Häufungen von Enteroviruserkrankungen überein. Die Verteilung dieser Fälle weicht auch statistisch signifikant von der Gleichverteilung ab, denn der  $\chi^2$ -Wert beträgt bei 11 Freiheitsgraden für alle Patienten 49,44 und für die Patienten mit IgM 24,64. Eine Abweichung von der Gleichverteilung ist mit 5 prozentiger Irrtumswahrscheinlichkeit ab einem  $\chi^2$ -Wert von 19,86 signifikant.



Bei den in dieser Arbeit untersuchten Fällen konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Verteilung gefunden werden.

#### 4.3. Verteilung des Einsendedatums

Das in der Verteilung des Einsendedatums (**Abb. 7**) gefundene Maximum im September, scheint zunächst zu einer möglichen Verursachung durch Enteroviren zu passen. September als Maximum würde zu den in der Literatur (**Abb. 9** 73Sch, 02Doe, 01Fie) angegebenen Zeiträumen, in denen Enterovirusinfektionen gehäuft auftreten, passen. Schmidt findet eine Häufung der durch Coxsackieviren verursachten Pleuraergüsse und Myokarditiden von Herbst bis Januar (73Sch). Fields beschreibt in der 3. Auflage eine Untersuchung der CDC (Centers for

disease control) von 1970 bis 1983 mit über 23.000 Virusisolierungen, meist bei meldepflichtigen Meningitispatienten in den USA. Dabei fand sich eine 6 bis 7 mal höhere Rate an Virusisolierungen zwischen Juni und Oktober mit einem Gipfel im August im Vergleich zu anderen Monaten (96Fie). Somit kann man mit hoher Sicherheit davon ausgehen, daß die Erkrankungsspitze der durch Enteroviren verursachten Krankheiten im Spätsommer ist. Jedoch zeigt sich in der Statistik für diese Studie keine signifikante Häufung, weder für den Spätsommer noch für das Jahresende.

#### 4.4. ELISA-Testergebnisse

##### 4.4.1. Ergebnisse der Testsätze einzeln betrachtet

Bei den Ergebnissen mit dem Testsatz der Firma invitro wurde nur ein positives IgM Ergebnis aus 190 getesteten Seren gefunden (**Tab. 1**). Dieses Ergebnis entspricht nicht dem erwarteten Ergebnis der Verteilung der durch Enteroviren verursachten Myokarditiden. Es würde bedeuten, daß fast alle der untersuchten Myokarditisfälle nicht auf eine akute Enterovirusinfektion zurückzuführen sind.

Werden die positiven IgA Ergebnisse noch hinzugenommen, was wie unter Kapitel 1.2. beschrieben sinnvoll sein kann, dann ergibt sich eine Verteilung wie in **Tab. 1** und **Abb. 8** dargestellt ist. Man findet keinen statistisch signifikanten Gipfel in der jahreszeitlichen Verteilung.

Der Testsatz der Firma Virofem fand unter 193 getesteten Seren nur zwei positive IgM-Ergebnisse (**Tab. 3**). Zusammen mit den positiven IgA Ergebnissen wurden 17 % der untersuchten Seren für positiv gefunden. Die Verteilung ist in **Tab.3** und **Abb. 8** dargestellt. Man findet ebenfalls keinen signifikanten Gipfel.

14 der 375 mit Virotech getesteten Seren hatten positive Ergebnisse bei der Untersuchung auf IgM Antikörper. Die meisten IgM positiven Seren wurden im Januar und im Mai gefunden (**Tab. 4**). Positive IgM oder IgA Ergebnisse wurden bei 8 % der untersuchten Seren gefunden. Die jahreszeitliche Verteilung (**Tab. 4, Abb. 8**) zeigt drei nur gering über den restlichen Ergebnissen liegende Gipfel: im November bis Januar, im Mai und im September, die allerdings nicht statistisch signifikant sind.

Zusammenfassend zeigten die Testergebnisse keine erhoffte jahreszeitliche Verteilung, die der in der Literatur beschriebenen (02Doe, 01Fie) Verteilung der durch Enteroviren ausgelösten Erkrankung in den gemäßigten Klimazonen ähnelt.

#### **4.4.2. Vergleich Testergebnisse der drei Testsätze**

Bei 186 Seren wurde mit allen drei Testsätzen je eine Untersuchung auf IgM- und IgA-Antikörper durchgeführt. 162 dieser Seren waren bei allen drei Testsätzen IgM negativ. Dies entspricht ungefähr 87 % der gesamten Ergebnisse. Die IgA negativen Ergebnisse stimmen bei 63 % der auf IgA getesteten Seren überein.

Keine der untersuchten Serumproben reagierte in allen drei Tests übereinstimmend positiv.

Eine Übereinstimmung zeigt sich nur, wenn die IgA Testergebnisse der Testsätze der Firmen invitro und Virofem verglichen werden. Beide verwenden hitzeinaktiviertes Antigen von Coxsackievirus B5, was zumindest beim Test auf IgA-Antikörper eine Übereinstimmung in knapp 50 % zeigt. Beim Test auf IgM-Antikörper zeigten sie keine übereinstimmenden Ergebnisse (s. **Tab. 5**).

Dies lässt Zweifel an der Funktionsfähigkeit der Testsätze aufkommen, denn es war zumindest eine weitgehende Übereinstimmung erwartet worden. Ähnliche enterospezifische ELISAs waren in der Literatur (92Bom, 93Swa) als hochsensibel oder verlässlich beschrieben worden. Mit den bisher vorliegenden Ergebnissen konnte diese Feststellung nicht bestätigt werden.

#### **4.5. Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit anderen Methoden**

##### **4.5.1 Virotech und Virofem ELISA-Testergebnisse aus Serumproben von Patienten mit Enterovirus-Nachweis**

In 13 Fällen der 18 Seren, bei denen Enteroviren nachgewiesen worden waren, stimmen die für IgM und IgA gefundenen Ergebnisse überein. Jedoch nur in einem dieser Fälle war ein positives Ergebnis gefunden worden. Die restlichen 5 Fälle zeigten positive Ergebnisse bei IgM oder IgA, jedoch nur jeweils in einem der beiden verwendeten Testsätze, wohingegen der andere Testsatz keine Antikörper finden konnte. Ein übereinstimmendes positives Ergebnis von 6 Fällen, bzw. von 18 Fällen (davon ausgehend, daß die Testsätze eigentlich bei jedem der Seren Antikörper nachweisen sollten) ist nicht zufriedenstellend. Die Sensivität der Testsätze erscheint bei diesen Ergebnissen im Gegensatz zur Literatur (92Bom, 93Swa, 90Sam) mangelhaft.

#### 4.5.2. ELISA-Testergebnisse aus Serumproben mit positivem Coxsackie-IgM-Antikörper-NT

Der Neutralisationstest hatte im Rahmen der Routinediagnostik in der medizinischen Virologie der JLU-Gießen durch erfahrenes Personal bei 40 Seren neutralisierende IgM-Antikörper gegen Coxsackieviren der Gruppe 2, 3 oder 4 gefunden. Der Testsatz der Firma Virofem wies in keinem dieser Seren IgM-Antikörper nach. Nur in einem Fall wurde ein grenzwertiges Ergebnis gefunden.

Das Testsatz der Firma Virotech hatte bei 3 der 40 Seren ein positives Ergebnis für IgM-Antikörper und bei 1 Serum ein grenzwertiges Ergebnis.

2 IgM positive Seren und 10 IgM grenzwertige Seren wurden durch den Test der Firma invitro gefunden.

Auch dieser Testdurchgang weckt berechtigte Zweifel, ob die im Handel angebotenen Testsätze zum Nachweis von Antikörpern gegen Enteroviren geeignet sind, zumal alle drei Testsätze auf einem sehr ähnlichen Testprinzip (basierend auf 92Bom) beruhen.

McCartney beschreibt 1986 eine Versuchsreihe, bei der ein Coxsackie-B-Virus IgM ELISA mit NT Ergebnissen verglichen wird. Dabei wurde eine Übereinstimmung beider Testverfahren in ungefähr 90 % gefunden, wenn der NT-Titer größer oder gleich 1:256 war. Zusätzlich wurde dabei noch zwischen monotypischer und heterotypischer Übereinstimmung unterschieden. So war die Übereinstimmung bei monotypischen IgM Antikörpern (bei positiven Testergebnissen gegen den gleichen Serotyp in beiden Testverfahren) bei 30 % (86McC).

Bei den Ergebnissen dieser Untersuchung konnte eine Übereinstimmung in maximal 7,5 % ( 3 von 40 bei Virotech ) gefunden werden, wobei sich hierbei keine Seren mit einem Titer von 1:256 oder höher fanden, sondern nur Seren mit einem Titer bis maximal 1:64 vorhanden waren.

Die Unterschiede dieser Ergebnisse können verschiedene Ursachen haben. Zum einen kommen die unterschiedlichen ELISA Verfahren in Frage. Zum anderen mag es daran liegen, daß in der vorliegenden Studie nur Seren mit niedrigeren Titern im NT verwendet wurden, jedoch sollten auch bei solchen Seren keine so relevanten Unterschiede zwischen den untersuchten Testsätzen vorhanden sein, denn auch bei niedrigen Titern sollten geeignete Testverfahren übereinstimmend positive oder zumindest grenzwertige Ergebnisse zeigen. Wenn sie dies nicht tun sind sie dem NT-Verfahren deutlich unterlegen oder prinzipiell nicht fähig, Antikörper zuverlässig nachzuweisen.

In einer anderen Studie (92Bom) wurde ein ELISA, auf dem die Testsätze, welche für die vorliegende Studie verwendet wurden, basieren, im Vergleich zur Komplementbindungsreaktion als verlässlich in der serologischen Enterovirusdiagnostik befunden. Dabei wurden 19 Enteroviruspatienten mit dem ELISA auf IgA, IgM und IgG untersucht und mit zwei Kontrollgruppen verglichen. Wie bereits erwähnt, konnte in der vorliegenden Studie weder eine Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Testsätzen, noch eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Neutralisationstests, welcher derzeit der Goldstandard in der Enterovirusdiagnostik ist, gefunden werden. So kann die vorliegende Studie die getesteten Testsätze nicht als verlässlich in der serologischen Enterovirusdiagnostik bezeichnen. Das in den getesteten Testsätzen verwendete Antigen wurde im Vergleich zu der Studie von Boman (92Bom) noch verändert. Neben Antigen von Coxsackievirus B5 wurde zusätzlich noch Antigen von Echovirus 24 verwendet, um ein größeres Spektrum von Enteroviren erfassen zu können. Antikörper gegen Coxsackieviren der Gruppen B2, B3 und B4 konnten durch diese Testsätze jedoch nur gelegentlich und bis auf zwei Fälle (siehe **Tab. 7**) nur von einzelnen Testsätzen als sicher positiv erkannt werden. Möglicherweise können Antikörper gegen diese Viren nicht von den verwendeten Testsätzen erkannt werden, was allerdings nicht aus den Testbeschreibungen hervorgeht, oder die Sensitivität des ELISA entspricht dem des NT nur in ungenügendem Maße.

Bei fehlender Übereinstimmung der Testsätze läßt sich auch kein Testsatz herausziehen, von dem man sagen könnte, daß er besser funktioniere als die anderen beiden.

Als Resultat bleibt leider, daß keiner der getesteten Testsätze für eine Routinediagnostik bei Verdacht auf Myokarditis oder anderen enteroviral bedingten Erkrankungen eine verlässliche Aussage zum Infektionsstatus des untersuchten Patienten machen kann

## 5. Zusammenfassung/Abstract

In der vorliegenden Studie wurden drei kommerziell angebotene Testsätze zur Erkennung von Antikörpern gegen Enteroviren nach der Methode des indirekten ELISA verwendet, zunächst um Seren von Patienten mit Verdacht auf Myokarditis zu untersuchen. In Anbetracht der dabei gefundenen Ergebnisse kamen Zweifel an der Funktionsfähigkeit der Testsätze auf, weil die Ergebnisse der Testsätze untereinander in keiner Weise übereinstimmten. Deshalb wurde von dem ursprünglichen Ziel – die Häufigkeit und Verteilung von Enterovirusinfektionen bei Myokarditiden – abgewichen, und stattdessen anhand von Kontrollgruppen die Funktionsfähigkeit der Testsätze überprüft. Dies wurde zum einen mit Seren von Patienten durchgeführt, bei denen aus Stuhlproben oder Rachenabstrichen Enteroviren isoliert worden waren, und zum anderen mit Seren, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik bereits mit dem Neutralisationstest IgM Antikörper nachgewiesen worden waren. Dabei wurde festgestellt, daß die Testsätze nur bei wenigen der gerade beschriebenen Seren Antikörper nachweisen konnten, und daß die Ergebnisse der Testsätze, wie bereits zuvor festgestellt, untereinander fast nie übereinstimmten. Das Resultat war, daß keiner der Testsätze für die Routinediagnostik geeignet ist, weil die Ergebnisse nicht verlässlich sind, entgegen den in der Literatur beschriebenen ELISAs.

Abzuwarten bleibt, ob diese Mängel behoben werden können (Virotech hat den Testsatz bereits weiter bearbeitet) und der in der Routinediagnostik nur mühsam und langsam durchführbare, serotypspezifische Neutralisationstest abgelöst werden kann.

In the present study three commercially available test kits for the detection of antibodies to enteroviruses, using the indirect ELISA method, were used to test serum samples of patients with symptoms signaling myocarditis. The evaluation of the results raised doubts about the reliability of these commercial tests because the results were discordant in nearly all cases. We therefore decided to change the purpose of the study, which originally was to investigate the frequency and distribution of enteroviral infections during myocarditis. Instead the reliability of the used test kits was tested for by using predefined serum samples of different control groups.

One of these control groups were patients from whom an enterovirus had been isolated from a fecal specimen or throat swab. The other control group, in course of the routine diagnostics, had shown IgM antibodies to an enterovirus by use of a neutralisation assay.

The test kits investigated could detect antibodies in only a few of these samples. In addition, also in these control groups the results of the three test kits were discordant in nearly all cases. This leads to the conclusion that none of these test kits are suitable for routine diagnostics. Obviously, they are not able to achieve appropriate results, whereas the ELISAs for detection of enteroviral antibodies described in the literature have been claimed to function well. Hopefully, the defects can be eliminated in near future (Virotech, to our knowledge, already worked on their test). As long as this is not the case, the ELISAs are not qualified to replace the time-consuming and laborious serotype-specific neutralisation assay, which is currently in use for the detection of enteroviral antibodies.

## 6. Literatur

- 02Doe H. W. Doerr, W. H. Gerlich  
Medizinische Virologie  
Thieme, Stuttgart (2002)
- 01Fie B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al.:  
Virology.  
Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia (2001)
- 00Bun Verordnung zur Ausdehnung der Vorschriften über die Zulassung und staatliche Chargenprüfung auf Tests zur in-vitro-Diagnostik nach dem Arzneimittelgesetz  
(In-vitro-Diagnostika-Verordnung nach dem Arzneimittelgesetz – IVD-AMG-V) vom 24. Mai 2000  
Bundesgesetzblatt Jahrgang 2000 Teil I Nr. 24, ausgegeben zu Bonn am 31. Mai 2000
- 97Ger H. Gerlach:  
Statistischer Jahresbericht, Gießen, Deutschland, 1996.  
Amt für Magistrats- und Presseangelegenheiten
- 96And L. Andreoletti, D. Hober, C. Decoene, M.-C, Copin, P.-E. Lobert, A. Dewilde, C. Stankowiac, P. Wattré:  
Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in endomyocardial tissue of patients with chronic cardiac diseases.  
J. Med. Virol. **48**, 53-59 (1996)
- 96Fie B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al.:  
Virology.  
Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia (1996)
- 94Ray C. G. Ray  
Enteroviruses and Reoviruses  
In: K. J. Isselbacher, et al. (eds.): Principles of internal medicine, 821-825 (1994)
- 94Sch T.F. Schwarz:  
Coxsackie- und Echoviren.  
invitro Diagnostica Nachrichten **24** (1994),  
Blackwell Wissenschafts Verlag
- 94Wyn J. Wynne, E. Braunwald  
The cardiomyopathies and myocarditides  
In: K. J. Isselbacher, et al. (eds.): Principles of internal medicine, 1093-1094 (1994)

- 93Swa C.M.A. Swanik, L. Veenstra, Y.A.G.M. Poort, J.A. Kaan, J.M.D. Galama:  
Coxsackievirus B1-based antibody-capture enzyme-linked immunosorbent as  
say for detection of immunoglobulin G (IgG), IgM and IgA with broad speci-  
ficity for enteroviruses.  
J. Clin. Microbiol. **31**, 3240-3246 (1993)
- 92Bom J. Boman, B. Nilsson, P. Juto:  
Serum IgA, IgG and IgM responses to different enteroviruses as measured by a  
coxsackie B5-based indirect ELISA.  
J. Med. Virol. **38**, 32-35 (1992)
- 92Mui P. Muir:  
The Association of enteroviruses with chronic heart disease.  
Reviews in Med. Virol. **2**, 9-18 (1992)
- 92Sac L. Sachs:  
Angewandte Statistik.  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1992)
- 91Fri M. G. Friedmann, A. W. Eichler:  
The use of serum IgA as a diagnostic marker in viral infections.  
Immunology & Infectious diseases **I**, 223-234 (1991)
- 90Sam A. Samuelson, E. Skoog, M. Forsgren:  
Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA.  
Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. **4**, 395-406 (1990)
- 89Sch N. J. Schmidt, R. W. Emmons:  
Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections.  
Am. Pub. Health Ass. Inc., Washington, 513-569 (1989)
- 86McC R. A. McCartney, J. E. Banatvala, E. J. Bell:  
Routine use of  $\mu$  -antibody-capture ELISA for the serological diagnosis of cox-  
sackie B virus infections.  
J. Med. Virol. **19**, 205-212 (1986)
- 83Lau R. C. H. Lau:  
Coxsackie B virus infections in new zealand patients with cardiac and non car-  
diac diseases.  
J. Med. Virol. **11**, 131-137 (1983)
- 80Elh M. M. O. El-Hagrassy, J. E. Banatvala, D. J. Coltart:  
Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in patients with cardiac and other  
diseases.  
Lancet **2**, 1160-1162 (1980)

- 80Hor C. R. Hornig:  
Serologische Diagnostik akuter und chronischer Coxsackieviruserkrankungen,  
insbesondere des Herzens  
Dissertation, Gießen 1980
- 80Woo J. F. Woodruff:  
Viral myocarditis  
Am. J. Pathol. **101**, 427-478 (1980)
- 79Ban C. M. Bandt, N. A. Staley, G. R. Noren:  
Acute viral myocarditis: clinical and histologic changes.  
Minn. Med. **62**, 234-237 (1979)
- 78Gri N. R. Grist, E.J. Bell, F. Assand:  
Enteroviruses in human disease.  
Prog. Med. Virol. **24**, 114-157 (1978)
- 78Lur S. E. Luria, J. E. Darnell Jr., D. Baltimore, A. Campbell:  
General Virology  
3<sup>rd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons (1978)
- 74Lew D. Lewes, D. J. Rainford, W. F. Lane:  
Symptomless myocarditis and myalgia in viral and mycoplasma pneumoniae  
infections.  
Br. Heart J. **36**: 924-932 (1974)
- 74Sch H. Schmitz, C. M. Krainick-Riechert:  
Simple Detection of Fluorescent Stained IgM in Sucrose Gradients: Demon-  
stration of Virus-Specific IgM  
Intervirology 3: 353-358 (1974)
- 73Abe W. H. Abelman:  
Clinical aspects of viral cardiomyopathy.  
In: N. O. Fowler (ed): Myocardial diseases, New York, Grune and Stratton,  
253- 279 (1973)
- 73Gar A. J. S. Gardiner, D. Short:  
Four faces of acute myopericarditis.  
Br. Heart J. **35**, 433-442 (1973)
- 73Gea J. H. S. Gear, V. Measroch:  
Coxsackie virus infections of the newborn.  
Prog. Med. Virol. **15**, 42-62 (1973)
- 73Mel J. L. Melnick, V. Rennick, B. Hampil, N. J. Schmidt, H. H. Ho:  
Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and  
test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses.  
Bull. WHO **48**, 263-268 (1973)

- 73Sch N. J. Schmidt, R. L. Magoffin, E. H. Lennette:  
Association of group B coxsackieviruses with cases of pericarditis, myocarditis, or pleurodynia by demonstration of immunoglobulin M antibody.  
*Infect. Immunity* **Vol. 8 No. 3**, 341-348 (1973)
- 70Gat B. G. Gatmaitan, J. L. Chason, A. M. Lerner:  
Augmentation of the virulence of murine coxsackievirus B3 myocardial pathology by exercise.  
*J. Exp. Med.* **131**, 1121-1136 (1970)
- 70Ste P. J. Stevens, K. E. Underwood-Ground:  
Occurrence and significance of myocarditis in trauma.  
*Aerospace Med.* **47**, 776-780 (1970)
- 69Gri N. R. Grist, E. J. Bell:  
Coxsackie viruses and the heart.  
*Am. Heart J.* **77**, 295-300 (1969)
- 68Sai G. S. Sainani, E. Krompotic, S. J. Slodki:  
Adult heart disease due to the coxsackie virus B infection.  
*Medicine* **47**, 133-147 (1968)
- 68Sch N. J. Schmidt, E. H. Lennette, J. Dennis:  
Characterization of antibodies produced in natural and experimental coxsackievirus infections.  
*J. Immunol.* **100**, 99-106 (1968)
- 60Lim K. A. Lim, M. Benyesh-Melnick:  
Typing of viruses by combinations of antiserum pools: application to typing of enteroviruses (coxsackie and echo).  
*J. Immunol.* **84**, 309-317 (1960)
- 47Gor I. Gore, O. Saphir:  
Myocarditis: a classification of 1402 cases.  
*Am. Heart J.* **34**, 827-830 (1947)

## **7. Danksagung**

Hiermit möchte ich Herrn Dr. W. R. Willems und Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich für die Betreuung dieser Arbeit, ihre Unterstützung und sehr hilfreiche Kritik danken.

Ebenso möchte ich mich bei den Firmen invitro, Virofem und Virotech für die freundliche Unterstützung und Überlassung des Testmaterials bedanken, besonders bei deren Mitarbeitern Frau E. Schmitt-Hohmann und Herrn Dr. R. Hilfrich.

Viel Unterstützung erhielt ich auch von meiner Frau, Dr. B. Fröhlich.

Am Ende möchte ich mich noch recht herzlich bei den Mitarbeitern des diagnostischen Labors für ihre Hilfe und gute Zusammenarbeit bedanken.

**8. Lebenslauf****Angaben zur Person****Uwe Fröhlich, geb. Reinhard**

Geburtstag und –ort: 24.12.1970, Pforzheim  
 Nationalität: deutsch  
 Familienstand: verheiratet mit Birgit Susanne Fröhlich seit 24.04.1999  
 Kinder: Florian Reinhard Fröhlich, \* 25.02.2000  
 Tim Jonathan Fröhlich, \* 09.03.2002

**Schulbildung**

1977 - 1981 Grundschule, Neuhausen-Steinegg  
 1981 - 1987 Hilda-Gymnasium, Pforzheim  
 1987 - 1988 Tri-County Highschool, Plainfield, Wisconsin, USA  
 1988 - 1991 Hilda-Gymnasium, Pforzheim  
 11.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

**Zivildienst**

1991 - 1992 Seniorenwohnanlage Sonneneck, Osterburken

**Freiwilliges Soziales Jahr**

1992 - 1993 Städt. Krankenhaus Pforzheim

**Berufsausbildung**

4/ 1993 - 9/ 1995 Vorklinisches Studium, Justus-Liebig Universität Gießen  
 17.08.1995 Physikum  
 10/ 1995 - 9/ 1998 Klinisches Studium, Justus-Liebig Universität, Gießen  
 25.03.1997 1. Staatsexamen  
 17.09.1998 2. Staatsexamen  
 10/ 1998 Beginn des PJ in der Universitätsklinik, Würzburg  
 (Innere Medizin, Chirurgie, Anästhesie)  
 11/ 1999 Ende des Studiums  
 12/1999 bis 10/2000 AIP in der chirurgischen Abteilung der Main Klinik Ochsenfurt  
 11/2000 bis 5/2001 AIP in der internistischen Abteilung des KKH Kitzingen  
 6/2001 bis 6/2002 Assistenzarzt in der Internistischen Abteilung des KKH Kitzingen  
 7/2002 bis 1/2004 Assistenzarzt bei Dr. med. Brack, Allgemeinmediziner in Urspringen  
 2/2004 bis 8/2004 Assistenzarzt bei Dr. med. Schwab, Allgemeinmediziner in Elfershausen  
 9/2004 bis 5/2005 Assistenzarzt bei Praxis Dres. med. Faustmann/Mayer, Allgemeinmediziner  
 in Schweinfurt  
 6/2005 Facharztprüfung zum Facharzt für Allgemeinmedizin  
 Seit 10/2005 Niedergelassen in Gemeinschaftspraxis zusammen mit Ralf Fuhrmann in  
 Pforzheim

**Weitere Praktische Erfahrungen**

3/ 1996 Famulatur im Städt. Krankenhaus Pforzheim, Chirurgie  
 9/ 1996 Famulatur im Inst. für Virologie der JLU-Gießen  
 8/ 1997 Famulatur im Ev. Krankenhaus Gießen, Anästhesie  
 1997 2 wöchige Famulatur im Kinderkrankenhaus Hamm, Pädiatrie  
 3/ 1998 Famulatur in Universitätsklinik Würzburg, HNO

**Fortbildungen:**

Grund- und Aufbaukurs Sonographie an der Universitätsklinik Nürnberg  
 Grund- und Spezialkurs Strahlenschutz an der Universität Würzburg  
 Kompaktkurs Notfallmedizin Stufen A bis D  
 Akupunktur A-Diplom

## 9. Anhang

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Uwe Fröhlich