

**Vergleichende Untersuchungen zur Quantifizierung  
interstitieller myokardialer Leukozyten, T-Lymphozyten  
und Makrophagen in Fällen von Plötzlichem Kindstod**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Elke Sylvia Heinen geb. Oswald  
aus Berlin

2015

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Burkhard Madea
2. Gutachter: Prof. Dr. Vogel
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.09.2015

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Madea

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
2.1	Plötzlicher Kindstod - Sudden infant death syndrome - SIDS.....	8
2.1.1	Definition .....	8
2.1.2	Epidemiologie.....	10
2.1.3	Risikofaktoren.....	11
2.1.4	Ursachen .....	12
2.2	Myokarditis .....	15
2.2.1	Definition und Einteilung.....	15
2.2.2	Ursachen und Klinik.....	17
2.2.3	Diagnostik.....	19
2.3	Die Rolle von HLA und E-selectin in der Infektiologie .....	20
2.3.1	HLA .....	20
2.3.2	E-selectin.....	21
2.4	Problemstellung.....	23
2.5	Zielsetzung .....	25
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1	Material.....	26
3.1.1	Asservation und Fixation in Neutralformalin .....	26
3.1.2	SIDS-Kollektiv .....	28
3.1.3	Kontrollkollektiv .....	29
3.2	Methoden .....	29

3.2.1	Auswertung Immunhistochemie .....	29
3.2.2	Auswertung Hämatoxylin-Eosin-Schnitte.....	30
3.2.3	Immunhistochemische Färbungen .....	31
3.2.4	Konventionell-histologische Diagnostik (HE-Färbung) .....	39
3.2.5	Datenauswertung .....	39
3.2.6	Statistische Auswertung .....	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1	Allgemein.....	41
4.2	HE .....	43
4.3	Leukozytenantigen (LCA) .....	47
4.4	T-Lymphozyten (CD45-R0) .....	56
4.5	Makrophagen (CD68) .....	66
4.6	Humanes Leukozyten Antigen (HLA) .....	74
4.7	E-selectin.....	84
4.8	Vergleich der Auszählmethoden der vorliegenden Arbeit (Methode1) mit der von Grasmeyer (2014) (Methode2) .....	91
4.9	Darstellung einer möglichen physiologischen Infiltration von inflammatorischen Zellen.....	99
4.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	101
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>103</b>
5.1	Größe des SIDS-Kollektivs .....	103
5.2	Anzahl der ausgewerteten Myokardproben .....	104
5.3	Auszählmethodik .....	105
5.4	Vergleich mit der Auszählmethode von Grasmeyer (2014) .....	105
5.5	Diagnosestellung Myokarditis anhand der DALLAS-Kriterien und Immunhistochemie .....	106

5.6	Myokarditis beim plötzlichen Kindstod.....	109
5.7	Interpretation HLA und E-selectin.....	111
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
7.1	Anhang.....	114
7.2	Tabellenverzeichnis.....	120
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	122
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>142</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

AV-Blockierungen	Atrioventrikuläre Blockierungen
CD	Cluster of differentiation
CK	Creatininkinase
CK-MB	Creatinkinase vom Myokardtyp
CMV	Cytomegalievirus
EKG	Elektrokardiogramm
ELAM-1	Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1
EMB	Endomyokardbiopsie
Fa.	Firma
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1
GMP-140	Granule membrane protein 140
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHV 6	Humanes Herpes Virus 6
HPF	High power field
HSV	Herpes Simplex Virus
HZV	Herpes Zoster Virus
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
LAM-1	leukocyte adhesion molecule 1
LAMPs	Lysosomal-associated membrane proteins
LCA	Leucocyte common antigen
LEC-CAMS	Leucocyte endothelial cell-cell adhesion molecules
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen 1

N	Nummer, Anzahl
PCR	Polymerase chain reaction
PES	Probeentnahmestelle
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
Standardabw.	Standardabweichung
SUDI	Sudden unexpected death in infancy
VZV	Varizella Zoster Virus
WHO	World Health Organisation

## **2. Einleitung**

### **2.1 Plötzlicher Kindstod - Sudden infant death syndrome - SIDS**

#### **2.1.1 Definition**

Der plötzliche Kindstod wurde 1969 anlässlich der Second International Conference on Causes of Sudden Death in Infants in Seattle als ein „plötzlicher Tod eines Säuglings oder Kleinkindes, welcher in Bezug auf die Vorgeschichte unerwartet ist und bei dem eine gründliche Obduktion keinen hinreichenden Hinweis für die Todesursache liefert“, definiert (Beckwith, 2003). Diese Definition wurde absichtlich so allgemein gefasst und auch in den darauffolgenden Jahren bis zum Jahr 1989 nicht angepasst, obwohl bereits viele Studien zu diesem Thema durchgeführt wurden (Krous et al., 2004). 1989 stellte das National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) erneut ein Gremium aus Pathologen, Klinikern und Forschern zusammen, um die Definition zu verfeinern und insbesondere die Berichterstattung von Forschungsergebnissen zu verbessern (Beckwith, 2003). Diese definierten den plötzlichen Kindstod als „einen plötzlichen Tod eines Säuglings, welches jünger als ein Jahr ist und der trotz gründlicher Untersuchung des Falles, inklusive des Fundortes, einer kompletten Obduktion sowie der Vorgeschichte, ungeklärt bleibt“ (Beckwith, 2003).

Im Jahr 1992 wurde durch eine Arbeitsgruppe, bestehend aus J.B. Beckwith und weiteren Experten, eine strengere Definition mit Unterteilung der Fälle in 2 Gruppen, „typisch“ und „atypisch“ entwickelt. Beckwith schlug dabei jedoch eine weniger bewertende Formulierung vor und bezeichnete sie als Kategorie I und II. Zusätzlich wurde noch eine dritte Kategorie eingeführt, die ausschließlich für Entwicklungsländer, religiöse Gruppen oder wirtschaftliche Lagen, in denen eine Obduktion nicht durchgeführt werden kann, gedacht ist. Sie dient der Erhebung statistischer Daten für diese Situationen und soll auf Fälle angewendet werden, auf die die allgemeinen Kriterien für SIDS zu treffen, eine Obduktion jedoch nicht durchgeführt wurde. Sie sollte jedoch in den meisten entwickelten Gesellschaften nicht als eine Alternative zur Obduktion akzeptiert werden. In den folgenden Jahren wurde diese Definition verfeinert und schließlich auf einem Kongress in San Diego 2004 die folgende allgemeine Definition festgelegt (Krous et al., 2004):



„SIDS ist definiert als der plötzliche und unerwartete Tod eines Säuglings jünger als ein Jahr, der während des Schlafes eintritt und nach gründlicher Untersuchung des Falles, einschließlich einer vollständigen Obduktion, Untersuchung der Todesumstände und der Vorgeschichte, ungeklärt bleibt.“

Die bereits von Beckwith vorgeschlagene Kategorisierung wurde wie folgt umgesetzt:

**Kategorie Ia:** o.g. Definition und zusätzlich folgende Kriterien

- Alter zwischen 3 Wochen und 9 Monaten;
- unauffällige klinische Vorgeschichte einschließlich Schwangerschaftsdauer (Gestationsalter  $\geq$  37. Schwangerschaftswoche);
- normales Wachstum und Entwicklung;
- keine ähnlichen Todesumstände bei Zwillingen, nahen Verwandten oder anderen Säuglingen aus der Obhut des/der selben Pflegers/Pflegerin;
- Fundort hinreichend auf Begebenheiten hin untersucht, die einen Tod begünstigen oder bedingen, aber, falls vorhanden, keine Erklärung für den Tod liefern;
- Schlafumgebung unauffällig, insbesondere keine Hinweise für einen versehentlichen Tod;
- in der Autopsie keine potentiell todesursächlichen Pathologien; geringe entzündliche Infiltrate im Respirationstrakt, aber akzeptabel; intrathorakale petechiale Einblutungen als unterstützende aber nicht obligatorische Befunde;
- keine Hinweise für ungeklärten leichten oder schweren Stress von Thymus, Nieren und anderen Organen oder Geweben;
- vollständige toxikologische oder mikrobiologische, metabolische, radiologische Untersuchungen inklusive Glaskörperflüssigkeit ohne pathologische Befunde.

**Kategorie Ib:** wie Kategorie Ia, aber

- unvollständige Dokumentation, insbesondere des Fundortes;
- und / oder fehlende Untersuchung einer der folgenden Analysen: Toxikologie, Mikrobiologie, Radiologie, Untersuchung der Glaskörperflüssigkeit oder metabolische Untersuchungen.

**Kategorie II:** erfüllt Kategorie I, aber mindestens eines der folgenden Kriterien fehlt

- außerhalb der Altersspanne der Kategorie I (3 Wochen bis neun Monate) bis zum ersten Geburtstag;
- ähnliche Todesfälle bei Zwillingen, nahen Verwandten oder anderen Säuglingen aus der Obhut des/der selben Pflegers/Pflegerin, die keinen Verdacht einer Kindstötung oder angeborene Fehlbildungen hegen;
- Zustände aus der Neonatal- oder Perinatalperiode waren bis zum Todeszeitpunkt behoben;
- mechanische Asphyxie oder Ersticken verursacht durch Bedeckung ist nicht mit Sicherheit festzustellen;
- unnatürliches Wachstum oder andere Auffälligkeiten haben nicht zum Tod beigetragen;
- deutliche entzündliche Veränderungen oder andere Auffälligkeiten sind keine eindeutige Todesursache.

**Nicht klassifizierter plötzlicher Kindstod:** Erfüllen weder Kategorie I noch II, aber

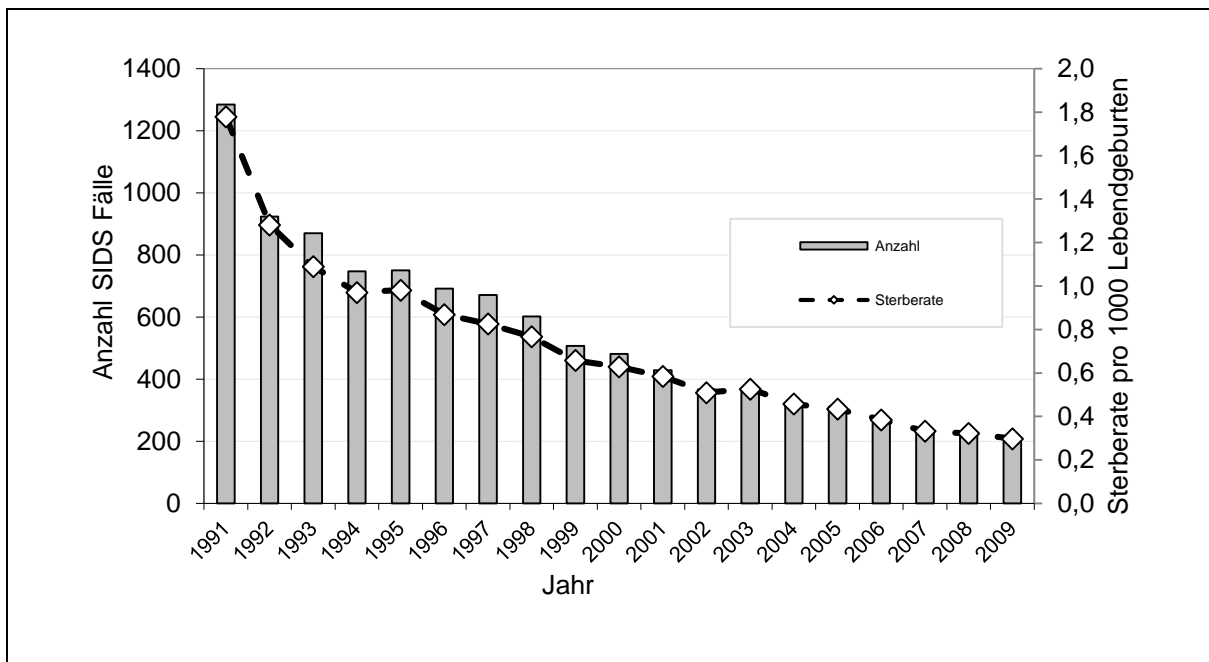
- alternative Ursachen für einen natürlichen oder unnatürlichen Todesumstand können nicht eindeutig gefunden werden, einschließlich Fälle bei denen keine Obduktion erfolgte;
- auch Säuglinge, die in einer entsprechenden Situation aufgefunden und reanimiert werden, jedoch später versterben, sollten bei Erfüllen der o.g. Kriterien in eine der Kategorien zugeordnet werden (near missed SIDS).

### 2.1.2 Epidemiologie

Seit der Erforschung des Plötzlichen Kindstod gibt es folgende übereinstimmende epidemiologischen Daten:

- Dank der Aufklärungskampagnen über die Risikofaktoren lässt sich insgesamt ein Rückgang der Inzidenz verzeichnen (Wennergern et al., 1997) (Abb. 1).
- Die Säuglinge versterben vor allem in den feuchten und kalten Herbst- und Wintermonaten (Bajanowski und Kleemann, 2002; Carpenter und Gardner, 1982; Douglas et al., 1996, 1998; Hoffmann, 1988; Guntheroth et al., 1992; Rintahaka und Hirvonen, 1986; Scheers et al., 1998).

- Es gibt einen Sterblichkeitsgipfel zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat (Bajanowski und Kleemann 2002; Goldberg et al., 1986; Mitchell et al., 1999; Hoffmann et al., 1988; Rintahaka und Hirvonen, 1986).
- Es sind häufiger männliche Säuglinge betroffen als weibliche (Bajanowski und Kleemann 2002; Mitchell et al., 1999; Rintahaka und Hirvonen, 1986).



**Abb. 1:** Statistisches Bundesamt: Inzidenz des Plötzlichen Kindstodes von 1991-2009 und Anteil an Lebendgeburten

### 2.1.3 Risikofaktoren

Durch zahlreiche Studien konnten in den vergangenen Jahrzehnten Risikofaktoren herausgearbeitet werden, die unter anderem zu der „Back to sleep campaign“ Anfang der 90er Jahre führten. Hierzu zählen:

- Nikotinabusus während der Schwangerschaft sowie nach der Geburt im Umfeld des Säuglings (Malloy et al., 1988; Blair et al., 1996; Bulterys et al., 1990; Haglund et al., 1990; Mitchell et al., 1995; Raza et al., 1999; Schoendorf und Kiely, 1992; Schlaud et al., 1996; Wisborg et al., 2000),
- Lagerung des Kindes auf dem Bauch (Dwyer et al., 1995; Mitchell et al., 1999a, 1999b; Hauck et al., 2003; De Jonge et al., 1989, 1993; Haglund et al., 1990),

- Stillverzicht (Vennemann et al., 2009; Hauck et al., 2003; Ford et al., 1993; Zotter et al., 2002)
- geringes Geburtsgewicht sowie Frühgeburtlichkeit (Byard und Krous, 2003; Hoffmann et al., 1988; Hauck et al., 1988; Steele et al., 1966),
- Säuglinge jüngerer Mütter häufiger betroffen (Peterson et al., 1982; Rintahaka und Hirvonen, 1986).

Das sogenannte „bed sharing“ wird in vielen Studien ebenfalls als ein Risikofaktor für SIDS diskutiert. Es zeigten sich jedoch Co-Abhängigkeiten mit anderen Risikofaktoren (Nikotinabusus, ethnische Zugehörigkeit, Stillverzicht etc.), sodass dies für sich allein genommen die Wahrscheinlichkeit für SIDS nicht erhöht. Allgemein wird jedoch davon abgeraten, dass der Säugling in den ersten Lebensmonaten mit den Eltern im selben Bett schläft (Scragg et al., 1993, 1998; Fleming et al., 1996; Jorsch et al., 2003; Mitchell, 1997; Hauck et al., 2003; Jorch et al., 2003; Oyen et al., 1997; Tappin et al., 2005; Steele et al., 1966). Ein signifikant erhöhtes Risiko für ein versehentliches Bedecken des Kindes, v. a. des Gesichtes, beim „bed sharing“ konnte nicht nachgewiesen werden (Mitchell et al., 2008; Wilson et al., 1994).

#### **2.1.4 Ursachen**

In der Literatur finden sich zahlreiche Theorien bezüglich der Ursache für den plötzlichen Kindstod. Über die Bestimmung von Gemeinsamkeiten, die die Fälle bezüglich Todesumstände, Anamnese etc. aufwiesen, kristallisierten sich mit der Zeit die oben genannten Risikofaktoren heraus. Des Weiteren zeigten sich Übereinstimmungen in den körperlichen Zuständen der betroffenen Säuglinge zum Todeszeitpunkt (z. B. schweißnasse Haut und Kopfhaare, Infekt oder stattgehabter Infekt), wodurch die Hypothese einer infektiologischen Pathogenese als Ursache gekräftigt wird (Madea, 2009; Bajanowski et al., 2002; Dettmeyer, 2004a). Insbesondere eine virusbedingte, subklinisch verlaufende Myokarditis wird als Ursache in diesem Zusammenhang diskutiert (Madea, 2009; Madea und Drexler, 2012; Forcada et al., 1996). So konnten Klingel et al. (2000) anhand von Enteroviren zeigen, dass post infectionem bereits eine Schädigung der Myozyten aufgetreten ist, bevor sich Entzündungszellen nachweisen lassen.

Häufig wurden die Säuglinge mit Bedeckung des Gesichtes aufgefunden, sodass eine Hypoxämie durch versehentliches Ersticken ebenfalls als Todesursache in Erwägung gezogen wurde (Bajanowski et al., 2002; Sheers et al., 1998). Insbesondere ab den 70er Jahren wurde die Apnoe Theorie verfolgt und führte dazu, dass die Säuglinge ein Monitoring erhielten um abnormale Atemmuster zu identifizieren (Bajanowski et al., 2007). Untersuchungen hierzu gab es durch Rognum et al. (1988), die signifikant erhöhte Hypoxanthin-Level in Glaskörperflüssigkeit von SIDS-Fällen nachwiesen und daher vermuteten, dass SIDS kein plötzliches Ereignis sei, sondern diesem eine längere Periode von Atemstörungen und Hypoxie vorausgeht. Diese Hypothese erwies sich allerdings als haltlos (Madea et al., 1994). Nelson et al. (1989) postulierten, dass Hyperthermie, u.a. durch Bettwäsche, Raumtemperatur und Schlafkleidung bedingt, bei einem Teil der als SIDS-klassifizierten Fälle, todesursächlich ist. Gilbert et al. (1992) postulierten in ihrer Studie, dass das Zusammenspiel aus dicker, fester Schlafkleidung und Bauchlage sowie aus viraler Infektion und dicker Schlafkleidung mit einem erhöhten Risiko für SIDS einhergeht. Auch Kleemann et al. (1996) fanden in ihren Untersuchungen einen signifikanten Zusammenhang zwischen schweißnassem Kopf, nasser Kleidung und Bettwäsche als Zeichen von Hyperthermie und einem erhöhten Risiko für den plötzlichen Kindstod.

1972 formulierte Wedgewood die sogenannte „triple risk hypothesis“. Sie nimmt das Zusammenspiel von „generellen Faktoren, die die Wahrscheinlichkeit eines Todes egal welcher Ursache erhöhen (z. B. Geschlecht, Rasse, Armut, Frühgeburt, etc.), altersspezifische Risiken, die mit dem Entwicklungsstand des Säuglings zusammenhängen und auslösende Faktoren (wie z. B. Schlafposition, Infektion, etc.) an“ (Guntheroth et al., 2002). In Anlehnung daran formulierten Filiano und Kinney (1994) die bekannteste „triple risk hypothesis“. Demnach liegt dem Tod eines Säuglings SIDS zu Grunde, wenn „er oder sie sich erstens in einer vulnerablen Phase befindet, zweitens eine kritische Entwicklungsperiode in der Hämostaseregulierung vorliegt und drittens exogene Stressoren auftreten“ (Filiano und Kinney, 1994). Hier wird der Tod des Säuglings somit ähnlich wie bei Rognum et al. (2003) nicht als unerwartet, im Vergleich zur Definition nach Krous et al. (2004), bewertet (Guntheroth et al., 2002).

In anderen Untersuchungen wird betont, dass sich das Immunsystem in den ersten Monaten nach der Geburt in einer „vulnerablen“ Phase befindet und somit anfälliger für äußere Einwirkungen ist (Vege et al., 2004).

## 2.2 Myokarditis

### 2.2.1 Definition und Einteilung

Die Myokarditis wurde im Jahr 2012 in der Bundesrepublik Deutschland laut statistischem Bundesamt insgesamt 219 mal als Todesursache mit den ICD-Nummern I40.0, I40.1, I40.8, I40.9, I51.4, I01.0 und I09.0 angegeben (Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland 2012, Statistisches Bundesamt). Betrachtet man die Daten der Gesundheitsberichterstattung des Bundes von 2012, so wurde die Diagnose Myokarditis insgesamt 5383 mal kodiert. Im Vergleich dazu wurde die arterielle Hypertonie (ICD 10 I10.+ - I15.+) im Jahr 2012 insgesamt 288.305 mal kodiert. Gemessen daran ist die Myokarditis ein seltenes Erkrankungsbild. Allerdings ist sie die häufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz bei Menschen jünger als 40 Jahren (Pankuweit und Maisch, 2010; Kitulwate et al., 2010).

**Tab. 1:** Als Myokarditis verschlüsselte Anzahl Todesfälle 2012 in Deutschland

ICD10	Fälle
I01.2 Akute rheumatische Myokarditis	10
I09.0 Rheumatische Myokarditis	5
I40 Akute Myokarditis	3797
I40.0 Infektiöse Myokarditis	966
I40.1 Isolierte Myokarditis	204
I40. Sonstige akute Myokarditis	1457
I40.9 Akute Myokarditis, nicht näher bezeichnet	1170
I41 Myokarditis bei anderenorts klassifizierten Krankheiten	-
I41.0 Myokarditis bei anderenorts klassifizierten bakteriellen Krankheiten	-
I41.1 Myokarditis bei anderenorts klassifizierten Viruskrankheiten	-
I41.2 Myokarditis bei sonstigen anderenorts klassifizierten infektiösen und parasitären Krankheiten	-
I41.8 Myokarditis bei sonstigen anderenorts klassifizierten Krankheiten	-
I51.4 Myokarditis, nicht näher bezeichnet	1586

Nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 1995 gehört die Myokarditis zu den spezifischen Herzmuskelerkrankungen und ist definiert als eine Schädigung der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), welche mit einer variablen Infiltration des interstitiellen

sowie perivaskulären Bindegewebes mit Entzündungszellen einhergeht. In unterschiedlichem Maße können auch die intramuralen arteriellen und venösen Gefäße sowie die Kapillaren und selten auch die epikardialen Koronargefäße betroffen sein (Strauer et al., 2001; Kandolf et al., 2011).

Die Diagnose einer Myokarditis wird histologisch anhand der von Aretz et al. (1986) in den sogenannten DALLAS-Kriterien zusammengefassten Definitionen und Klassifikation gestellt. Sie ist definiert als eine „entzündliche Infiltration des Myokards mit Nekrose und/oder Degeneration von angrenzenden Myozyten, welche untypisch für eine ischämische Schädigung, hervorgerufen durch eine koronare Herzerkrankung, ist“ (Aretz et al., 1986). Das entzündliche Infiltrat besteht aus einer variablen Anzahl von Leukozyten, Eosinophilen, Neutrophilen, Makrophagen und Granulozyten und gibt Hinweise auf die Ursache. Es tritt zumeist fokal, seltener diffus im Myokard auf. Eine Quantifizierung der Zellen wurde damals nicht empfohlen, wobei Studien bereits eine Infiltration des Myokards mit bis zu fünf Lymphozyten pro high power field als normal ansahen (Edwards et al., 1982; Foley und Edwards, 1988).

Im Jahr 2000 kamen erneut Experten, die führend auf den Gebieten der Histopathologie und Virologie waren, in Marburg zusammen, um eine modifizierte Klassifikation der DALLAS-Kriterien zu erstellen. Maisch et al. (2000) fasste dies wie folgt zusammen:

In der ersten Biopsie erfolgt die Unterteilung in

- akute Myokarditis: Nekrose sowie diffuses, fokales oder konfluierendes Infiltrat mit  $\geq 14$  Lymphozyten/mm<sup>2</sup> (T-Lymphozyten und aktivierte T-Lymphozyten, inkl. bis zu vier Makrophagen), evtl. Fibrose,
- chronische Myokarditis: keine Nekrose aber entzündliches Infiltrat (s. o.) mit  $\geq 14$  Lymphozyten/mm<sup>2</sup>, evtl. Fibrose,
- keine Myokarditis: keine oder weniger als 14 Lymphozyten/mm<sup>2</sup>.

In der zweiten Biopsie erfolgt die Unterteilung in

- persistierende Myokarditis: Kriterien wie akute oder chronische Myokarditis,
- abheilende Myokarditis: akute Kriterien passend zu einer akuten oder chronischen Myokarditis, immunhistochemische Befunde spärlich,
- abgeheilte Myokarditis: keine inflammatorischen Infiltrate mehr nachweisbar.



### 2.2.2 Ursachen und Klinik

Als Ursachen finden sich Viren, hierunter klassischer Weise Enteroviren (Coxsackie A und B, Echoviren) und Adenoviren. Jedoch zeigte sich in den jüngeren Jahren eine Zunahme von EBV, CMV, HHV 6 sowie Parvovirus B19 (Pankuweit und Maisch, 2010; Mahrholdt et al., 2006; Kühl et al., 2005a; 2005b) als kardiotrope Viren. Coxsackieviren werden bei Kindern und Jugendlichen als häufigste Verursacher angesehen (Bowles et al., 1986; Dettmeyer et al., 2002; Burch et al., 1968; Kühl et al., 2005b; Esfandiarei et al., 2008; Kim et al., 2001; Woodruff, 1980). Zu den weiteren viralen Erregern zählen Influenzaviren (Fairley et al., 1996; Williams et al., 1984), Mumpsviren, HSV, VZV, HZV, Röteln und RSV. Bei den seltenen bakteriellen Verursachern finden sich Borrelien, Mykoplasmen, Streptokokken, Staphylokokken, Chlamydien sowie Tuberkulose. Ebenfalls sehr selten kommen in Europa Parasiten und Würmer, wie *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma cruzi*, sowie Pilze und Hefen in Frage (Pankuweit und Maisch, 2010; Kandolf, 2011).

Neben den infektiösen Myokarditiden gibt es auch autoimmunologische Myokarditiden, die entweder unmittelbar als Folge einer viralen oder bakteriellen Infektion oder nach einer gewissen Latenzzeit entstanden sind. Des Weiteren können sie im Zusammenhang mit Vaskulitiden und Kollagenosen wie z. B. systemischer Lupus erythematoses oder Sarkoidose auftreten (Pankuweit und Maisch, 2010; Kandolf, 2011). Auch Medikamente wie Zytostatika und Anthrazykline sowie Röntgenstrahlen können als Nebenwirkung eine Myokarditis hervorrufen.

In Europa sowie Nordamerika ist die virale Myokarditis die häufigste entzündliche Erkrankung des Herzmuskels im Kindesalter (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.: S2k Leitlinie pädiatrische Kardiologie: Myokarditis, 2012). Die rheumatische Myokarditis hervorgerufen durch eine Infektion mit  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken ist hingegen rückläufig (Kandolf, 2011). Die virale Myokarditis verläuft nach dem aktuellen Wissenstand in 3 Phasen (Kindermann et al., 2012):

### 1. Akutphase:

Rezeptorvermitteltes Eindringen des Virus in die Myozyten, als Folge Myozytennekrose und Apoptose mit Präsentation von intrazellulären Antigenen und Aktivierung des Immunsystems.

### 2. subakute Phase:

Immunantwort mit Invasion von natürlichen Killerzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten, als Folge Myozytenzerfall durch selektive Elimination der virusbefallenen Myozyten durch virusspezifische T-Zellen.

### 3. Ausheilungsphase:

Remodelling und Ausbildung einer Fibrose, bei anhaltender Entzündung durch Viruspersistenz kommt es zur Ausbildung einer dilatativen Cardiomyopathie.

Nicht selten verläuft die Myokarditis subklinisch und bleibt unerkannt. Die akute Myokarditis hat bei erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion eine gute Prognose und heilt folgenlos aus. Besteht bereits eine Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion, so haben auch diese Patienten auf lange Sicht eine gute Prognose, wenn frühzeitig mit einer aggressiven medikamentösen Therapie oder Organersatzverfahren begonnen wird (Kindermann et al., 2012; Kitulwatte et al., 2010).

Das Outcome der Kinder ist nicht schlechter als das der Erwachsenen, wobei sie häufiger ein fulminantes Erscheinungsbild aufweisen (Cooper, 2009).

Die Symptomatik variiert wie bereits angedeutet von asymptomatisch über mild bis hin zu fulminanten Verläufen. Zu den Symptomen gehören Beschwerden, die im Zusammenhang mit einem Infekt auftreten (Müdigkeit, Schwächegefühl, Palpitationen). Insbesondere Neugeborene und Säuglinge zeigen Trinkschwäche, Apathie und/oder Fieber oder sie fallen mit Zyanosen, Apnoen und vermehrtem Schwitzen auf. Ebenso zeigen die Betroffenen Tachykardien und Herzrhythmusstörungen bis zu Zeichen einer Herzinsuffizienz (Herold, 2012; Kitulwatte et al., 2010; Chimenti et al., 2004; Cooper, 2009; Heusch et al., 1996; Klein et al., 2000). Bei Kindern wird davon ausgegangen, dass je jünger das Kind ist, desto wahrscheinlicher handelt es sich um eine intrauterine

Myokarditis, die sich postnatal als chronische Erkrankung manifestiert. Hier ist vor allem CMV oder Parvovirus B19 als auslösendes Agens zu nennen. Ältere Kinder und Jugendliche klagen häufig über unspezifische respiratorische, gastrointestinale und/oder thorakale Beschwerden, sowie präkordiale Stiche. Meist geht den Symptomen ein Infekt voraus. Ebenfalls können neu aufgetretene Herzrhythmusstörungen und AV-Blokkierungen Hinweise auf eine Myokarditis sein (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.: S2k Leitlinie pädiatrische Kardiologie: Myokarditis, 2012).

### **2.2.3 Diagnostik**

Die Diagnose einer Myokarditis im Kindes- und Erwachsenenalter ist unter Umständen schwierig zu stellen. Zu den diagnostischen Nachweisverfahren zählen die Echokardiographie, die Zeichen von nur segmentalen Wandkinetikstörungen bis hin zu einer systolischen und/oder diastolischen Dysfunktion mit oder ohne Dilatation des linken Ventrikels und erhaltener oder bereits reduzierter Ejektionsfraktion zeigt. Im EKG können eine Tachykardie, ventrikuläre Extrasystolen, Veränderungen der Herzachse sowie Repolarisationsstörungen und Infarktzeichen nachgewiesen werden. Insgesamt ist das EKG wenig spezifisch und sensitiv (Cooper, 2009). Im Röntgen-Thorax können Zeichen der Herzinsuffizienz mit Herzvergrößerung und Zeichen vermehrter Lungenstauung vorkommen. Die Serumanalyse kann eine Erhöhung der CK/CK-MB sowie des Troponins zeigen. Bei neu aufgetretenen schweren Herzrhythmusstörungen, einer erst seit weniger als zwei Wochen bestehenden Herzinsuffizienz mit oder ohne Ventrikeldilatation und hämodynamischer Auswirkung sowie bei Verdacht auf eine fulminante Myokarditis wird die Entnahme von Endomyokardbiopsien empfohlen (Cooper et al., 2007; Ali et al., 1973). Sie dient zum einen mittels der konventionellen histologischen Untersuchung gemäß den DALLAS-Kriterien der Diagnosesicherung, zum anderen kann durch sie mit Hilfe von In-Situ-Hybridisierung und Polymeraseketten-Reaktion eine Erregerdiagnostik erfolgen (Cunningham et al., 2006). In den vergangenen Jahren hat sich die Immunhistochemie als zusätzliches Verfahren zum Nachweis eines relevanten inflammatorischen Prozesses etabliert. Es stehen verschiedene monoklonale Antikörper zur Verfügung, wobei insbesondere der Nachweis von aktivierten T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Makrophagen sowie einer gesteigerten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (HLA II

DR  $\alpha$ -Kette) auf der Endotheloberfläche, auf antigenpräsentierenden Makrophagen und dendritischen Zellen auf eine Myokarditis schließen lassen (Kandolf, 2011).

## **2.3 Die Rolle von HLA und E-selectin in der Infektiologie**

### **2.3.1 HLA**

HLA steht für „Humane Leukozyten Antigen“, weil es zuerst auf den Leukozyten entdeckt wurde. Sein Genort ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert und wird als „major histocompatibility complex“ (Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Peptidrezeptoren, von denen es zwei Klassen gibt. MHC-Klasse-I-Rezeptoren befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und dienen vor allem der Präsentation von Peptiden mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren gegenüber CD8+ zytotoxischen T-Zellen, die aus intrazellulär abgebauten Proteinen oder viralen Strukturen stammen. Zu ihnen gehören HLA-A, -B, -C. MHC-Klasse-II-Rezeptoren hingegen befinden sich auf Zellen des Immunsystems, vornehmlich Makrophagen, B-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen, und präsentieren den CD4+-T-Zellen Antigene aus extrazellulär, durch Phagozytose oder Pinozytose, aufgenommenen Proteinen. Diese können sowohl körpereigen sein als auch von Viren, Bakterien oder Medikamenten stammen. Hierzu zählen HLA-DR, -DP, -DQ. Diese Aktivierungskaskade, abhängig davon, ob ein Protein endogen oder exogen aufgenommen wurde und somit CD4+-oder CD8+-T-Zellen aktiviert werden, ist nicht immer eindimensional ausgerichtet. Die dendritischen Zellen können über die sogenannte „Cross-Präsentation“ auch exogen aufgenommene Proteine über die Endosomen an MHC-Klasse I präsentieren und CD4+-T-Zellen aktivieren. Umgekehrt können auch endogene Proteine CD8+-T-Zellen aktivieren (Siegenthaler und Blum, 2006).

Es besteht ein großer Polymorphismus der MHC-Moleküle auf dem Chromosom 6 und es wurden bisher mehr als 220 Allele bestimmt. Der Nachweis einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen lässt auf eine erhöhte Aktivität von Entzündungszellen schließen (Strauer et al., 2001; Noutsias et al., 1999). Abhängig von der Größe der Proteine werden unterschiedlich viele Peptide generiert, von denen nur wenige eine

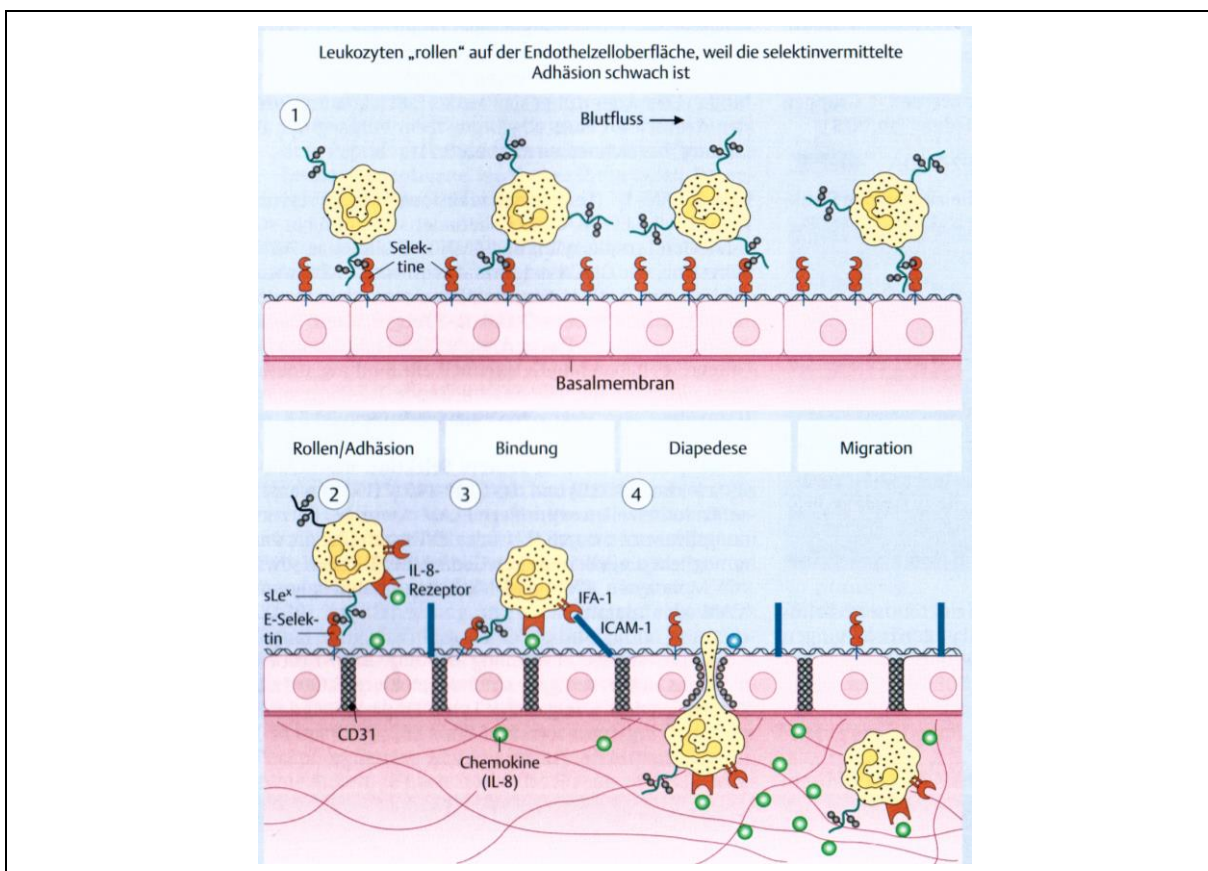
Affinität zu den vorhandenen HLA-Molekülen aufweisen und als sogenannte immun-dominante Peptide bezeichnet werden (Siegenthaler und Blum, 2006). Nur sie führen auch zu einer Immunantwort. So kommt es z. B. durch Bindung von Haptenen, wie Medikamente oder Metallionen, zu einer Veränderung des ursprünglichen Proteins und die Proteasen schneiden an anderer Stelle, sodass andere Peptide entstehen. Handelt es sich dabei um ein auf diese Weise verändertes autologes Protein, besteht gegenüber dem nun präsentierten Antigen keine Toleranz, sodass das Immunsystem es nicht mehr als eigen erkennt. Dies ist ein Erklärungsmechanismus, weshalb Medikamente eine Autoreaktivität auslösen können (Siegenthaler und Blum, 2006). Eine weitere wichtige Rolle spielt HLA bei reaktiven Immunprozessen in Folge von Kreuzreaktionen. Ein exogen aufgenommenes Protein wird prozessiert und über ein entsprechendes MHC-Klasse-II-Molekül einer CD4+-T-Zelle präsentiert, die wiederum einen antiinfektiösen Immunprozess auslöst. Weist nun ein autologes Protein in einem Abschnitt eine sehr hohe Ähnlichkeit mit einem prozessierten exogenen Peptid auf, kommt es auch hier zur einer Immunantwort, jedoch fälschlicherweise gegen sich selbst (Siegenthaler und Blum, 2006).

### **2.3.2 E-selectin**

Die Selectine, auch als „leucocyte endothelial cell-cell adhesion molecules (LEC-CAMS) bezeichnet, gehören zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und befinden sich auf der Oberfläche von Gewebszellen. Sie interagieren mit der extrazellulären Matrix und anderen Zellen und ermöglichen somit deren Migration und/oder Zelladhärenz z. B. für Leukozyten, Blutplättchen oder dendritische Zellen. Sie befinden sich auf Blutzellen und ihre komplementären Liganden sind auf Endothelzellen, Antigen präsentierenden Zellen oder im Gewebe lokalisiert. Einige von ihnen sind zell- oder gewebespezifisch, sodass über sie selektiv Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden können.

Biochemisch sind Selectine transmembranale Glykoproteine mit einer charakteristischen lectinartigen Struktur. Je nach Ort des Vorkommens werden L(Leukozyten)-Selectine, E(Endothelzellen)-Selectine und P(Thrombozyten, platelets)-Selectine unterschieden. Sie binden sialinsäurehaltige Oligosaccharide wie Lewis-X-Antigen (s-Lex) auf Leukozyten, CD34-Protein und GlyCAM-1. Dadurch erfolgt die Bindung von Leukozyten an die Endothelzellen. Vertreter der E-selectine sind ELAM-1 und GMP-140, wobei

ELAM-1 bei Entzündungsprozessen eine große Rolle spielt. Es wird durch TNF- $\alpha$  und IL-1 vermehrt exprimiert und ermöglicht die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen, wodurch das sogenannte „rolling“ dieser entlang der Endothelzellen initiiert wird (Abb. 2). Dabei findet eine wechselseitige Interaktion der Leukozytenselectine (CD62-L, LAM-1) mit den Endothelglykoproteinen (Gly-CAM-1) bzw. der Endothelselectine (CD62 E) mit den Leukozytenglykoproteinen (s-Lex) statt. Die Endothelzellen bilden daraufhin Chemokine und proinflammatorische Zytokine, die an ihnen haften bleiben und somit über Chemokin- bzw. Zytokinrezeptoren auf Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten diese an die Endothelzellen binden. Danach exprimieren die Blutzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle, sodass es, z. B. über das Integrin LFA-1, zu einer festen Bindung der Leukozyten mit der Gefäßwand kommt. Hiernach erfolgt die Diapedese der Leukozyten mittels Interaktion von Integrinen mit Fibronectin im Bindegewebe oder Laminin in der Gefäßmembran (Siegenthaler und Blum, 2006).



**Abb. 2:** Leukozytenrolling (aus Siegenthaler und Blum, 2006 nach Butcher und Picker, 1996)

Eine erhöhte E-selectin-Expression findet man bei Schädigung des Endothels und akuter Inflammation, wie sie bei einer Myokarditis vorkommt (Devaux, 1997; Noutsious et al., 1999).

## 2.4 Problemstellung

In der klinischen Myokarditisdiagnostik an Endomyokardbiopsien wird in bestehender Literatur bislang empfohlen, eine immunhistochemische Quantifizierung anhand von Leukozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen mittels Auszählung von 20 repräsentativen Gesichtsfeldern in starker Vergrößerung (meistens HPF) mit anschließender Mittelwertbildung durchzuführen. Bei dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Material handelt es sich um autoptisch gewonnenes Myokardgewebe und die Repräsentanz der Gesichtsfelder setzt deren zufällige Auswahl voraus. In der Regel liegen 8-10 Probeentnahmestellen pro Säuglingsherz vor. In einer früheren deutschen Studie wurden 20 Gesichtsfelder pro Säuglingsherz untersucht und somit lediglich 2,5 Gesichtsfelder in 400 facher Vergrößerung pro PES ausgewertet. Auf die tatsächlich ausgewertete Fläche bezogen bedeutet dies, dass bei einer durchschnittlichen Myokardprobengröße von ca. 100 mm<sup>2</sup> insgesamt nur etwa 0,59 mm<sup>2</sup> also ca. 0,6 % der Myokardfläche ausgewertet werden. Dies erscheint zu wenig, um eine repräsentative Aussage bezüglich einer Myokarditis zu treffen, insbesondere da sich der sogenannte „sampling error“ stark auswirkt (Aretz et. al., 1987a). Dieser ist dem häufig fokalen Verteilungsmuster einer Myokarditis geschuldet und verringert die Wahrscheinlichkeit in den Biopsien den Entzündungsherd zu finden und somit die Diagnose einer Myokarditis zu stellen (Strauer et al., 2001). In diesem Zusammenhang wird überlegt, ob sich durch eine genauere Auswertung der Myokardproben die Inzidenz der Myokarditis bei SIDS ändert.

Neben der in der Literatur größtenteils angewendeten Auszählung der Myokardproben in HPFs (400fache Vergrößerung), erfolgt seit jüngerer Zeit die Auszählung anhand eines 1 mm<sup>2</sup> großen Quadrates in 100facher Vergrößerung. Somit ist die Fläche als eine internationale Einheit definiert und nicht als ein Maß, wie es das HPF darstellt, welches Hersteller bedingt unterschiedlich ausfallen kann. Es stellt sich nun die Frage, welche Vor- und Nachteile beide Zählverfahren bieten.

Bislang ist der Nachweis einer Myokarditis anhand der DALLAS-Kriterien international noch Stand der Wissenschaft. Eine Beurteilung von Myokardproben anhand dieser DALLAS-Kriterien ist stark abhängig vom Untersucher und daher meist sehr erfahrenen Pathologen und Histologen vorbehalten. Die Etablierung der Immunhistochemie als alternative Diagnostik, die wesentlich weniger untersucherabhängig ist, kann daher bedeutungsvoll sein, weil somit eine breite Anwendung in den wissenschaftlichen Instituten und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander möglich wären.

Des Weiteren besteht kein allgemein anerkanntes Konzept, anhand dessen die Diagnose einer Myokarditis an autoptisch gewonnenen Myokardproben mit Hilfe der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse gestellt werden kann. Insbesondere beschäftigen sich viele Studien mit der Frage, ob die gefundenen Veränderungen im Myokard, abhängig von ihrer Intensität sowie Verteilungsdichte bzw. Häufigkeit mit der sie im Myokardgewebe auftreten, todesursächlich sein können (Krous et al., 2004; Casali et al., 2012; Kitulwate et al., 2010). Daher scheint es notwendig zu sein, weitere Kriterien hinzuzuziehen, um die Diagnose einer Myokarditis präziser und leichter zu stellen. So empfehlen Kitulwate et al. (2010) einen sogenannten „inflammatory index“ zur Beurteilung autoptisch gewonnener Myokardproben zu etablieren. Dieser ist definiert als „Fokus mit inflammatorischen Infiltraten, die mit einer Nekrose von Myozyten einhergeht“. Damit ist aus Sicht der Autoren die Diagnosestellung nicht mehr schwierig, da auch ein einzelner Abschnitt des Herzens ausreichend dafür ist. Ebenso sei diese Methode weniger anfällig für den „sampling error“ und die „interobserver variability“ (die Ergebnisse einer histologischen und immunhistochemischen Auswertung von Endomyokardproben differiert von Untersucher zu Untersucher und auch bei einem Untersucher selbst, je nach „Tagesform“ (Shanes et al., 1987)).

Nach den WHO-Kriterien gilt bei bioptisch gewonnenem Myokardgewebe Erwachsener der Nachweis von  $> 14$  Zellen/mm<sup>2</sup>, bestehend aus T-Lymphozyten und Makrophagen, sowie einer begleitenden vermehrten Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen, als



beweisend für eine Myokarditis (Kandolf et al., 2012). Eine vergleichbare etablierte Angabe über einen inflammatorischen Grenzwert gibt es zurzeit für Säuglinge und Kleinstkinder nicht. Eine bisherige Studie hierzu schlägt einen Grenzwert von  $> 15$  Leukozyten/HPF vor, ab welchem das Vorliegen einer Myokarditis als gesichert gilt (Dettmeyer, 2004a). Jedoch basiert diese Grenzwertbildung auf einer Mittelwertbildung der eigenen ermittelten Zellzahlen und es ist daher fraglich, ob dies ausreichend valide ist.

Eine Mittelwertbildung führt zu einer Korrektur der Ausreißer, die in einem Kollektiv vorhanden sind. Nun stellt sich die Frage, inwieweit dies zum einen relevant für die Auswertung und damit die Aussagekraft der Ergebnisse und zum anderen, ob eine Mittelwertbildung, anhand dessen Grenzwerte festgelegt werden, sinnvoll ist.

## **2.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand des vorliegenden Kollektives von SIDS-Fällen mittels zweier verschiedener Auszählmethoden, zum einen die Bedeutung der Immunhistochemie in der Myokarditisdiagnostik beim plötzlichen Kindstod zu diskutieren und damit auch der Frage nachzugehen, ob durch sie eine erhöhte Myokarditis-Inzidenz bei Fällen von plötzlichem Kindstod nachgewiesen werden kann, insbesondere im Vergleich zu den DALLAS-Kriterien. Zum anderen soll die Eignung des Mittelwertes als Entscheidungskriterium für oder gegen das Vorliegen einer Myokarditis, in Hinblick auf die Festlegung von Grenzwerten, geprüft werden. In diesem Zusammenhang soll anhand des untersuchten Kollektivs eine durchschnittliche zelluläre Infiltration, die als „physiologisch“ angenommen werden kann, ermittelt und diskutiert werden.

### 3. Material und Methoden

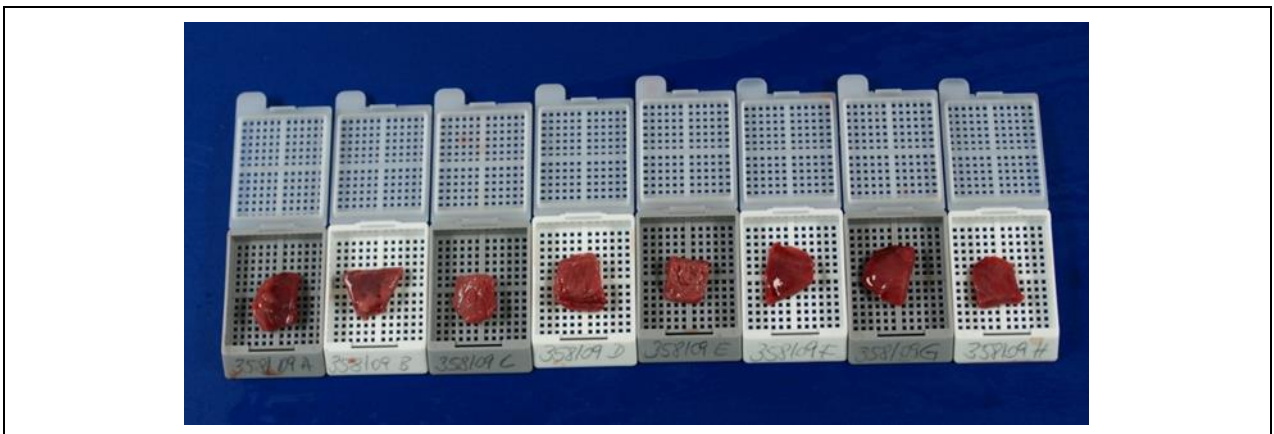
#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Asservation und Fixation in Neutralformalin

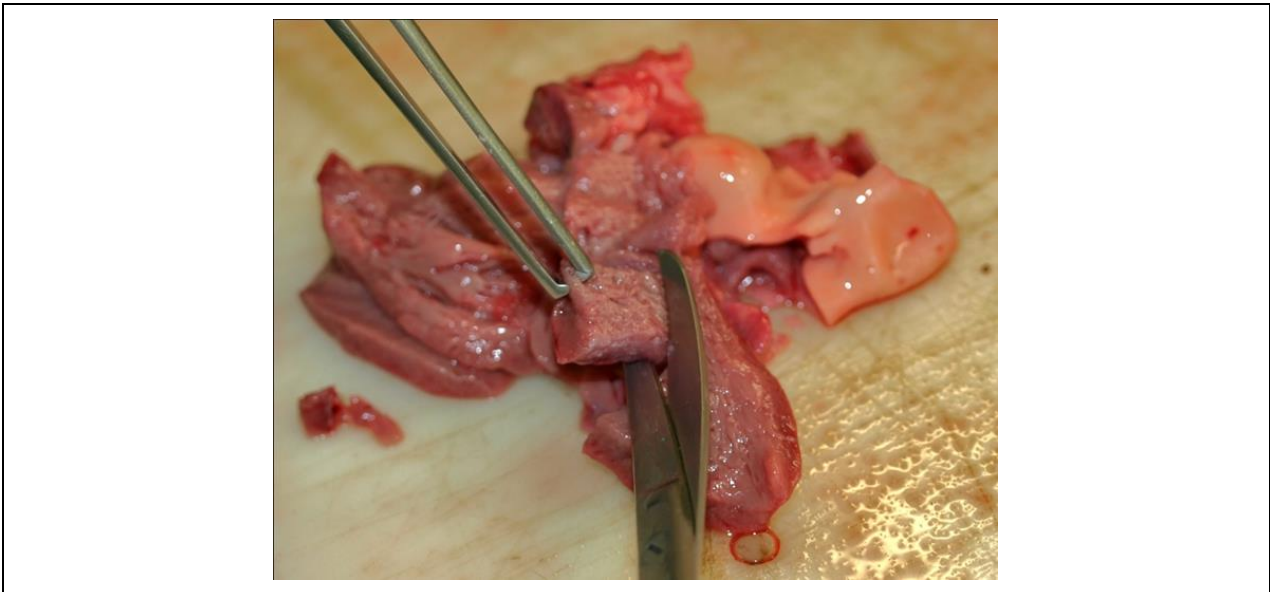
Dem Säuglingsherzen wurden standardisiert an acht definierten Stellen Myokardproben mit einer durchschnittlichen Fläche von 100 mm<sup>2</sup> entnommen. Im Folgenden sind die acht Probeentnahmestellen (PES) aufgelistet:

**Tab. 2:** Myokadprobeentnahmestellen Säuglingsherz

<b>A</b>	Herzkammerwand rechts, basisnah
<b>B</b>	Herzkammerwand rechts, spitzennah
<b>C</b>	Septum interventrikulare, basisnah
<b>D</b>	Septum interventrikulare, spitzennah
<b>E</b>	Vorderwand linke Herzkammer, basisnah
<b>F</b>	Vorderwand linke Herzkammer, spitzennah
<b>G</b>	Hinterwand linke Herzkammer, basisnah
<b>H</b>	Hinterwand linke Herzkammer, spitzennah



**Abb. 3:** Überführung des Herzgewebes der acht PES in die Uni-Kassetten



**Abb. 4:** Heraustrennen des Herzgewebes für die jeweilige PES

In Anbetracht der Gesamtgröße eines Säuglingsherzens von durchschnittlich 35,7g (Stocker und Dehner, 1992) wird die Entnahme von acht ca. 100 mm<sup>2</sup> großen PES als hinreichend repräsentativ erachtet. Dies verdeutlicht auch die Abb. 4.

Die Myokardproben werden direkt bei der Obduktion gewonnen und in die für die Fixierung in Formalin vorgesehenen Behälter (Uni-Kassette) überführt (siehe Abb. 3).

Anschließend erfolgt die Inkubation in 3,5 – 3,8 % Formalin über 48 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 % bis 100 % entwässert. Dies wird automatisiert von dem Gerät Autotechnicon Shannon Citadel 1000 übernommen. Dabei verbleiben die Proben je 1,5 Stunden nacheinander in zwei Behältern mit 70 % Alkohol und danach nochmal für zwei Stunden in 96 % Alkohol und zuletzt für je drei Stunden nacheinander in drei verschiedenen Behältern mit 100 % Alkohol. Hiernach müssen die Proben noch für insgesamt vier Stunden in drei verschiedene xylohaltige Behälter getaucht werden, um dann für weitere zwei Stunden und anschließend 3,5 Stunden in 60 °C warmen Paraplast, dem flüssigen Parrafin, zu liegen. Erst danach erfolgt die Einbettung in Parrafin. Für die Herstellung der Präparate für die Objektträger werden nun mit dem Microtom HN40 der Firma Leica 3-5 µm dicke Schichten von dem ausgehärteten Parrafinblock gehobelt und in ein 45 °C warmes Wasserbad zum Glätten gelegt. Danach werden diese auf die Objektträger aufgezogen.

Nun müssen die Objektträger bei 37 °C über 24 Stunden trocknen und sind danach mikroskopierfertig.

### **3.1.2 SIDS-Kollektiv**

Es wurde ein Kollektiv von 92 Säuglingen aus den Jahren 1997 bis 2009 aus dem Einzugsgebiet der Bonner Rechtsmedizin untersucht, das zu großen Teilen die Kriterien der Kategorie 1b nach Krous des plötzlichen Kindstods erfüllt (Krous et al., 2004). 19 der 92 Fälle müssen der Kategorie 2 nach Krous zugeordnet werden, da sie entweder eine positive Familienanamnese aufweisen, außerhalb der Altersbegrenzung liegen, zum Teil das Gesicht mit Decken bedeckt war oder sie Frühgeborene waren. Eine kategorische Auflistung der 92 Fälle findet sich im Anhang (Tab. 22).

Kategorie 1b nach Krous (Krous et al., 2004):

- Alter zwischen 21 Tagen und neune Monaten.
- unauffälliger Schwangerschaftsverlauf mit unauffälliger Geburt (Gestationsalter >37 Wochen),
- normales Wachstum und normale Entwicklung,
- kein SIDS in der Familie,
- Tatort nicht hinreichend auf Begebenheiten, die einen Tod begünstigen oder bedingen, untersucht oder diese nicht hinreichend dokumentiert,
- Schlafumgebung unauffällig, insbesondere keine Hinweise für einen versehentlichen Tod,
- keine potentiellen todesursächlichen Pathologien in der Autopsie gefunden,
- kein Hinweis für Traumata, beabsichtigte/unbeabsichtigte Gewalteinwirkung,
- kein Hinweis für Thymusstress,
- unvollständige toxikologische oder mikrobiologische, metabolische, radiologische Untersuchungen inklusive Glaskörperflüssigkeit.

### 3.1.3 Kontrollkollektiv

Das altersgleiche Kontrollkollektiv umfasst 15 Säuglinge, die einer eindeutigen Todesursache zugeordnet werden konnten. Dabei waren vor allem Rauchgasintoxikationen, Tod durch stumpfe Gewalteinwirkung oder Tod durch Ersticken todesursächlich. Eine genaue Auflistung der Todesursachen findet sich im Anhang (Tabelle 23).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Auswertung Immunhistochemie

#### 3.2.1.1 Auszählung in high power field

Jede der acht Myokardproben eines Falles wurde für die Marker LCA, CD68 und CD45-R0 in 20 HPFs quantitativ mit dem Olympus BX 50 ausgezählt. Dabei wurde das Gesichtsfeld streng mäanderförmig abgefahren, um eine unabhängige, dem Zufall überlassene, aber dennoch repräsentative Aussage über die durchschnittliche zelluläre Infiltration treffen zu können. Somit werden insgesamt 160 HPFs pro Färbung und Fall ausgewertet. Für die Marker HLA und E-selectin wurde hingegen eine semiquantitative Auszählung mit einem vier-stufigen Punkteschema verwendet:

**Tab. 3:** Graduierung von HLA und E-selectin

keine oder lediglich schwache Färbung	-	schwache, diskontinuierliche Färbung	+
moderate, aber eindeutige Färbung	++	starke vollständige Färbung	+++

Auch hier wurden 160 HPFs pro Fall und Färbung ausgezählt.

#### 3.2.1.2 Auszählung in mm<sup>2</sup>

Grasmeyer (2014) wertete dasselbe SIDS- und Kontrollkollektiv wie in der vorliegenden Arbeit aus. Sie verwendete jedoch ein 1 mm<sup>2</sup> großes Rechteck und werteten in 100facher Vergrößerung ebenfalls mäanderförmig zehn dieser 1 mm<sup>2</sup> großen Quadrate pro Probeentnahmestelle aus. Auch sie beurteilte dieselben acht Probenentnahmestellen

A- H und werteten somit insgesamt 80 mm<sup>2</sup> pro Färbung und Fall aus. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit bezog sie in ihrer Untersuchung HLA und E-selectin nicht mit ein.

### 3.2.1.3 Vergleich der beiden Zählmethoden

Um die Zählergebnisse der üblichen Zählmethoden in HPF mit der in mm<sup>2</sup> hinreichend miteinander vergleichen zu können, musste ein Umrechnungsfaktor ermittelt werden. Hierzu wurde mittels Sehfeldzahl des Okulars, welches abhängig von dem verwendeten Mikroskop ist, die Fläche eines HPFs ermittelt. Die Berechnung erfolgte für das verwendete Mikroskop BX 50 der Firma Olympus in Rücksprache mit Herrn Behrendt (Email Fa. Olympus, 26.8.2009).

- Sehfeldzahl des Okulars: 22 mm (Durchmesser (d) des Kreises bei 1 er Objektiv (10fache Vergrößerung)
- Formel zur Berechnung der Kreisfläche:  $(A) = \pi \times d^2/4$
- Durchmesser (d) für 10 er Objektiv (100fache Vergrößerung): 2,2 mm
- Durchmesser (d) für 40 er Objektiv (400fache Vergrößerung): 0,55 mm
- Fläche HPF (400fache Vergrößerung):  $A = \pi \times (0,55 \text{ mm})^2/4 = 0,2376 \text{ mm}^2$

Hieraus ergab sich ein Umrechnungsfaktor von 4,21. Daraus folgt, es mussten 4,21 HPFs ausgezählt werden, um 1 mm<sup>2</sup> Gewebe zu beurteilen. Die Zählergebnisse wurden entsprechend mit diesem Faktor multipliziert und der Vergleich graphisch dargestellt.

### 3.2.2 Auswertung Hämatoxylin-Eosin-Schnitte

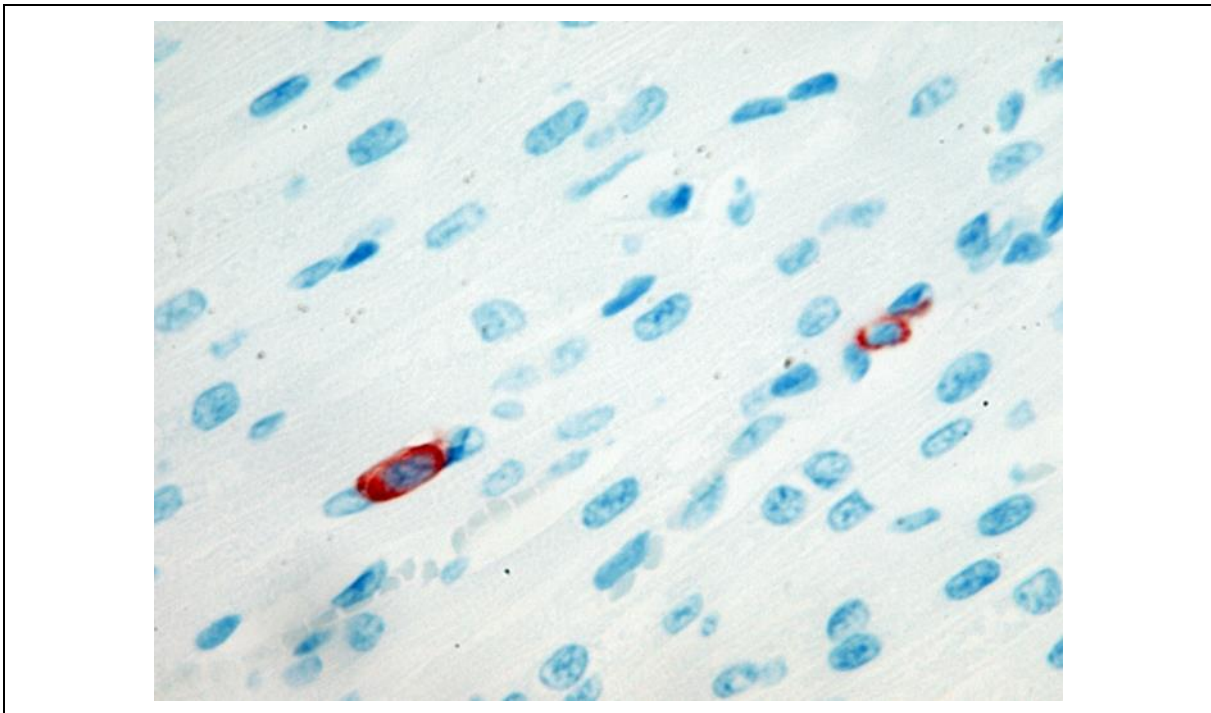
Für die konventionell-histologische Diagnostik wurden die Präparate in der HE-Färbung zum Nachweis einer Myokarditis nach den Dallas-Kriterien auf Myozytolyse, Myozytennekrose, lymphomonozytäres Infiltrat und interstitielles Ödem untersucht. Alle Präparate wurden jeweils von drei unabhängigen Personen begutachtet.

### 3.2.3 Immunhistochemische Färbungen

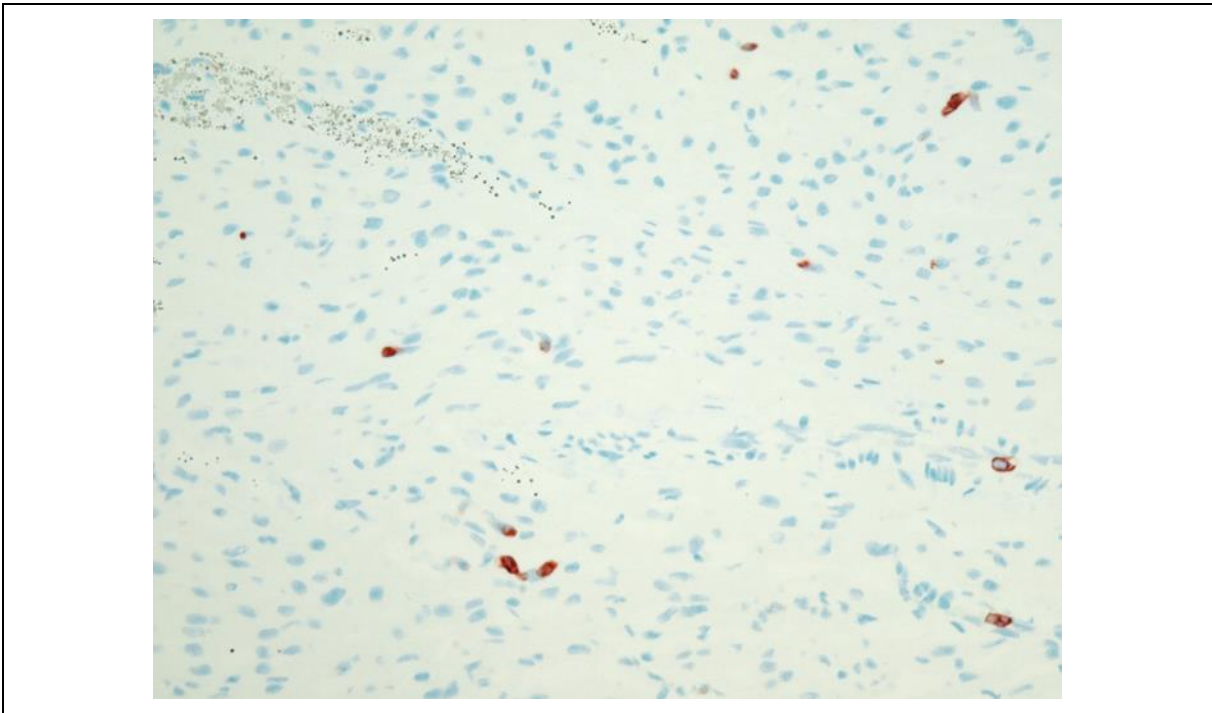
#### 3.2.3.1 Leukozyten Common Antigen (LCA)

Für den Nachweis des Leukozyten Common Antigens wurde der Isotyp IgG1 des CD45-Antigens mit der Klonnummer MEM-28 der Firma abcam verwendet.

CD45 gehört zu den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, einer Familie von glykosylierten Transmembranproteinen. Von diesen gibt es mehrere Isoformen, die alle dieselbe intrazelluläre Domäne besitzen. Diese weist eine Tyrosinphosphataseaktivität auf und kommt auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen und deren Vorläufern vor. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Inhibition und auch in der Regulation von verschiedenen Immunfunktionen. Durch die Verwendung von CD45 werden sowohl naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als auch Gedächtniszellen erfasst (Shanafelt et al., 1996)



**Abb. 5:** LCA in 1000facher Vergrößerung

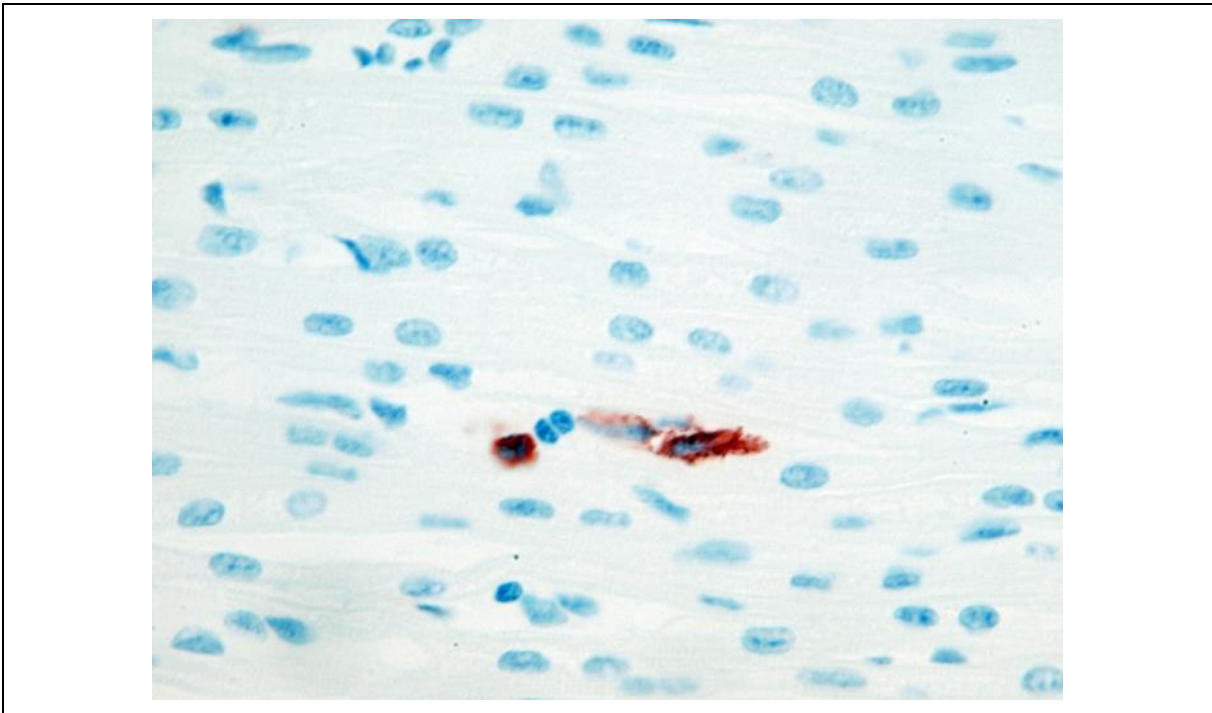


**Abb. 6:** LCA in 400facher Vergrößerung

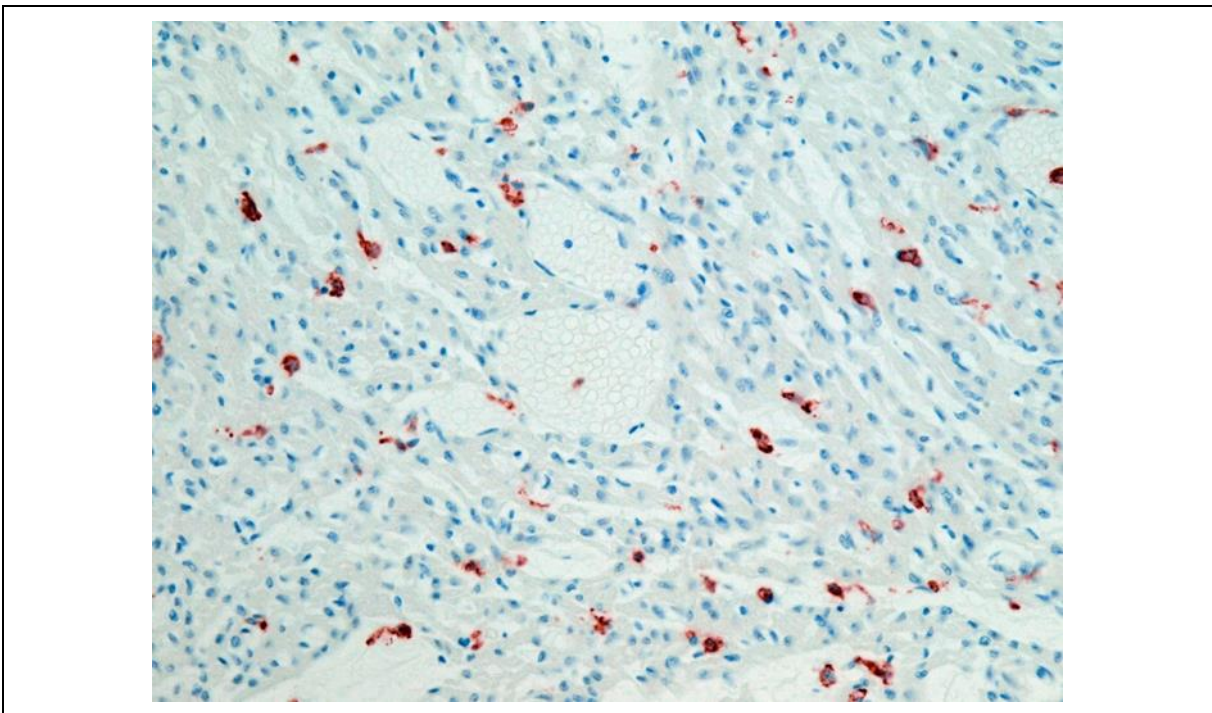
### **3.2.3.2 T-Lymphozyten (CD45-R0)**

CD45-R0 ist eine Isoform des Transmembranproteins CD45 und wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und Thymozyten exprimiert, wobei vor allem T-Gedächtniszellen angefärbt werden (Shanafelt et al., 1996; Pulido et al., 1994; Smith et al., 1986). Es wurde der Anti-Human T-Cell, CD45-R0 des Klons UCHL1 der Firma DAKO verwendet.





**Abb. 7:** CD45-R0 in 1000facher Vergrößerung



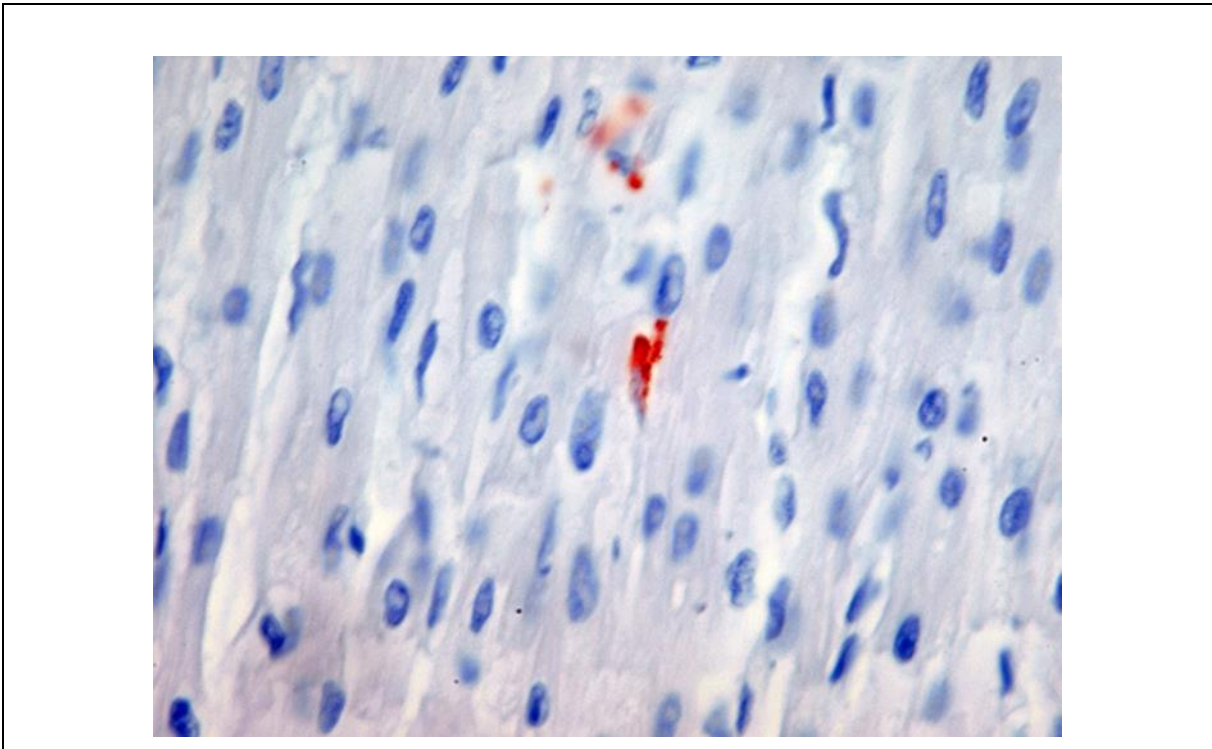
**Abb. 8:** CD45-R0 in 400facher Vergrößerung

### 3.2.3.3 Makrophagen (CD68)

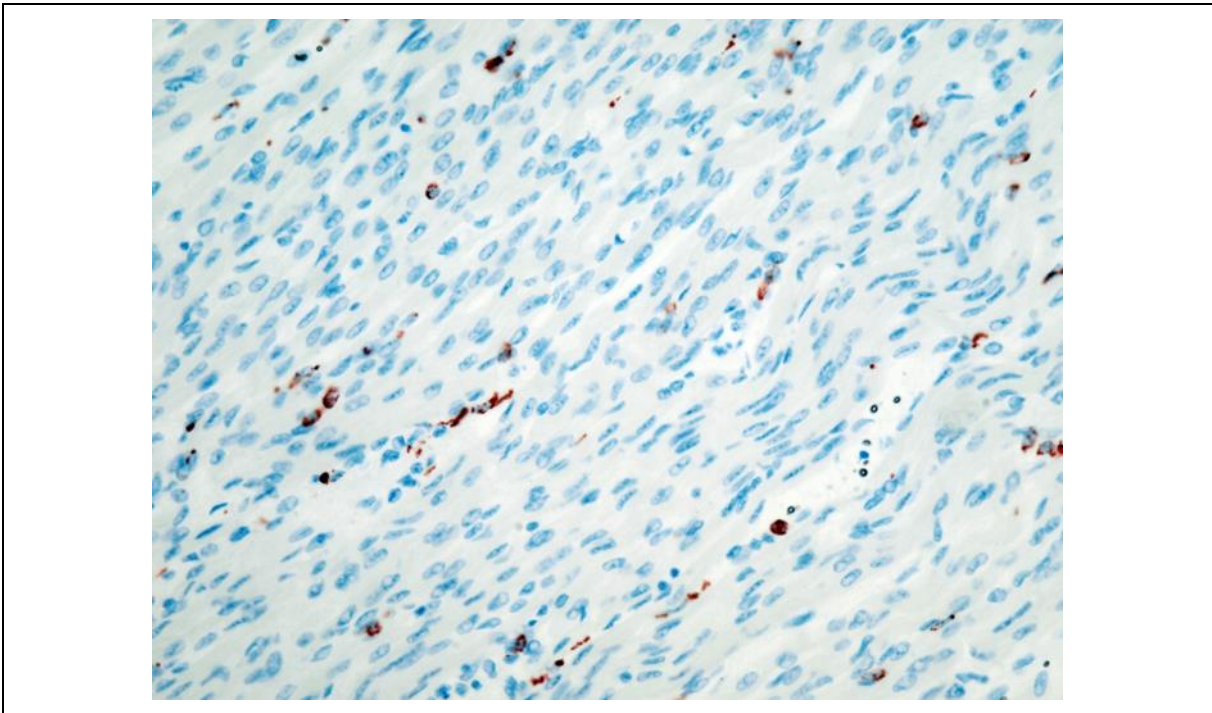
Das CD68 Antigen ist ein glykolysiertes Typ1 Transmembranprotein aus der Familie der LAMPs, welches vor allem in den Lysosomen von Makrophagen, Monozyten, Histiozyten,

Langerhans-Riesenzellen sowie Kupfer-Zellen und Osteoklasten vorkommt. Ihre genaue Rolle ist bislang noch ungeklärt, allerdings sind sie am lysosomalen Transport bzw. an der Endozytose beteiligt (Falini et al., 1993; Holness und Simmons, 1993; Micklem et al., 1989).

Es wurde der Antikörper des Clons PG-M1 der Firma DAKRO verwendet. Dieser reagiert mit sogenannten plasmazytoiden T-Zellen, die sich aus der Linie der Makrophagen/Monozyten entwickeln, jedoch nicht mit antigenpräsentierenden Zellen (Falini et al, 1993)



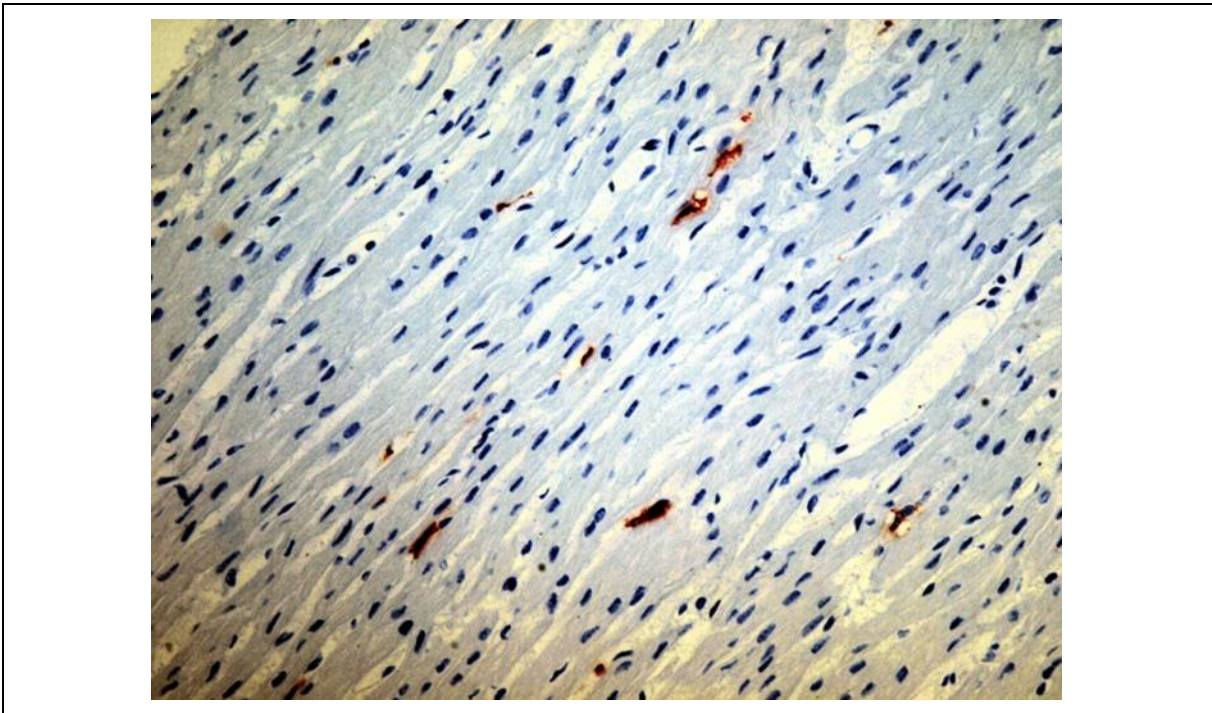
**Abb. 9:** CD68 in 1000facher Vergrößerung



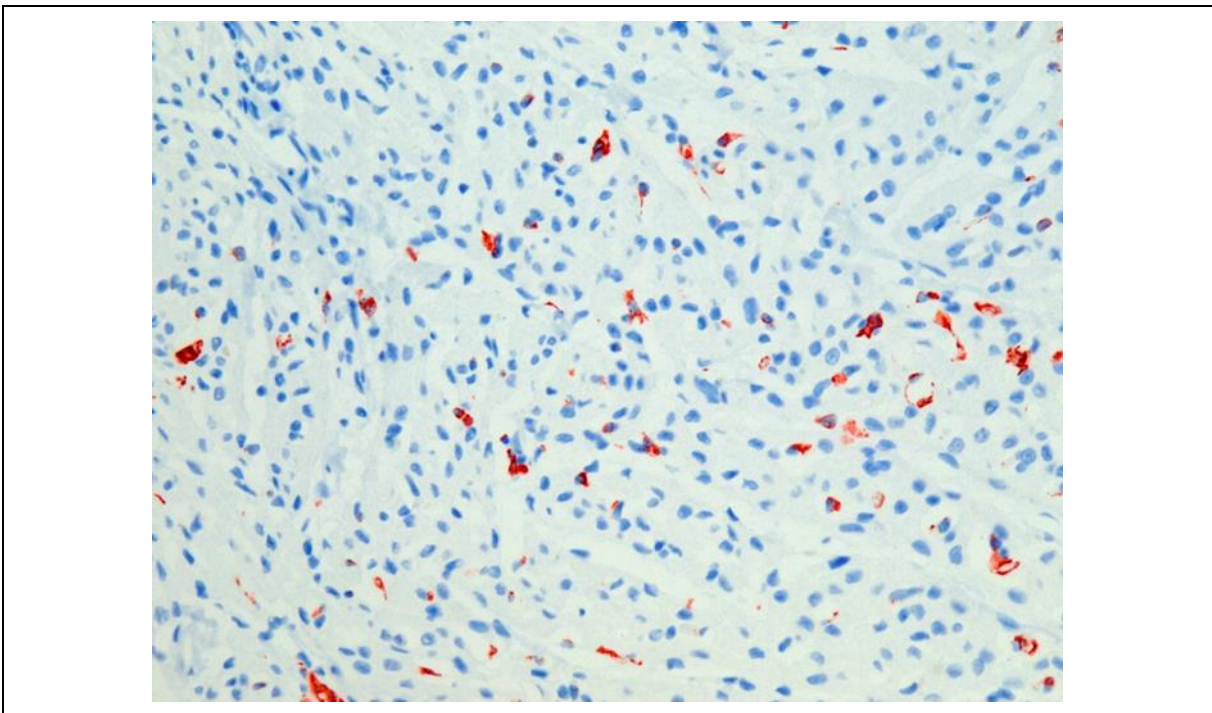
**Abb. 10:** CD68 in 400facher Vergrößerung

#### **3.2.3.4 Humanes Leukozyten Antigen (HLA)**

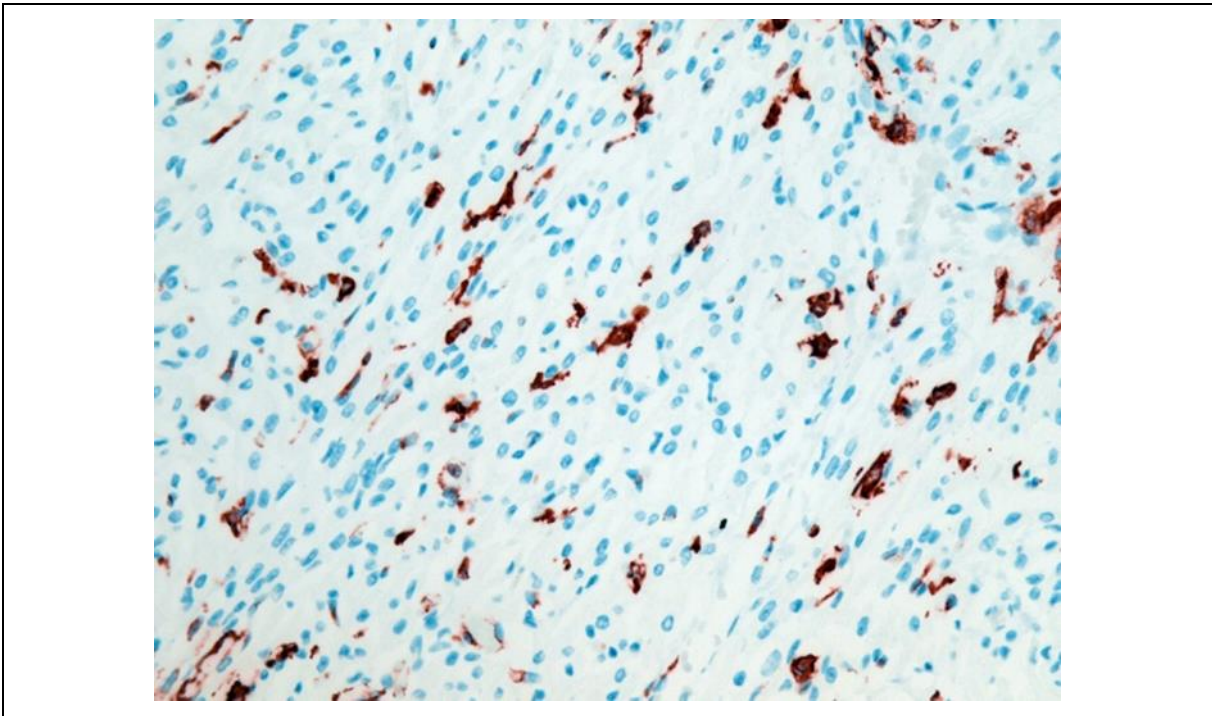
In dieser Arbeit wurde das Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DR Antigen mit der  $\alpha$ -Kette des Clons TAL 1B5 der Firma DAKO verwendet. Es färbt die Klasse-II-Moleküle an, die bei durch Viren oder Bakterien verursachten Entzündungsprozessen vermehrt exprimiert werden.



**Abb. 11:** HLA in 400facher Vergrößerung, schwache Färbung +



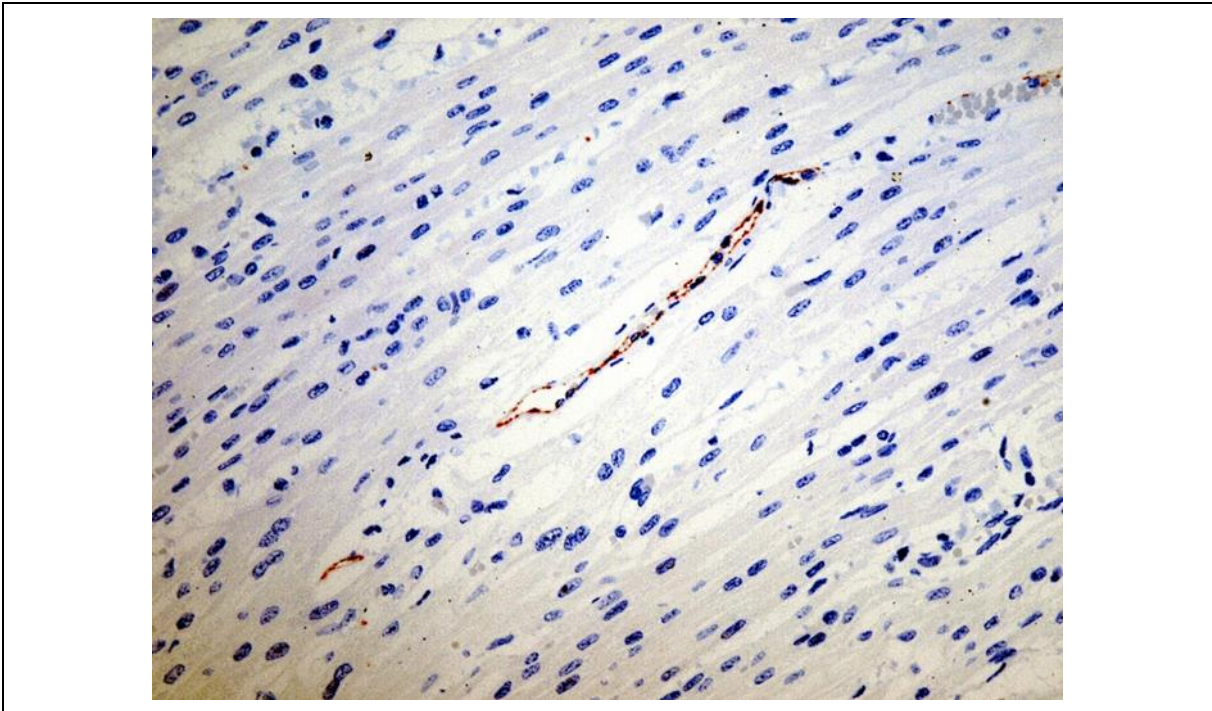
**Abb. 12:** HLA in 400facher Vergrößerung, moderate Färbung ++



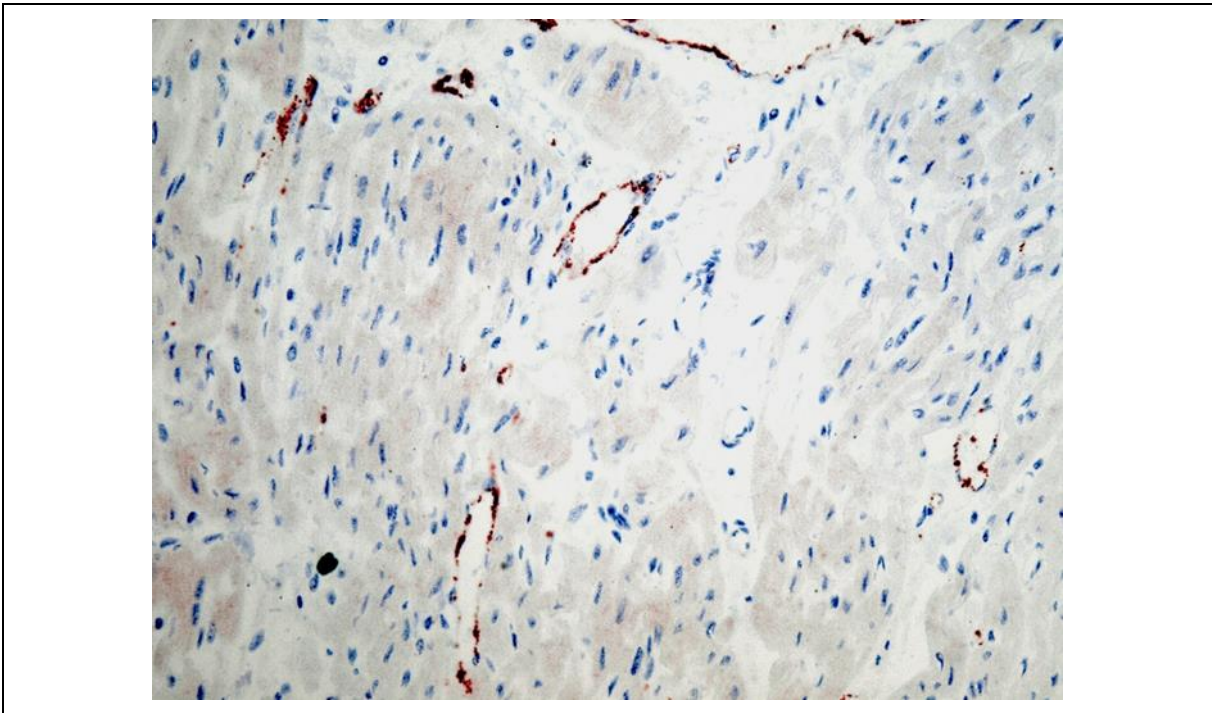
**Abb. 13:** HLA in 400facher Vergrößerung, starke Färbung +++

### 3.2.3.5 E-selectin (CD62E)

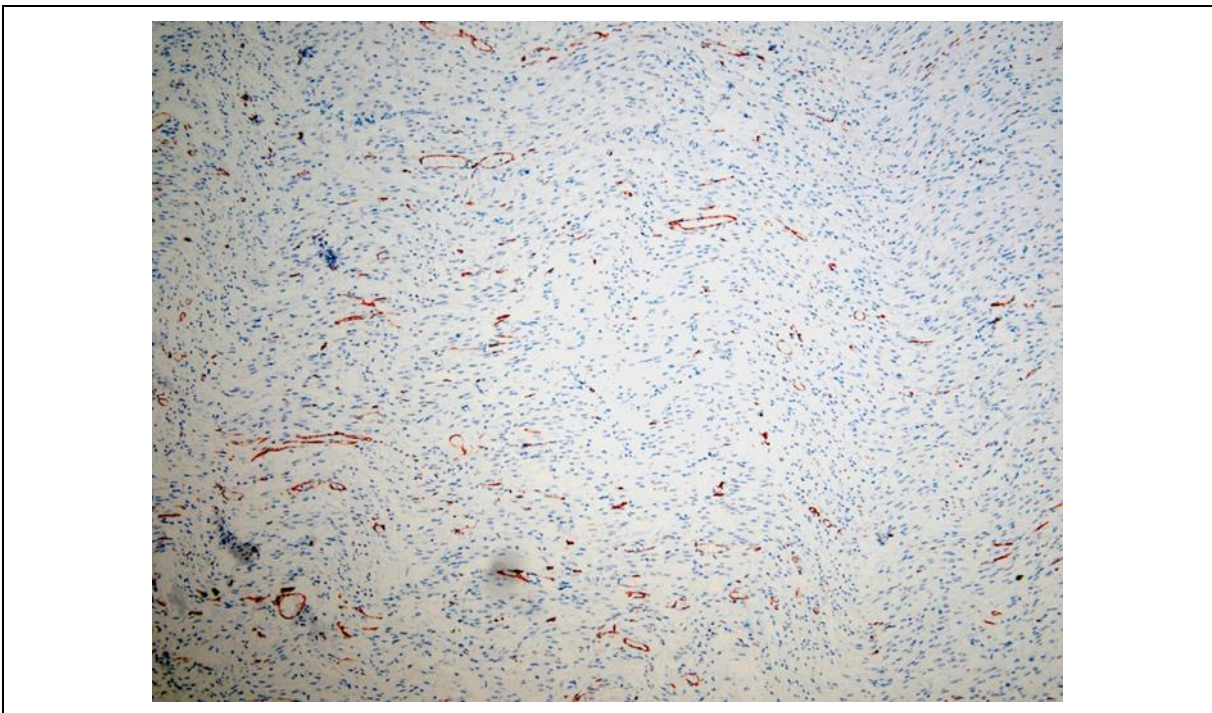
Als E-selectin wurde das humane Antigen CD62E des Clons 14G4 der Firma Monosan mit der Cat. Nr. MONX10824 verwendet.



**Abb. 14:** E-selectin in 400facher Vergrößerung, schwache Färbung +



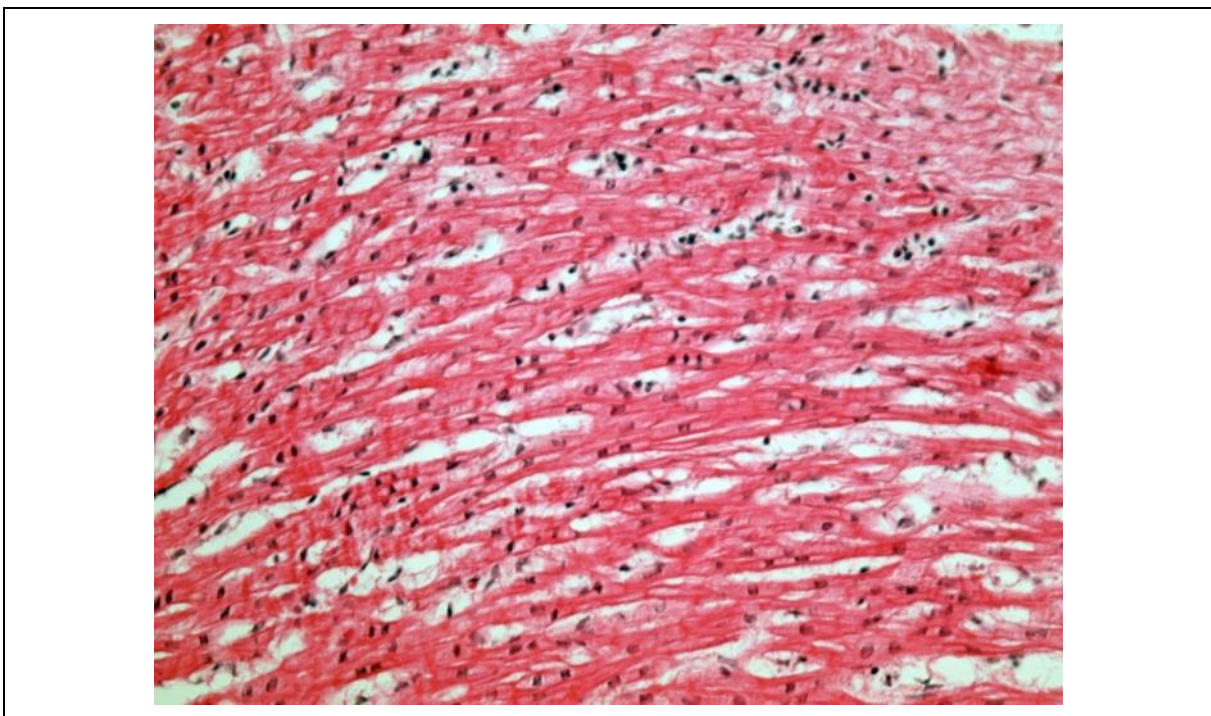
**Abb. 15:** E-selectin in 400facher Vergrößerung, moderate Färbung ++



**Abb. 16:** E-selectin in 100facher Vergrößerung, starke Färbung +++

### 3.2.4 Konventionell-histologische Diagnostik (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein Standardfärbeverfahren, bei dem sich der natürliche Farbstoff Hämalan, in seiner basischen Form als Hämatoxylin, mit seinen positiv geladenen Verbindungen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren heftet. Folglich färben sich Zellkerne und Ribosomen intensiv blau an. Eosin, als synthetischer Stoff, ist positiv geladen und heftet sich an alle negativ geladenen Moleküle. Somit werden Strukturen wie Proteine und Kollagen rot angefärbt.



**Abb. 17:** HE in 400facher Vergrößerung

### 3.2.5 Datenauswertung

Die Ergebnisse der Auszählungen der einzelnen high power fields wurden zunächst auf Vordrucke eingetragen und anschließend in das Kalkulationsprogramm Excel übertragen. Mit diesem erfolgte auch die Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Schaubildern und Tabellen.

### 3.2.6 Statistische Auswertung

Die Rohdaten der Färbungen für LCA, CD68 und CD45-R0 wurden tabellarisch in Excel überführt und anschließend der Mittelwert der Zellzahlen pro Färbung und Fall bestimmt.

Hieraus wurde danach der Mittelwert über das gesamte Kollektiv pro Färbung erstellt. Dabei fiel bei Bildung eines Gesamtmittelwertes für jede Färbung aus den jeweiligen Mittelwerten pro PES und Färbung auf, dass sich das Ergebnis bei denjenigen Fällen, bei denen nicht immer alle 160 HPF vorhanden waren, in der zweiten Dezimalstelle unterschied. In zwei Fällen, bei denen hohe Schwankungen der Zellzahlen von PES zu PES und auch innerhalb einer PES vorkamen, war der Unterschied sogar in der Vordezimalstelle auffällig. Insgesamt wurde diese statistisch/methodisch bedingte geringe Abweichung jedoch als irrelevant eingestuft. Um auch die semiquantitative Auszählung auswerten zu können, erfolgte die Überführung in eine numerische Skala nach dem folgenden Schema:

**Tab. 4:** Semiquantitative Auszählung

Grad der Expression	Excel-Darstellung	
wenig	1	+
moderat	2	++
stark	3	+++

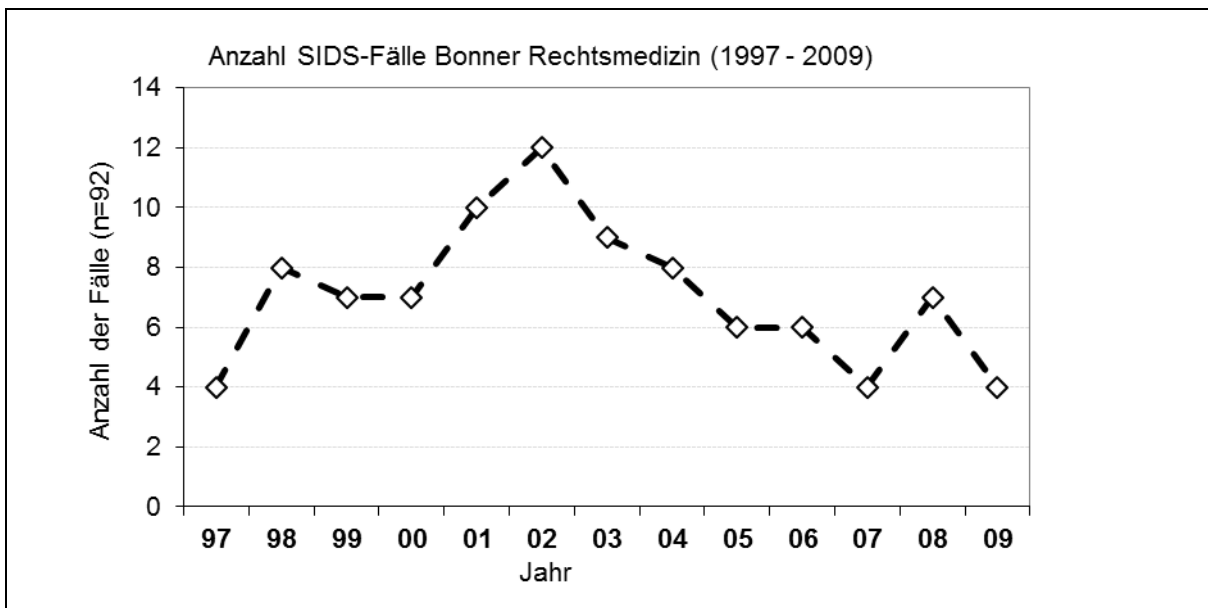
Die Signifikanzprüfung erfolgte anhand der Mittelwerte pro Fall und Färbung. Mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5 sowie mit dem Tool WinStat von Excel 2010 wurde der U-Test nach Mann und Whitney für nicht parametrische unabhängige Stichproben verwendet.



## 4. Ergebnisse

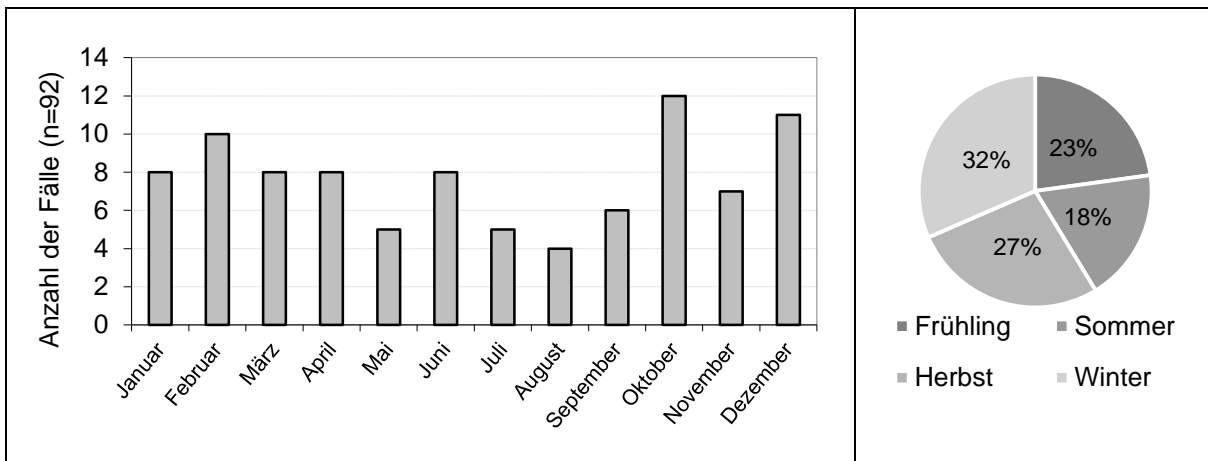
### 4.1 Allgemein

In dem SIDS-Kollektiv konnten die typischen Risikofaktoren und eine jahreszeitliche Verteilung, wie sie in bestehender Literatur bereits häufig beschrieben wird, gefunden werden. In den nachfolgenden Diagrammen werden die Merkmale des SIDS-Kollektives dargestellt. Im Einzugsgebiet der Bonner Rechtsmedizin ist die SIDS-Inzidenz von 1997 bis 2002 angestiegen, jedoch danach kontinuierlich gefallen (Abb. 18). Dies deckt sich mit den statistischen Erhebungen des Robert Koch-Instituts und des Statistischen Bundesamtes, nach denen ebenfalls ein allgemeiner Rückgang der SIDS-Fälle in der Bundesrepublik Deutschland zu verzeichnen ist (Abb. 1, S. 11).



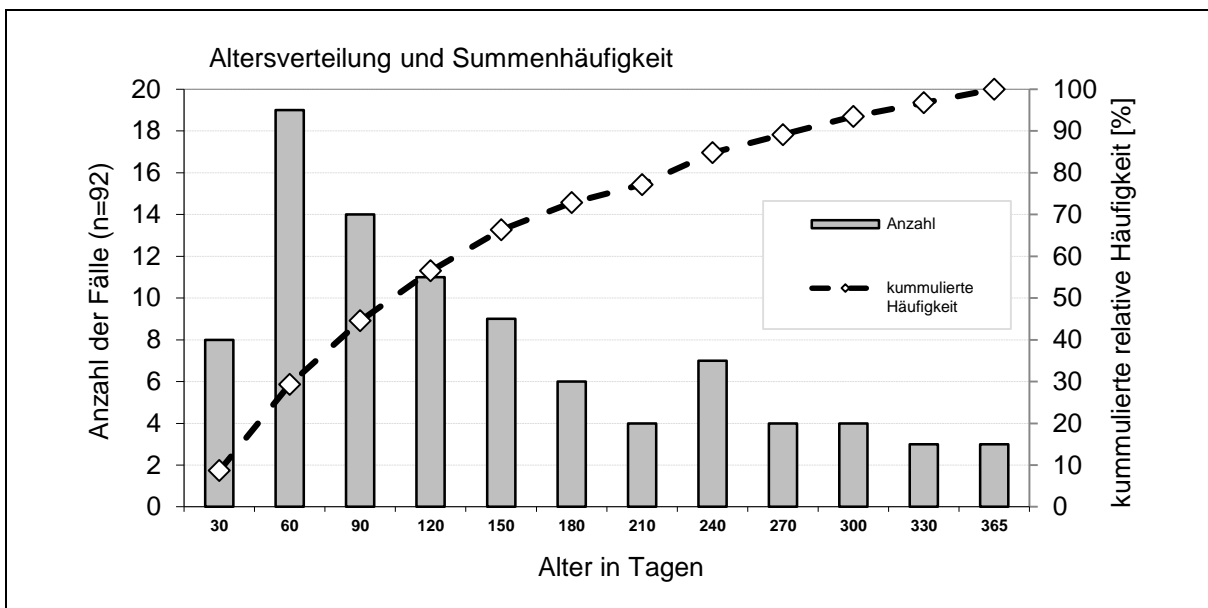
**Abb. 18:** Anzahl von SIDS-Fällen der Bonner Rechtsmedizin von 1997-2009

In dem untersuchten Kollektiv verstarb die Mehrzahl der Säuglinge (59 %) in den Herbst- und Wintermonaten September bis Februar, wohingegen sich in den Sommermonaten März bis August 41 % der Todesfälle ereigneten.



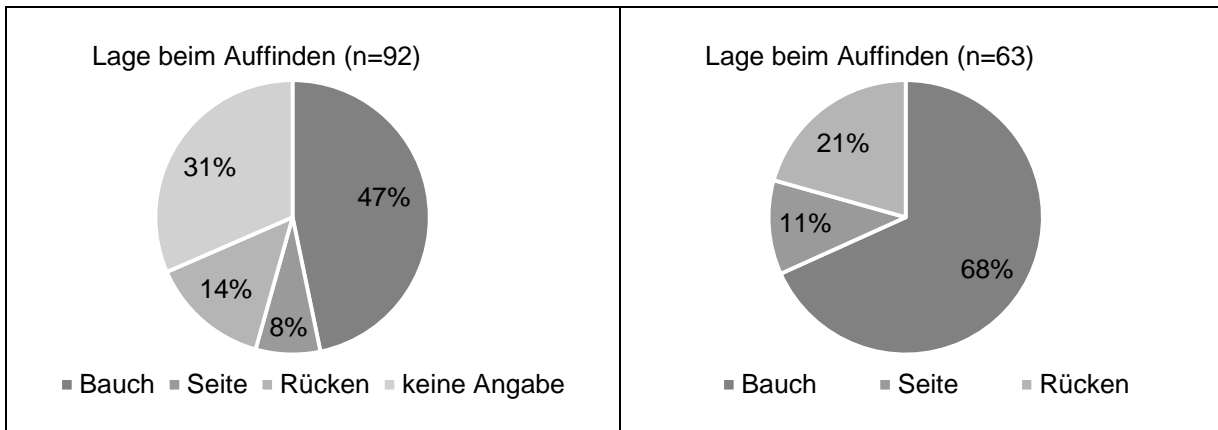
**Abb. 19:** links: Monatliche absolute Verteilung; rechts: Jahreszeitliche relative Verteilung der SIDS-Fälle

Betrachtet man das durchschnittliche Alter der Säuglinge zum Todeszeitpunkt, ist festzustellen, dass mehr als die Hälfte (56,5 %) innerhalb der ersten 4 Monate verstarben.



**Abb. 20:** Verteilung des Todesalters in Tagen

Als weiterer Risikofaktor wurde die Lage der Säuglinge beim Auffinden betrachtet. Dabei gab es in den zur Verfügung stehenden Unterlagen in 39 der 92 Fälle keine Angaben. Dennoch sind 68 % der Säuglinge, bei denen eine Angabe zur Lage beim Auffinden vorhanden war, in Bauchlage gefunden worden und bestätigen somit die allgemeine Anerkennung als Risikofaktor (Schlaud et al., 1999; Vennemann et al., 2004).



**Abb. 21:** Angaben zur relativen Lageverteilung: A: gesamtes SIDS-Kollektiv, B: nur diejenigen Fälle, bei denen eine Angabe zur Lage vorlag

Unter den 92 Säuglingen waren 65,2 % männlich. Dies spiegelt die in der Literatur beschriebene Geschlechtsverteilung, mit einer höheren Auftretenswahrscheinlichkeit für Jungen, wieder (Bajanowski et al., 2002).

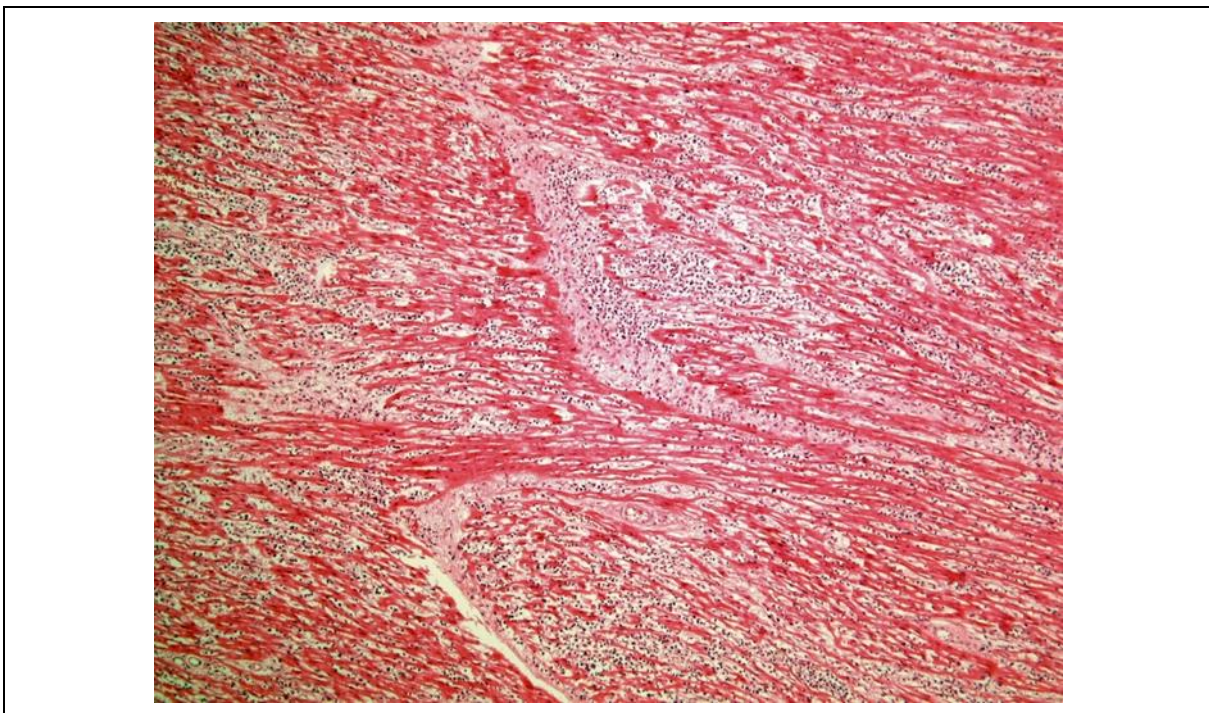
## 4.2 HE

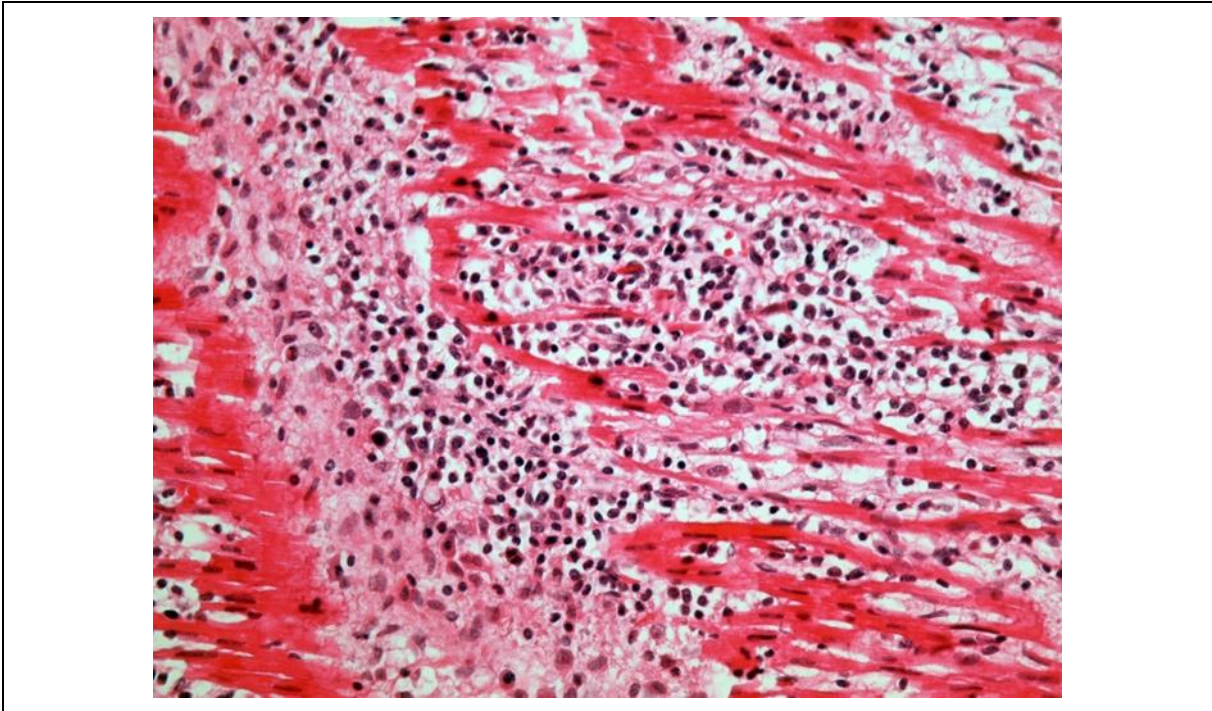
Die 92 SIDS-Fälle wurden nach den Dallas-Kriterien auf Myozytolysen, Nekrosen, Ödem und lymphomonozytäre Infiltrate untersucht (Aretz et al., 1987). Dabei kann nur in 2 Fällen (Fall 4 und 10) eine eindeutige Myokarditis gemäß der Dallas-Kriterien nachgewiesen werden, wobei alle 8 Probeentnahmestellen auffällig sind. Sieben weitere Fälle weisen entweder fokale zelluläre Infiltrationen und ein Ödem oder nur eines der beiden Kriterien auf, wobei weder Nekrosen noch Myozytolysen vorhanden sind. Somit ergibt sich für das untersuchte Kollektiv eine Myokarditisinzidenz in der konventionellen histologischen Diagnostik von 2,2 %.

Die Kontrollgruppe wies histologisch gänzlich ein unauffälliges Myokardgewebe auf.

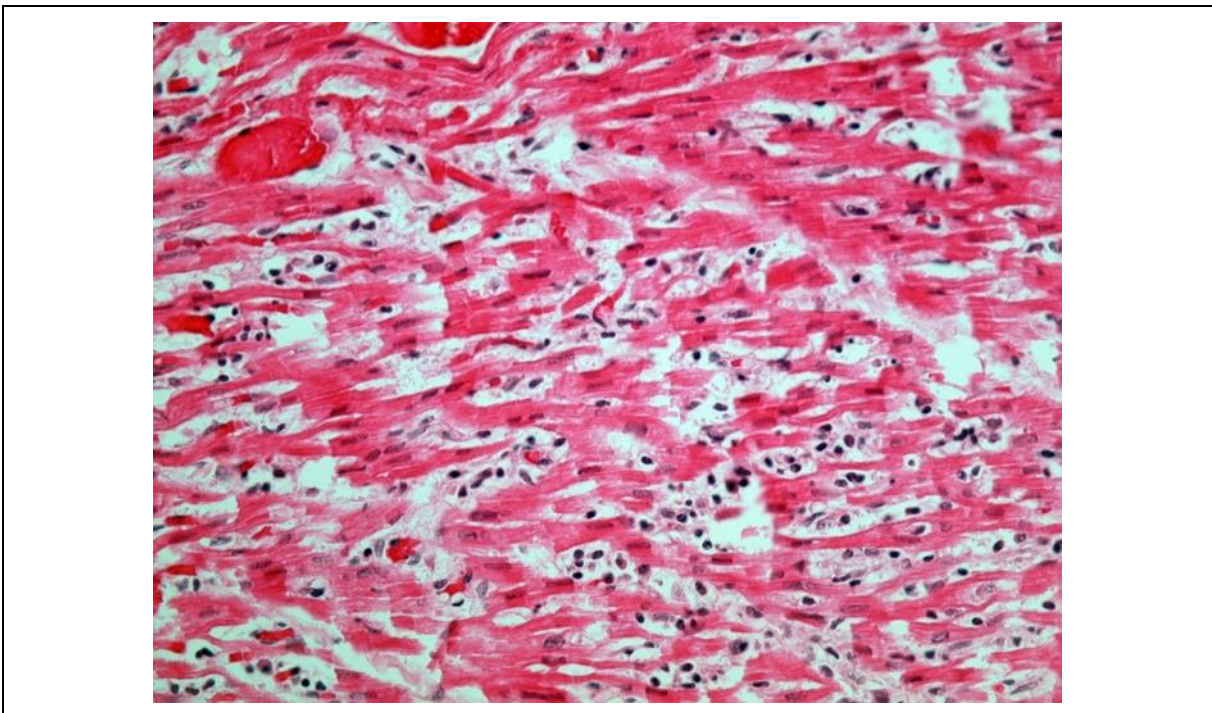
**Tab. 5:** Histologische Besonderheiten der neun auffälligen SIDS-Fälle

SIDS Fall	Histologische Besonderheiten
2	erhöhte zelluläre Infiltration in A
4	<b>Myokarditis gemäß den Dallas-Kriterien in allen PES</b>
8	Ödem, erhöhte zelluläre Infiltration in C,G,H
9	Ödem
10	<b>Myokarditis gemäß den Dallas-Kriterien in allen PES</b>
36	erhöhte zelluläre Infiltration in F
39	erhöhte zelluläre Infiltration in E
45	Ödem
47	Ödem

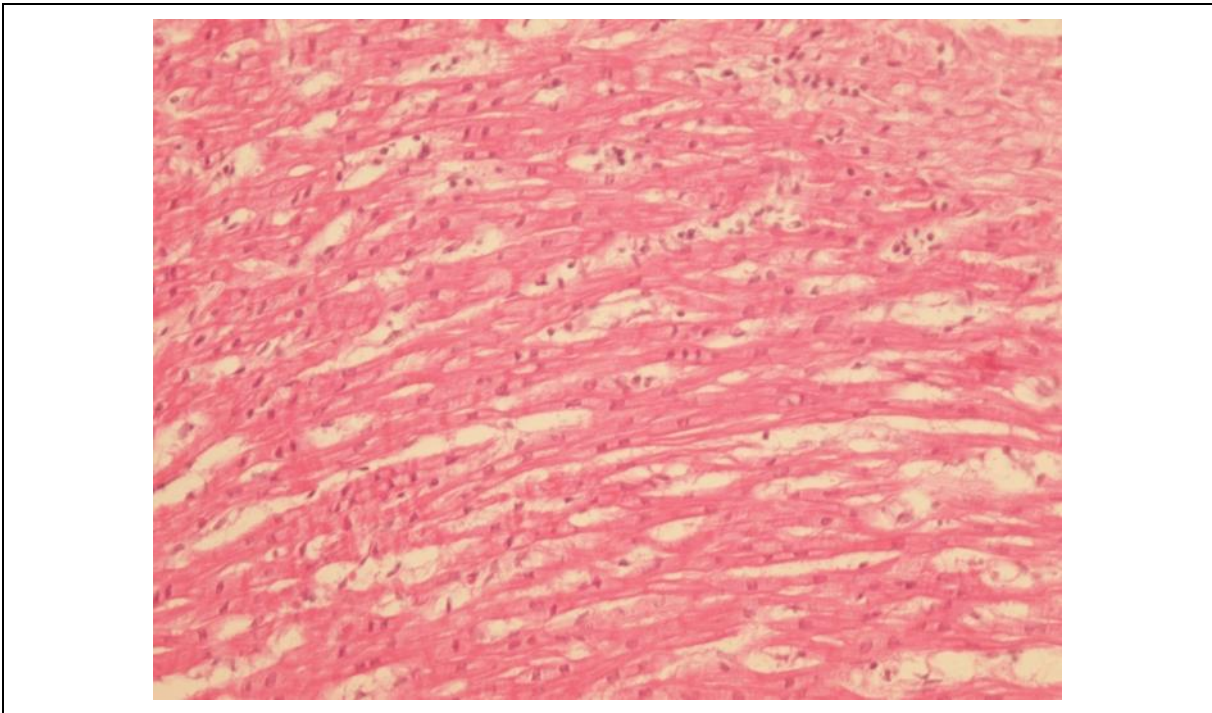
**Abb. 22:** Fall 4, HE, G, 100fache Vergrößerung: Nachweis eines interstitiellen Ödems, lymphomonocytärer Infiltrate sowie Myozytolyse und Nekrosen



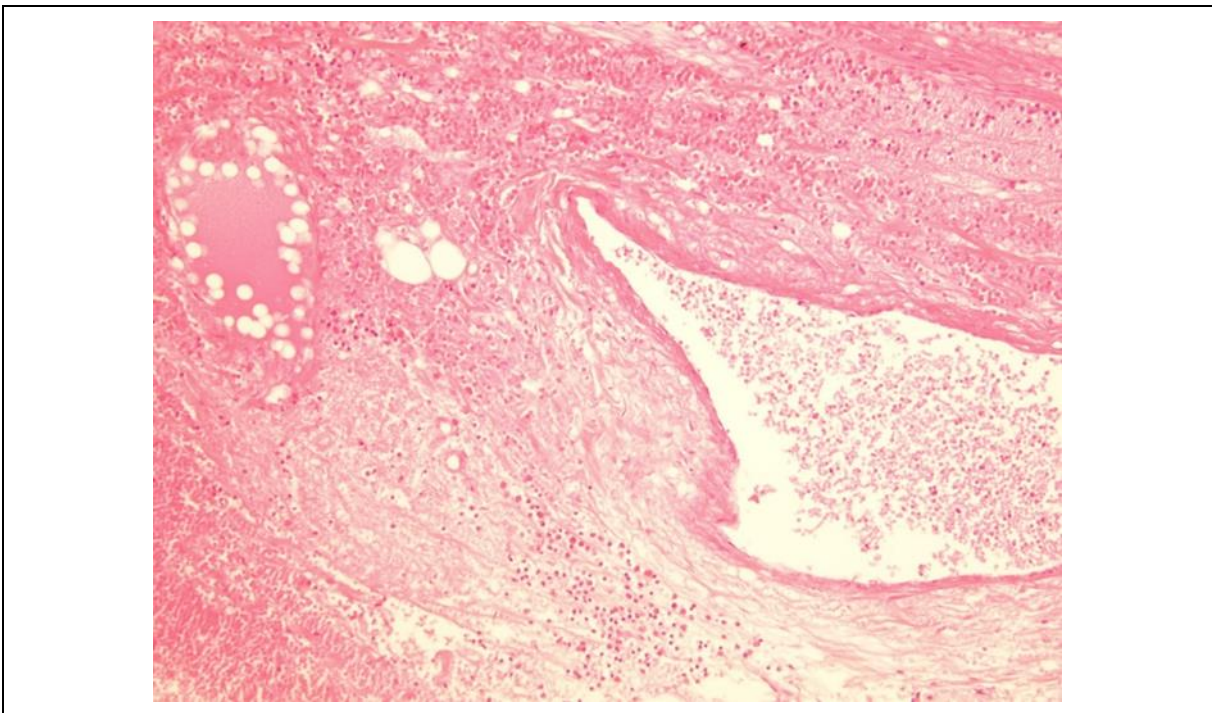
**Abb. 23:** Fall 10, HE, G, 400fache Vergrößerung: ödematöses Interstitium mit dichtem, überwiegend lymphomonozytärem Infiltrat



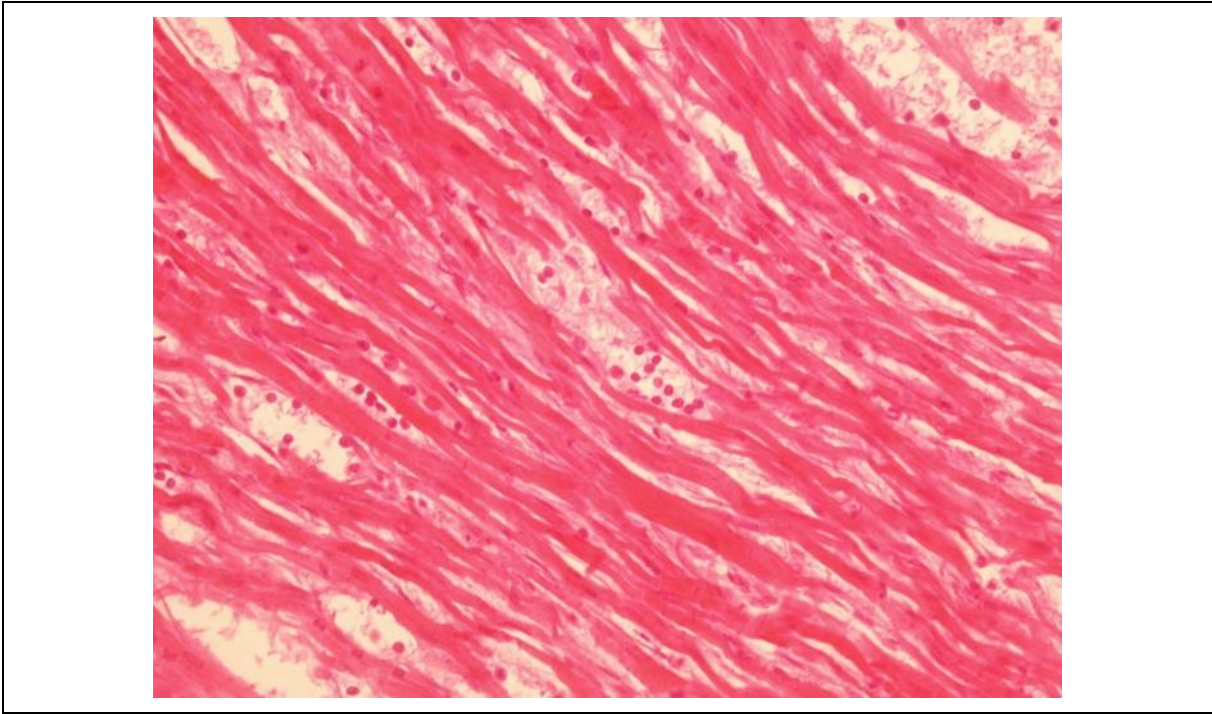
**Abb. 24:** Fall 10, HE, A, 400fache Vergrößerung: nekrotische Myokardfasern



**Abb. 25:** Fall 8, HE, H, 400fache Vergrößerung: zelluläre Infiltration, Ödem



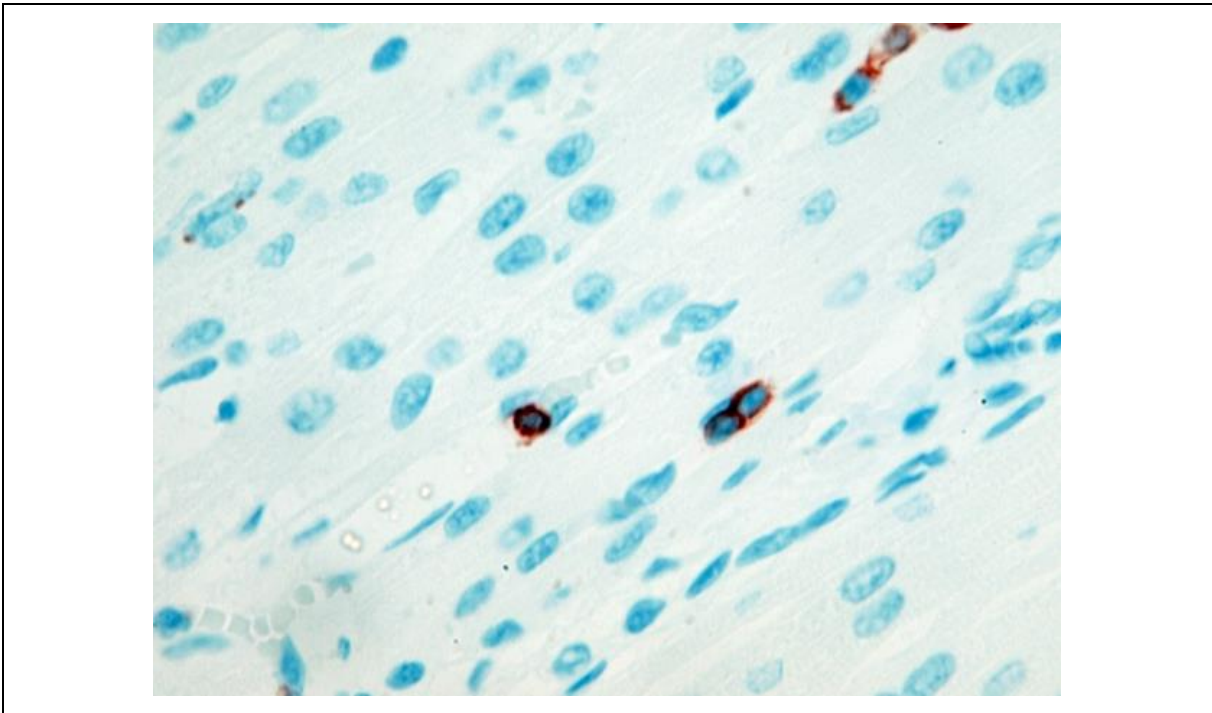
**Abb. 26:** Fall 8, HE, C, 100fache Vergrößerung: starke zelluläre Infiltration



**Abb. 27:** Fall 39, HE, E, 400fache Vergrößerung: geringe zelluläre Infiltration

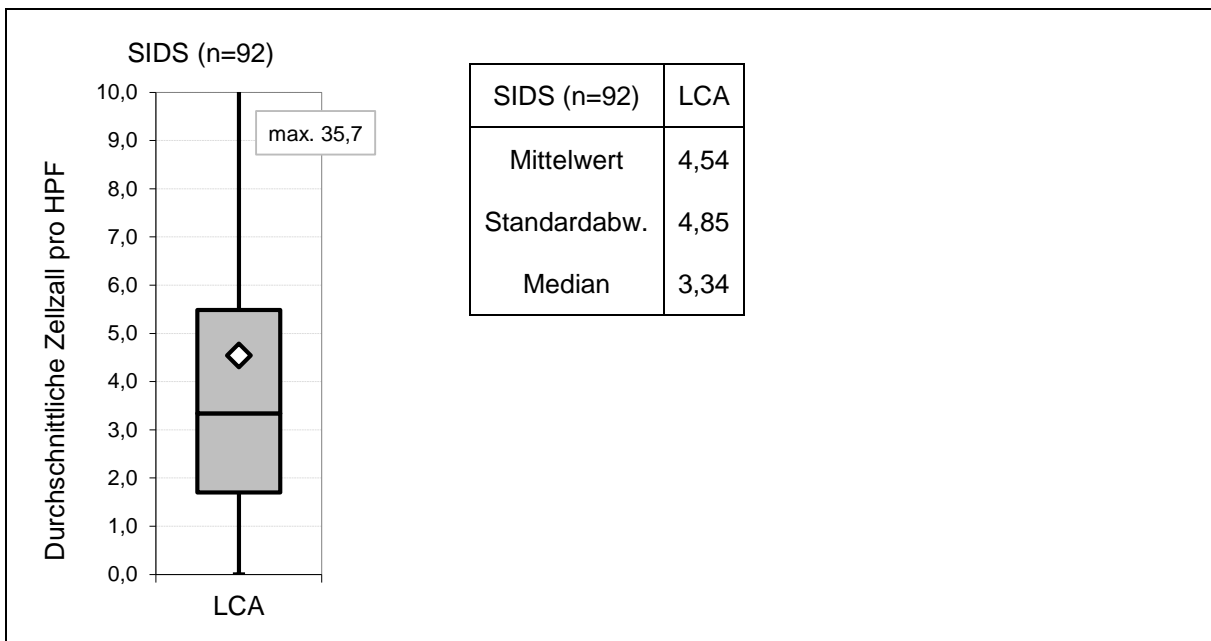
### 4.3 Leukozytenantigen (LCA)

Mit dem Marker LCA werden wie bereits in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, membranständige lymphoidale Zellen angefärbt.



**Abb. 28:** Beispiel LCA, 1000fache Vergrößerung

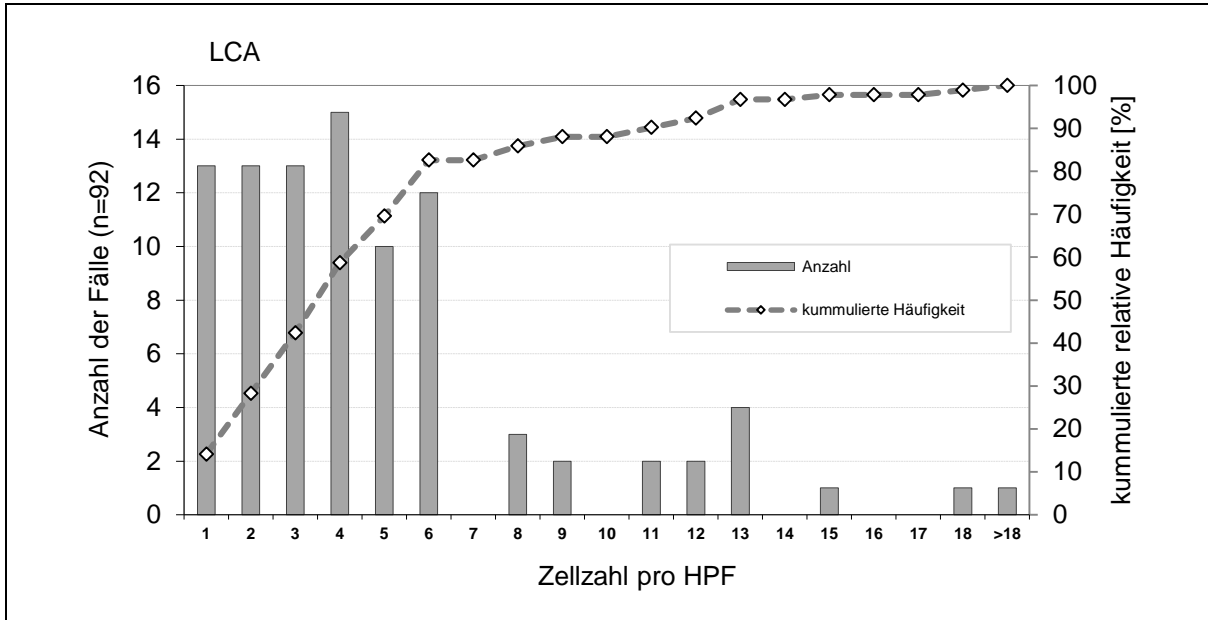
Die Leukozyteninfiltration, vornehmlich Lymphozyten und Makrophagen, weist in dem gesamten SIDS-Kollektiv (n=92) eine durchschnittliche Zellzahl von 4,54 Leukozyten/HPF mit einer Standardabweichung von  $\pm 4,85$  Zellen/HPF auf.



**Abb. 29:** Ergebnisdarstellung LCA für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=92)

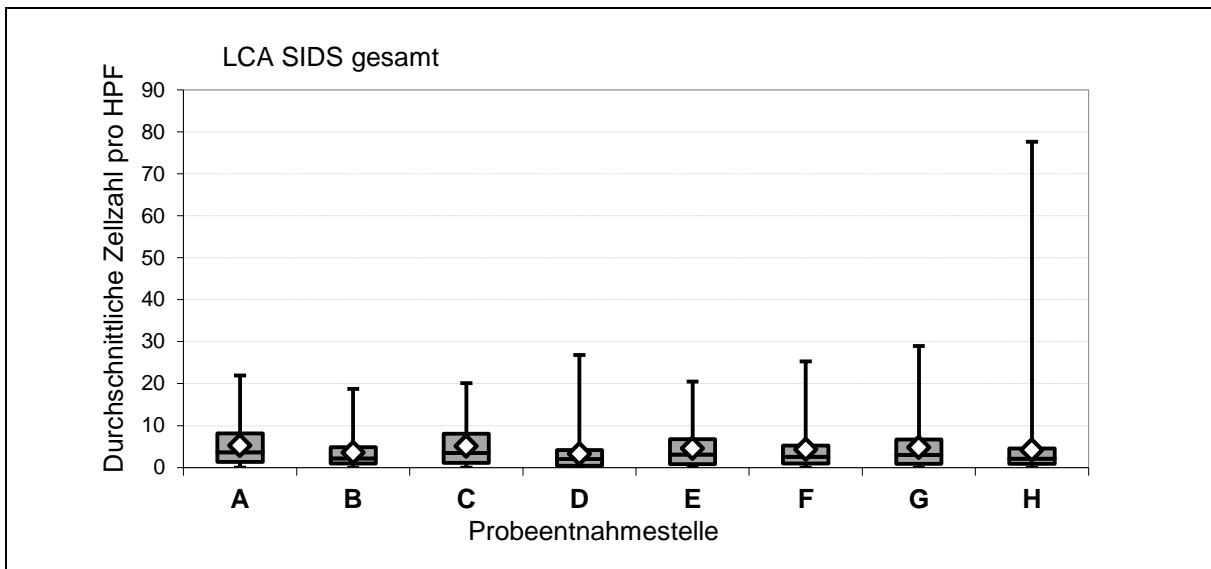


Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte, so zeigt sich für das gesamte SIDS-Kollektiv, dass 88,0 % der Fälle (81) durchschnittlich weniger als zehn Zellen/HPF aufweisen und ca. 69,6 % (64) weniger als fünf Zellen/HPF.

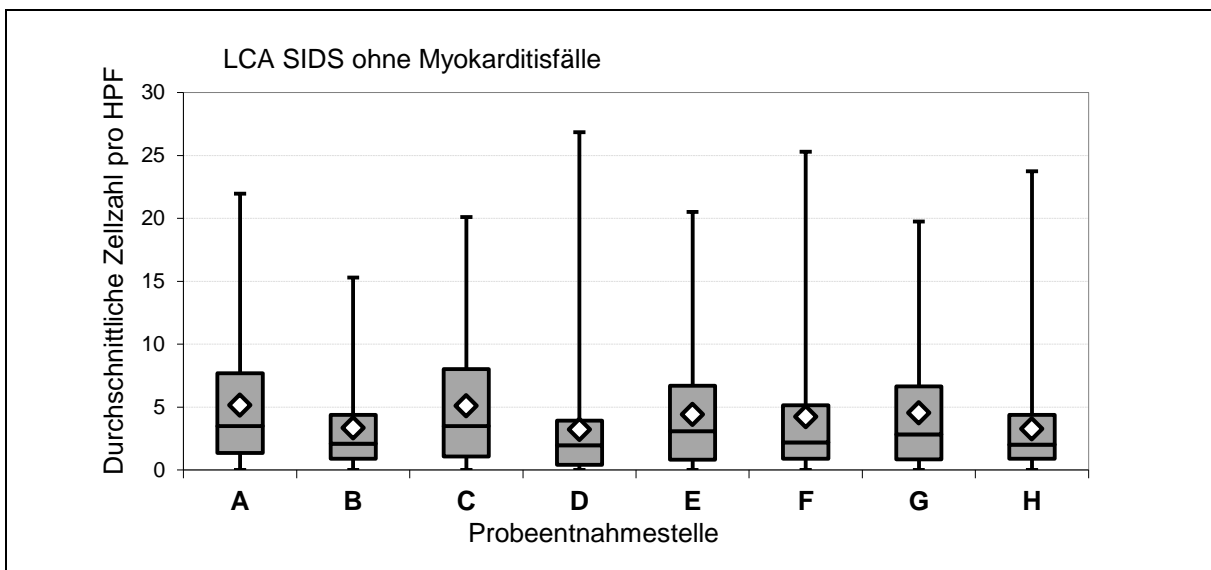


**Abb. 30:** Anzahl der Fälle bezogen auf die durchschnittliche Zellzahl pro HPF für LCA im gesamten SIDS-Kollektiv (n=92)

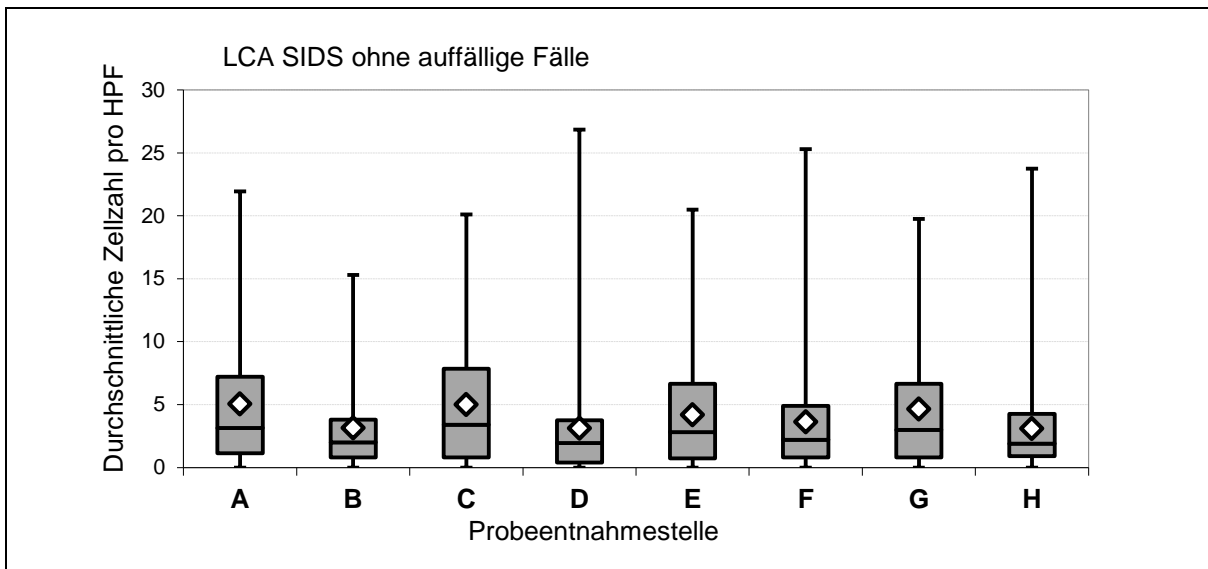
Die Verteilung der durchschnittlichen zellulären Infiltration auf die PES zeigt, dass keine homogene Verteilung, sondern eine fokale Häufung in einzelnen Bereichen des Herzens vorliegt. Es wurden durchschnittlich mehr Zellzahlen in den PES A und C (Herzkammerwand rechts basisnah und Septum interventrikuläre basisnah) mit einem Mittelwert von fünf Zellen/HPF gefunden. Diese Schwankungen zeigen sich allerdings bei Bereinigung des Kollektives um die Myokarditisfälle sowie um alle in HE auffälligen Fälle nicht so sehr (Abb. 34 und 35).



**Abb. 31:** Durchschnittliche Zellzahl/HPF (Mittelwert) für LCA für jede Probeentnahmestelle für SIDS gesamt (n=92)

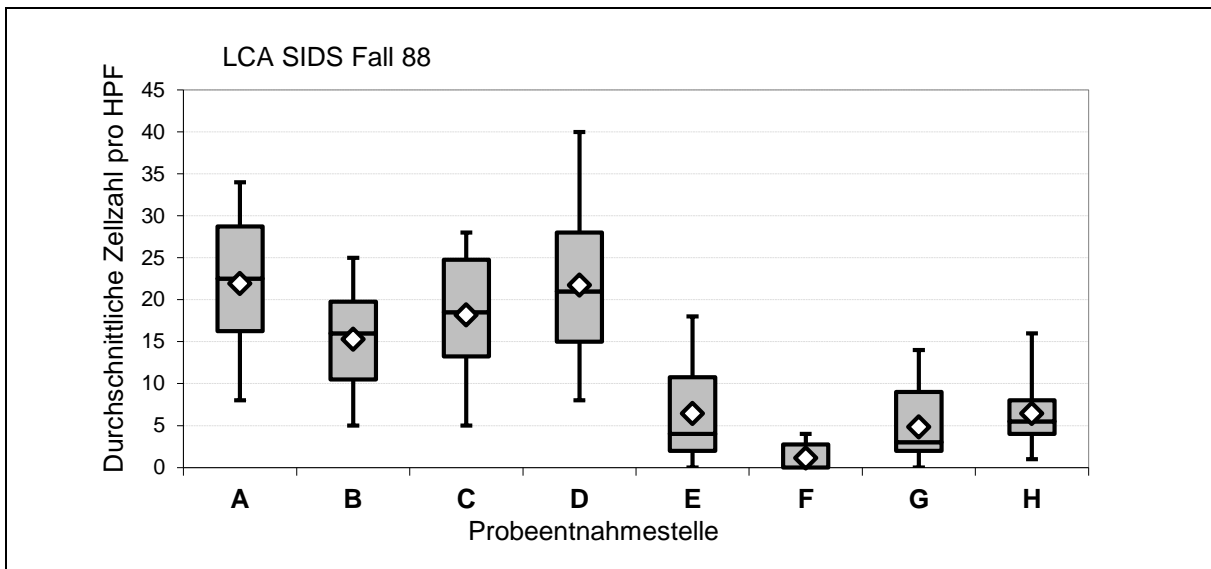


**Abb. 32:** Durchschnittliche Zellzahl/HPF (Mittelwert) für LCA für jede Probeentnahmestelle bereinigt um die Myokarditisfälle (n=90)

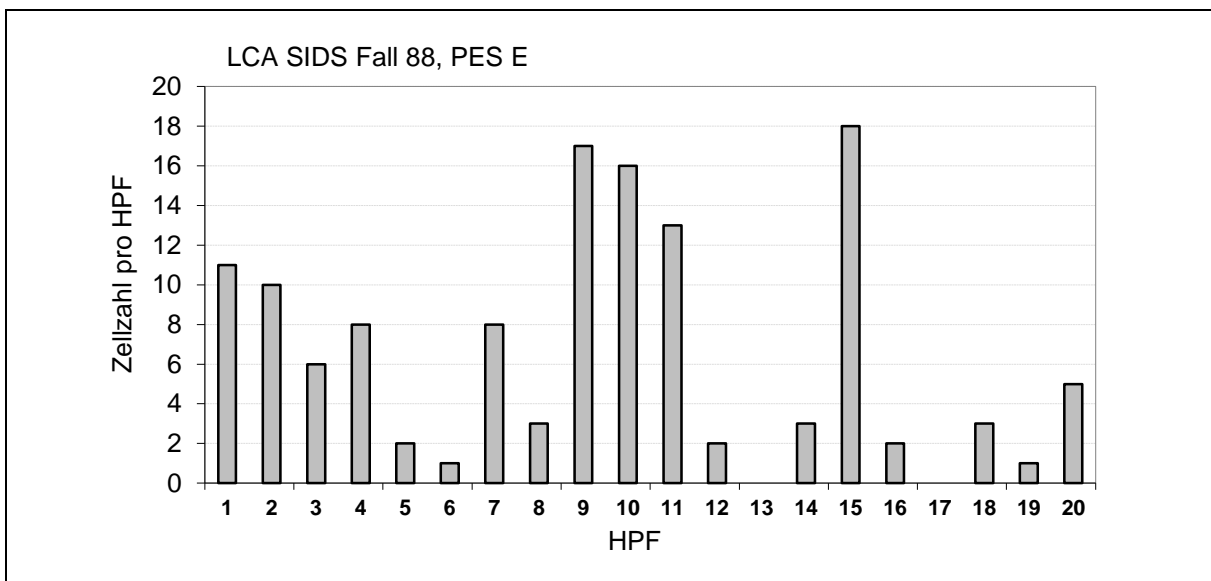


**Abb. 33:** Durchschnittliche Zellzahl/HPF (Mittelwert) für LCA für jede Probeentnahmestelle bereinigt um alle in HE auffälligen Fälle (n=83)

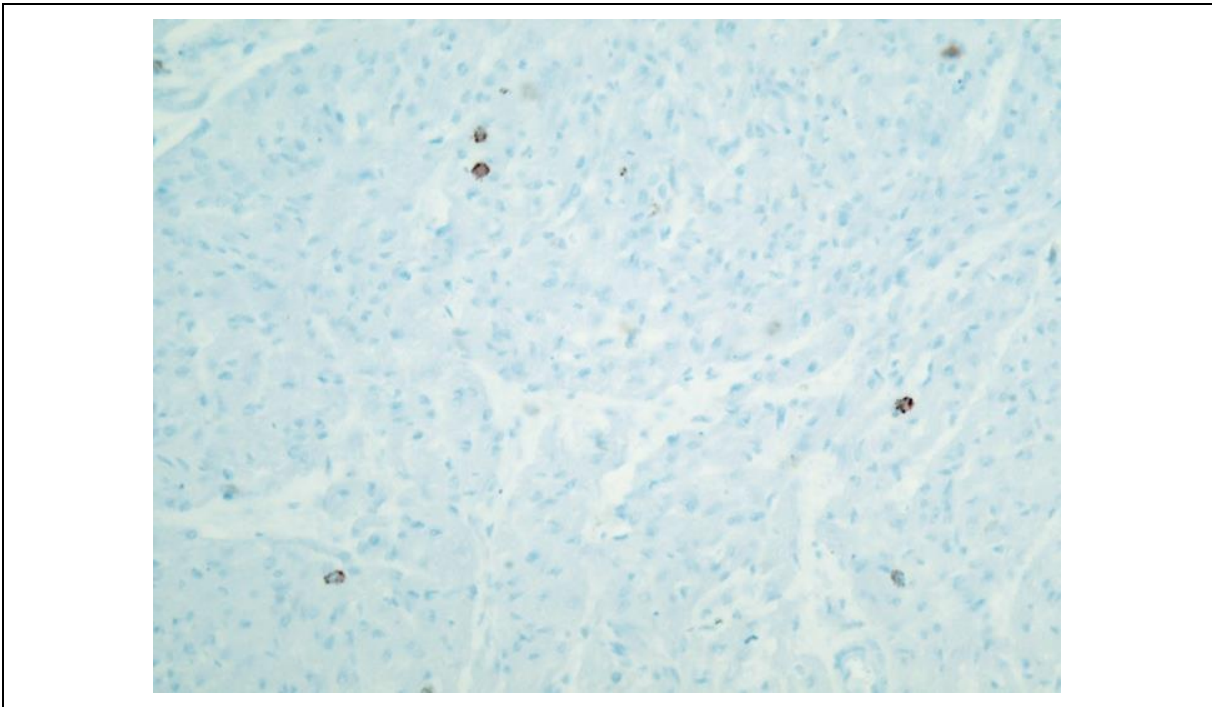
Die Datenauswertung der einzelnen Fälle ergab zum Teil erhebliche Schwankungen der Zellzahlen und Mittelwerte innerhalb eines Falles von PES zu PES, sowie innerhalb einer PES. Diese Schwankungen werden durch die Mittelwertbildung ausgeglichen und bei der graphischen Darstellung nicht sichtbar. In den folgenden Graphen ist dieses Problem anhand des Falles 88 dargestellt. Der Mittelwert beträgt 12,01 Zellen pro HPF. Durchschnittlich werden Mittelwerte von 1,1 Zellen/HPF in Probeentnahmestellen F bis 21,9 Zellen/HPF in Probeentnahmestelle A ermittelt. Dabei weisen die Gesichtsfelder der Probeentnahmestelle E Zellzahlen von 0- 18 auf. In der Hälfte der Probeentnahmestellen (PES A-D) liegt die durchschnittliche zelluläre Infiltration über 15 Leukozyten/HPF. In den anderen vier Probeentnahmestellen werden weniger als sieben Leukozyten/HPF gezählt.



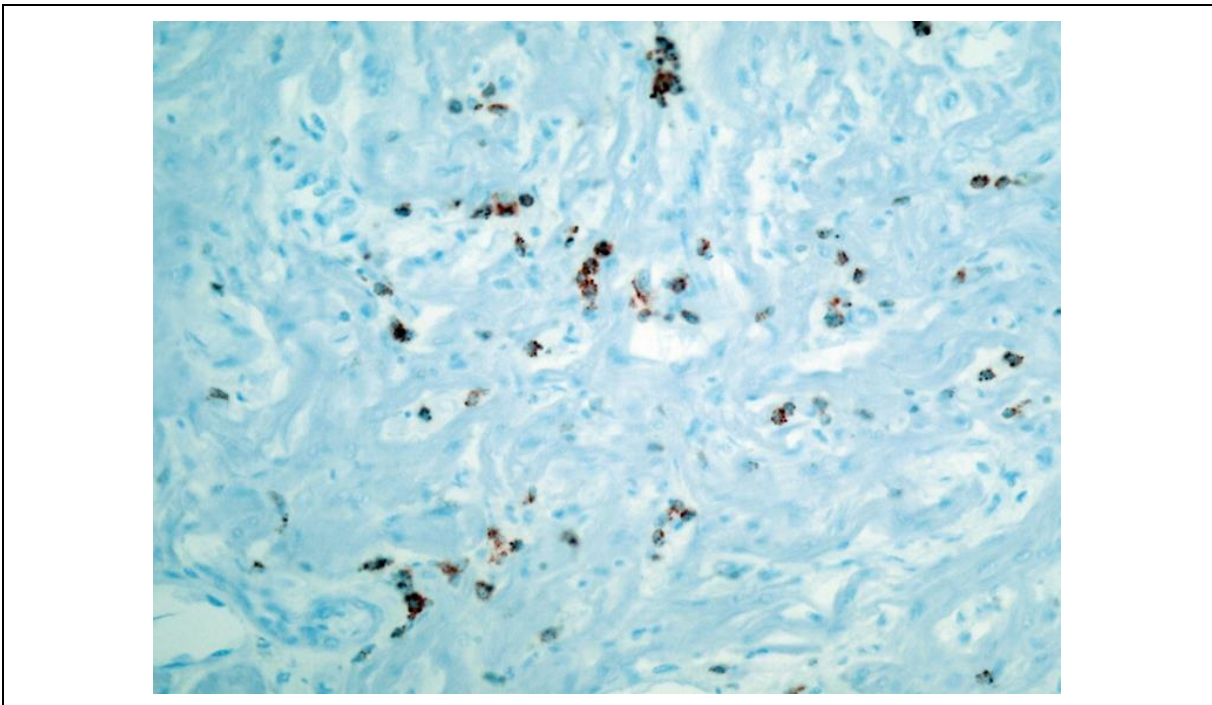
**Abb. 34:** Fall 88 durchschnittliche Zellzahl/HPF für LCA, Schwankungen unter den Probeentnahmestellen



**Abb. 35:** Fall 88, PES E: Darstellung der durchschnittlichen Zellzahl/HPF bei Auswertung von 20 HPFs: Schwankungen innerhalb der PES E: Minimum 0 Zellen/HPF, Maximum 18 Zellen/HPF



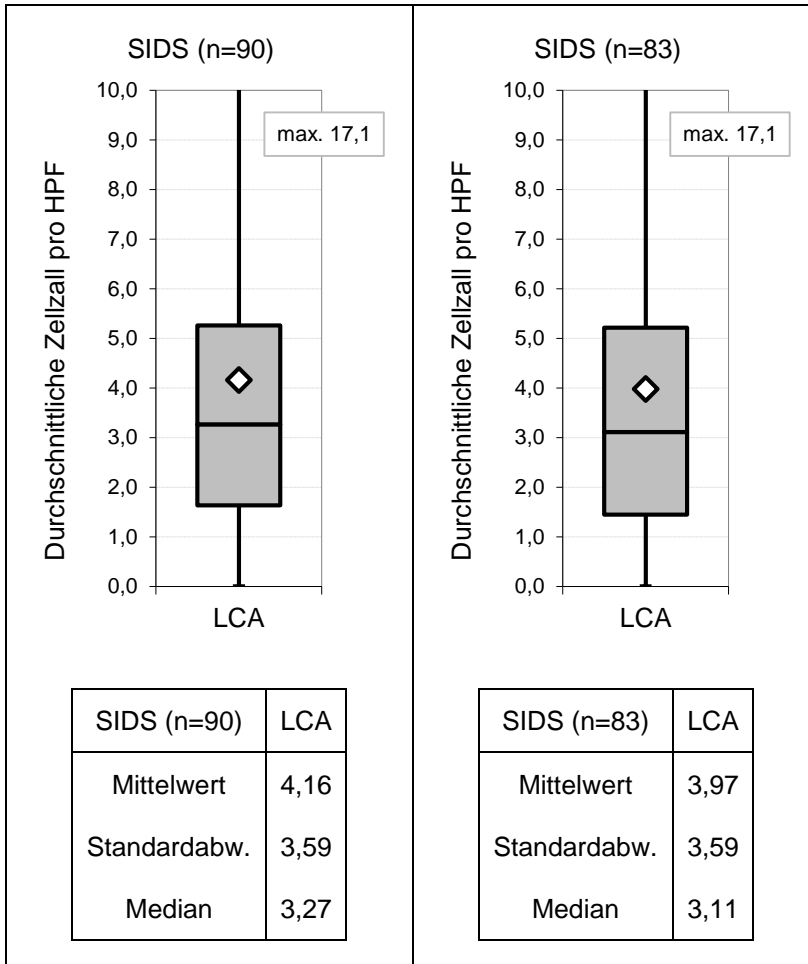
**Abb. 36:** Fall 88, LCA, E, HPF



**Abb. 37:** Fall 88, LCA, E, andere Stelle, HPF

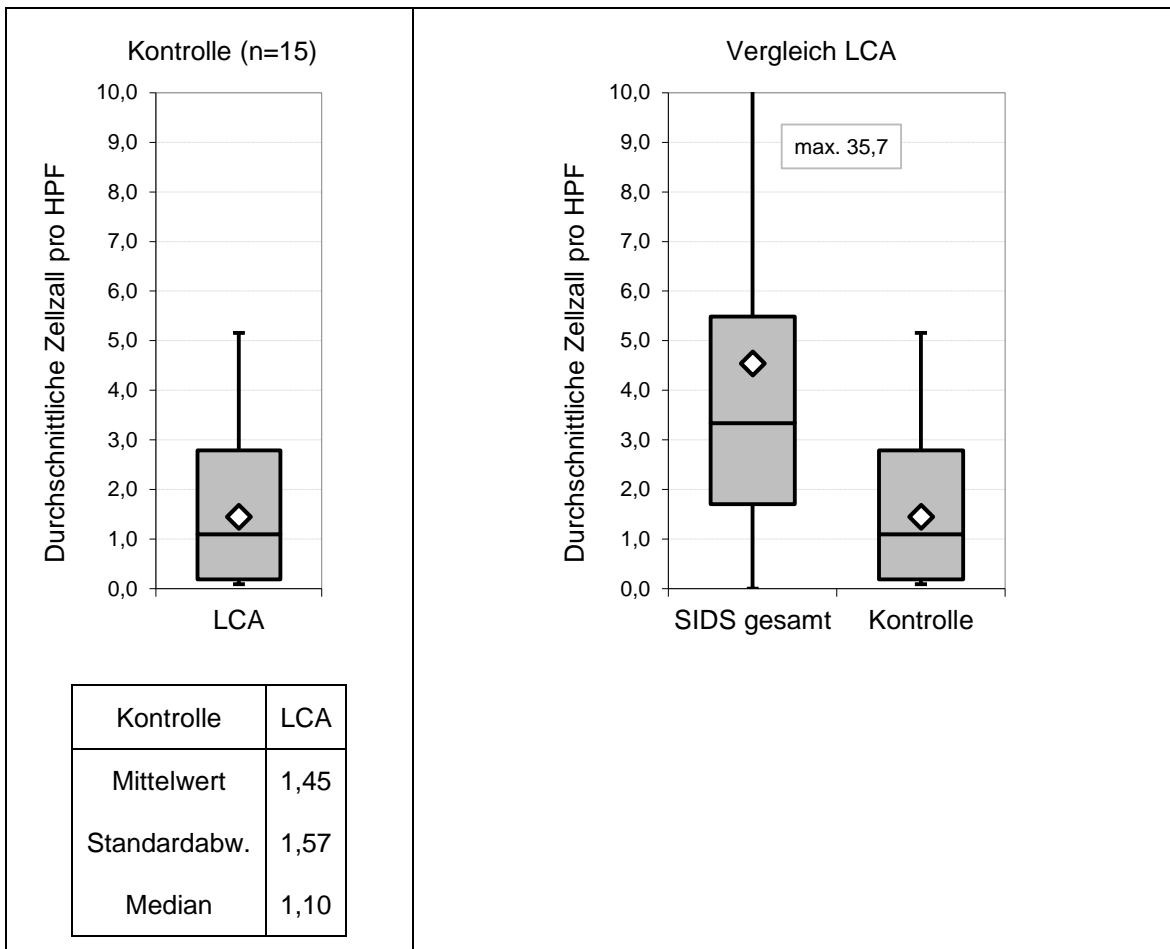
Werden in der Auswertung Fall 4 und 10, welche in der konventionellen Histologie die Dallas-Kriterien für eine Myokarditis erfüllen, herausgenommen ( $n=90$ ), ergibt sich ein Mittelwert von  $4,16 \pm 3,59$  Leukozyten/HPF. Werden nur die SIDS-Fälle betrachtet, die

keine Auffälligkeiten in der Histologie aufweisen (siehe Tab. 5) (n=83), so ergibt sich eine durchschnittliche Infiltration von  $3,97 \pm 3,59$  Leukozyten/HPF.



**Abb. 38:** Darstellung der durchschnittlichen Leukozytenzahl bereinigt um die Myokarditisfälle 4 und 10 sowie um die weiteren in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47)

Die Kontrollgruppe weist eine durchschnittliche Leukozyteninfiltration von  $1,45 \pm 1,57$  Zellen/HPF auf.



**Abb. 39:** Darstellung der durchschnittlichen Leukozytenzahl des Kontrollkollektivs (n=15) und Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl für SIDS und Kontrollgruppe

Ein statistisch signifikanter Unterschied zum Kontrollkollektiv besteht sowohl bei Betrachtung des Gesamtkollektiv als auch bei Betrachtung der selektiven Darstellungen (n=90 und n=83). Es handelt sich jedoch um eine Abweichung von nur drei Leukozyten/HPF bezogen auf das Gesamtkollektiv, 2,7 Lymphozyten/HPF ohne Betrachtung der Myokarditisfälle und 2,5 Leukozyten/HPF unter Ausschluss aller in HE auffälligen Fälle. Da für einen unverfälschten Vergleich der Gruppen nur die in der Histologie unauffälligen SIDS-Fälle herangezogen werden können, ergibt sich somit für diese eine durchschnittliche um 2,5 Zellen/HPF höhere Leukozyteninfiltration als in der Kontrollgruppe. Rein statistisch ist dies mit einem  $p=0,001$  signifikant, jedoch können zweieinhalb Zellen nicht als klinisch relevant angesehen werden. Insbesondere, da es keine hinreichenden Untersuchungen zu Referenzwerten über eine durchschnittliche Leukozyteninfiltration in

Säuglingsherzen gibt und auch keine eindeutigen Aussagen zu einer damit einhergehenden Pathologie getroffen werden (Krous et al., 2004).

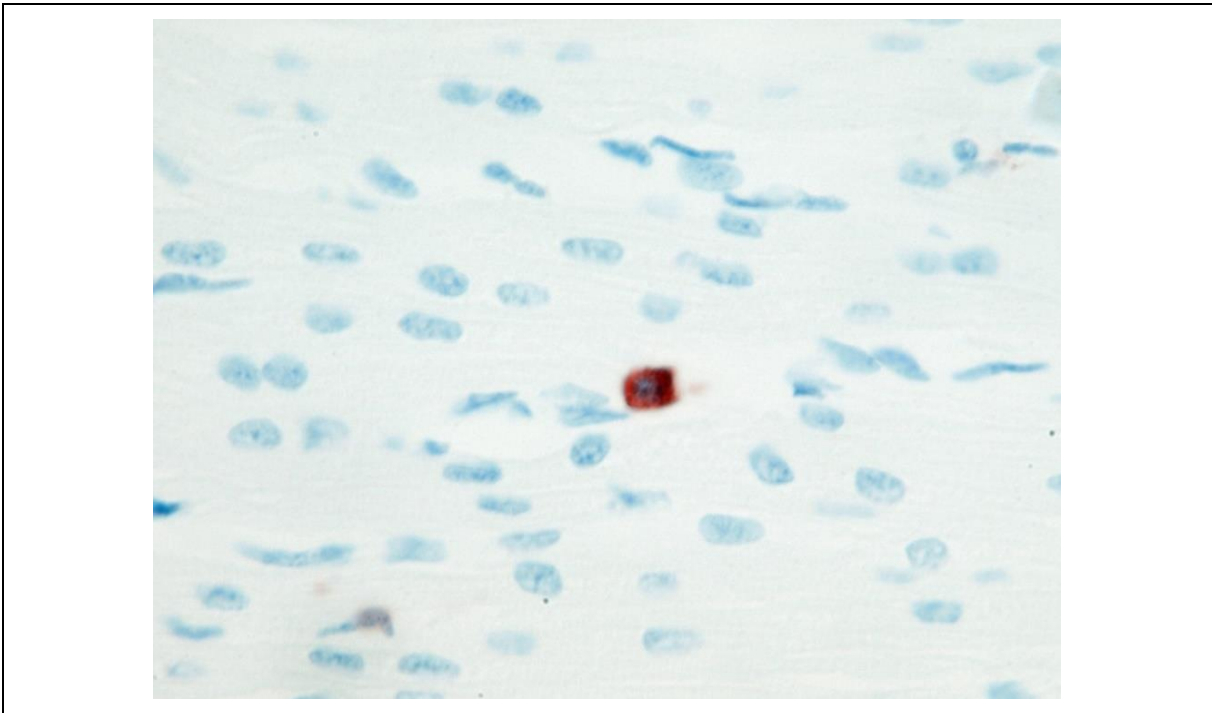
**Tab. 6:** Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv mittels Mann-Whitney-U-Test für nicht parametrische, unverbundene Stichproben

<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS gesamt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>LCA SIDS</td> <td>92</td> <td>58,23</td> <td>1079</td> </tr> <tr> <td>LCA Kontrolle</td> <td>15</td> <td>28,07</td> <td>301</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U	LCA SIDS	92	58,23	1079	LCA Kontrolle	15	28,07	301	<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS ohne Myokarditisf.</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>LCA SIDS</td> <td>90</td> <td>57,16</td> <td>1049</td> </tr> <tr> <td>LCA Kontrolle</td> <td>15</td> <td>28,07</td> <td>301</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U	LCA SIDS	90	57,16	1049	LCA Kontrolle	15	28,07	301
SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U																												
LCA SIDS	92	58,23	1079																												
LCA Kontrolle	15	28,07	301																												
SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U																												
LCA SIDS	90	57,16	1049																												
LCA Kontrolle	15	28,07	301																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-3,49054</td> <td>0,00048</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-3,49054	0,00048	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-3,4249</td> <td>0,0006</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-3,4249	0,0006																
Z	P																														
-3,49054	0,00048																														
Z	P																														
-3,4249	0,0006																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS bereinigt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>LCA SIDS</td> <td>83</td> <td>53,45</td> <td>959</td> </tr> <tr> <td>LCA Kontrolle</td> <td>15</td> <td>27,67</td> <td>295</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U	LCA SIDS	83	53,45	959	LCA Kontrolle	15	27,67	295																
SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U																												
LCA SIDS	83	53,45	959																												
LCA Kontrolle	15	27,67	295																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-3,23151</td> <td>0,00123</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-3,23151	0,00123																								
Z	P																														
-3,23151	0,00123																														

#### 4.4 T-Lymphozyten (CD45-R0)

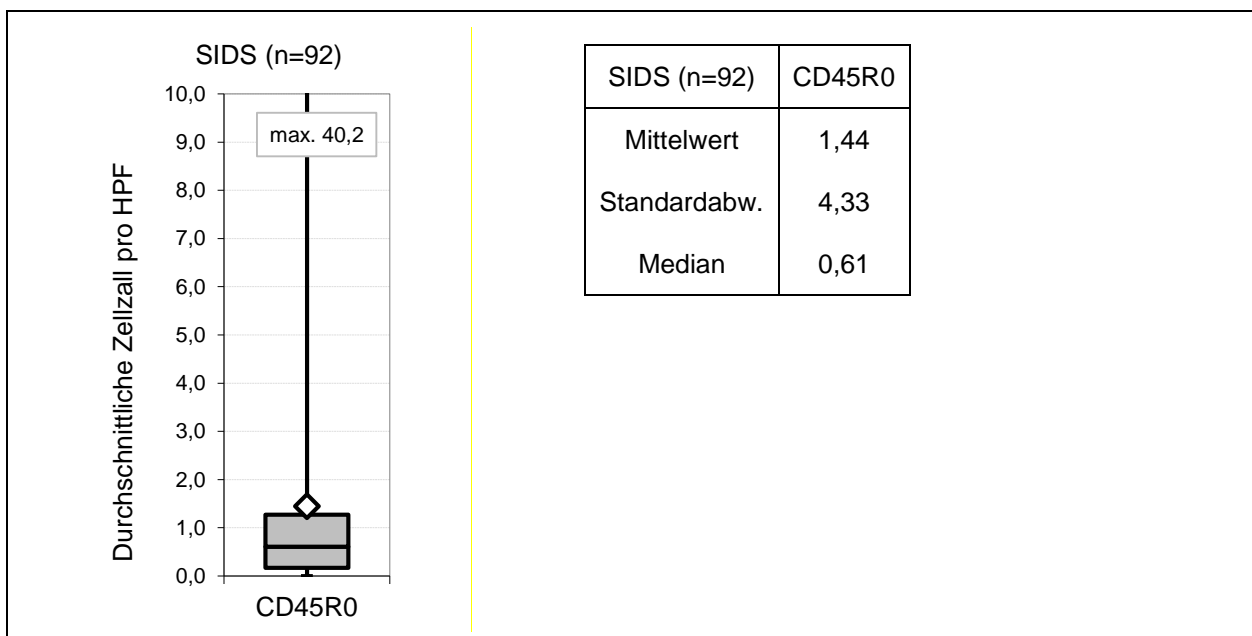
Über die Anfärbung des membranständigen Antigens CD45-R0 können Lymphozyten, hier vornehmlich aktivierte T-Gedächtniszellen, nachgewiesen werden.





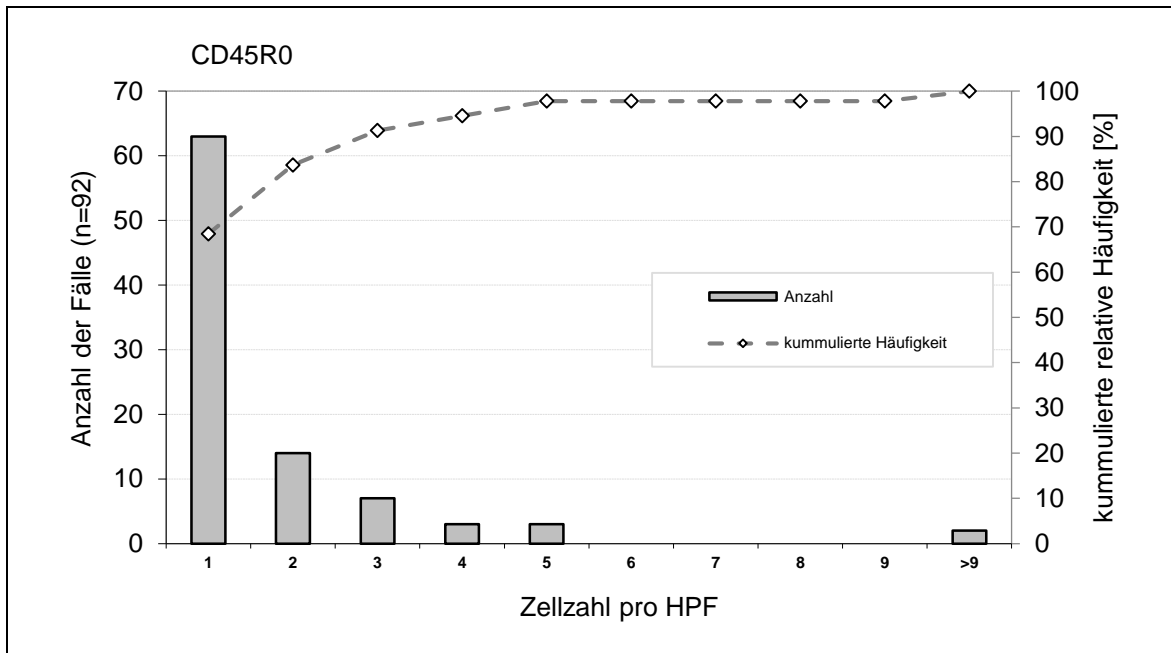
**Abb. 40:** Beispiel CD45-R0, 1000fache Vergrößerung

Die Auswertung der zellulären Infiltration von T-Lymphozyten ergibt für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=92) einen Mittelwert von  $1,44 \pm 4,33$  Zellen pro HPF.



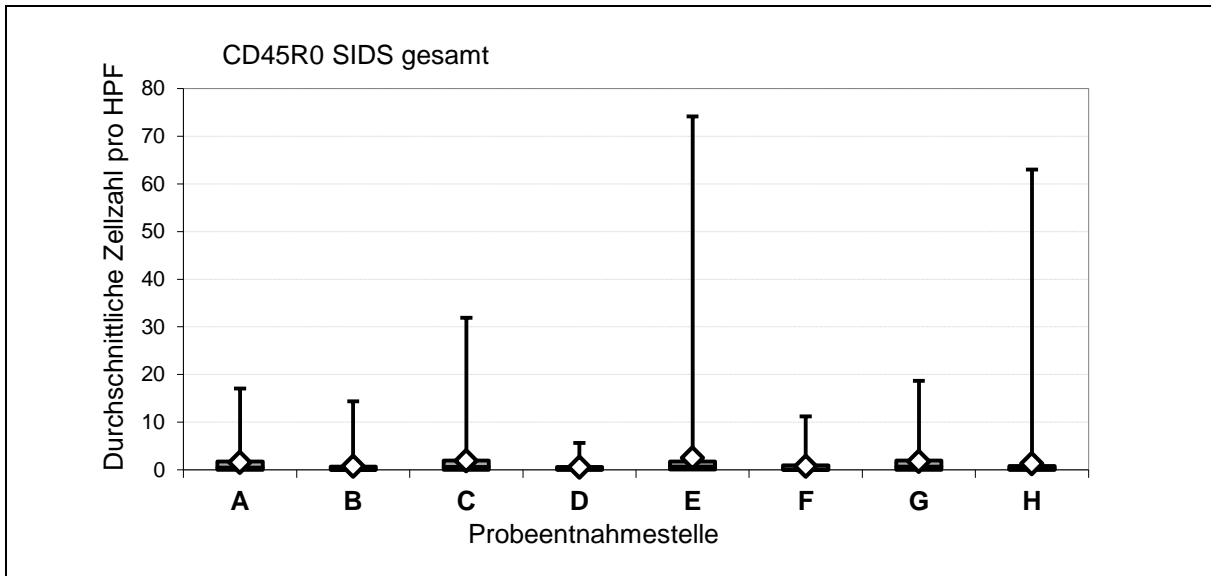
**Abb. 41:** Ergebnis der durchschnittlichen T-Lymphozyteninfiltration im SIDS-Kollektiv (n=92)

Die Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte zeigt, dass für das gesamte SIDS-Kollektiv 97,8 % der Fälle (90) durchschnittlich weniger als 5 Zellen pro HPF aufweisen und ca. 68,5 % (63) weniger als eine Zelle/HPF (Abb. 42).

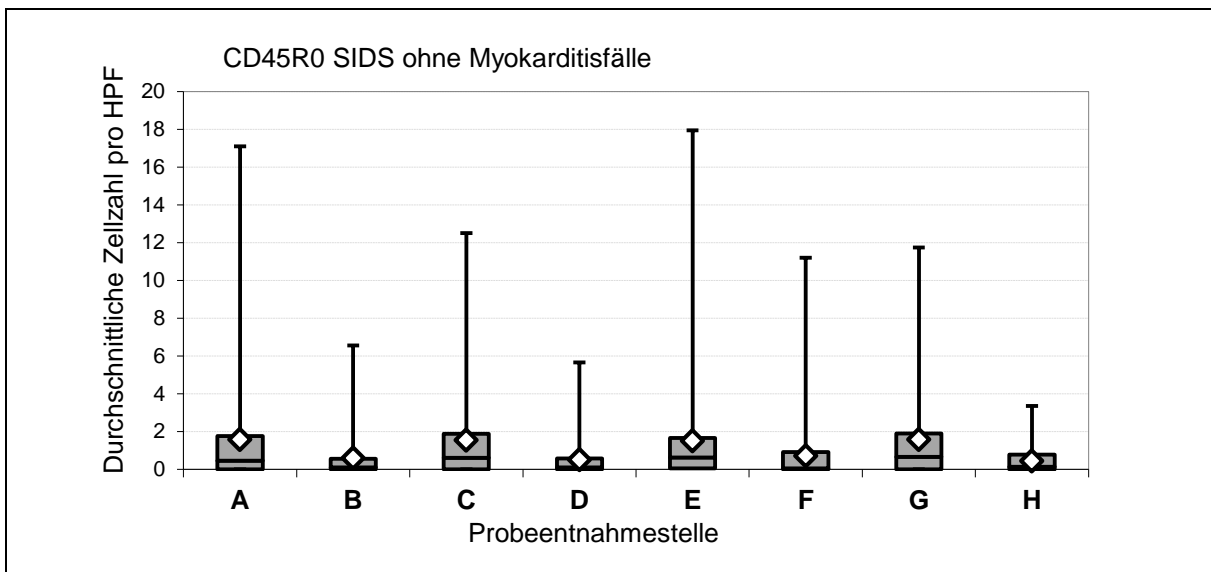


**Abb. 42:** Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte für das gesamte Kollektiv (n=92)

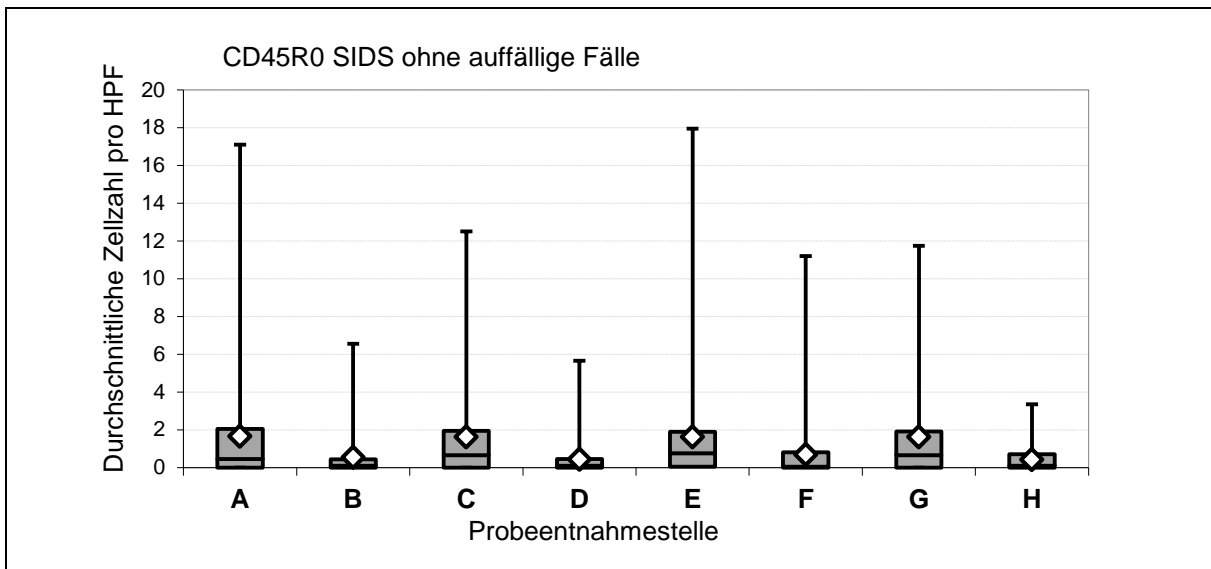
Bei der Betrachtung der Mittelwerte über die einzelnen Probeentnahmestellen liegt für CD45-R0 ähnlich wie bei LCA, jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt, eine tendenziell fokale Verteilung der Zellen im Herzen vor. Eine durchschnittlich höhere zelluläre Infiltration lässt sich in den Probeentnahmestellen A (Herzkammer rechts basisnah), C (Septum interventrikuläre basisnah), E (Vorderwand Herzkammer links basisnah) und G (Hinterwand linke Herzkammer basisnah) nachweisen, wobei keine statistische Signifikanz besteht ( $p > 0,05$ ). Die Folgenden Abbildungen (Abb. 43-45) zeigen die Mittelwerte verteilt über die acht Probeentnahmestellen für das Gesamtkollektiv und für jene unter Ausschluss der Myokarditisfälle (n=90) sowie aller in HE auffälligen Fälle (n=83). Auch hier zeigt sich keine wesentliche Änderung der Tendenz.



**Abb. 43:** Durchschnittliche Mittelwerte der Lymphozyten bezogen auf die acht PES für das gesamte Kollektiv (n=92)

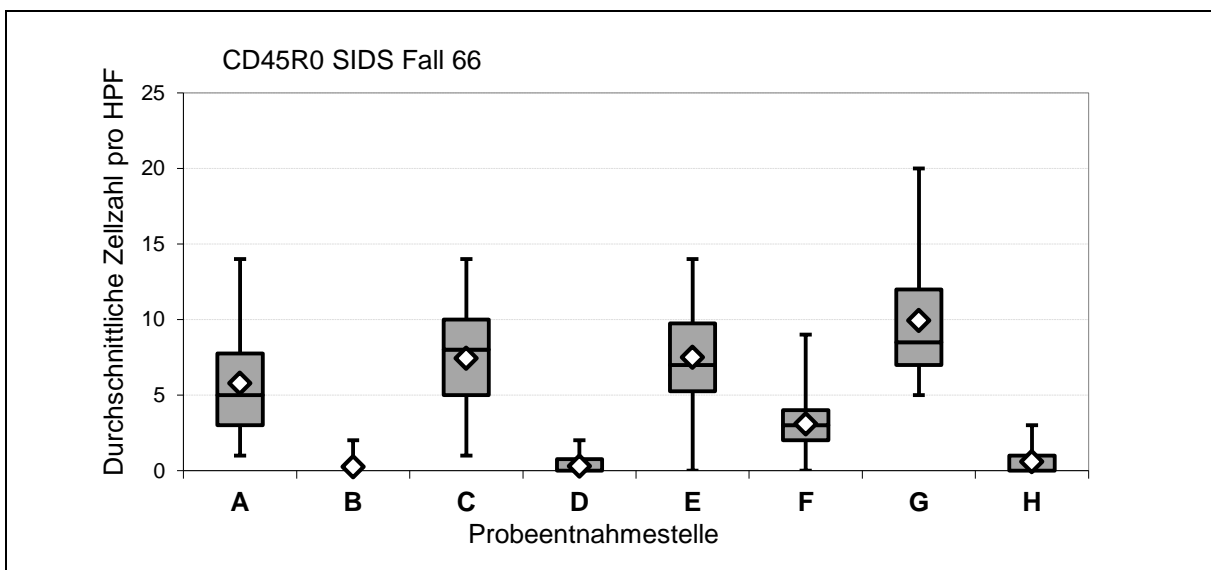


**Abb. 44:** Durchschnittliche Mittelwerte der Lymphozyten bezogen auf die acht PES für das um die Myokarditisfälle bereinigte Kollektiv (n=90)

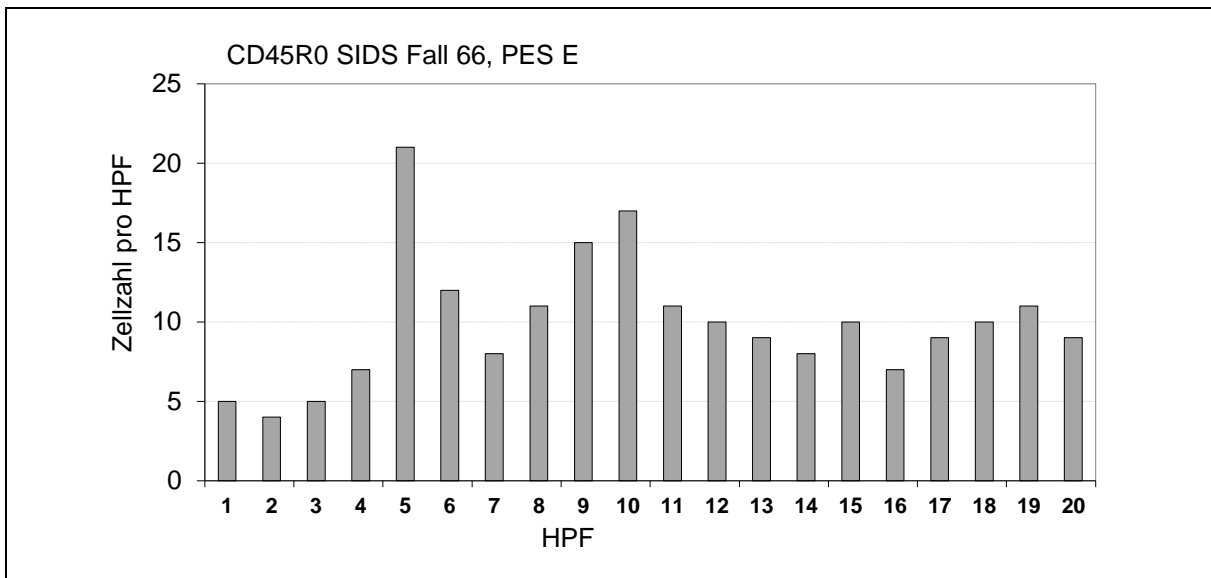


**Abb. 45:** Durchschnittliche Mittelwerte der Lymphozyten bezogen auf die acht PES für das um alle in HE auffälligen Fälle bereinigte Kollektiv (n=83)

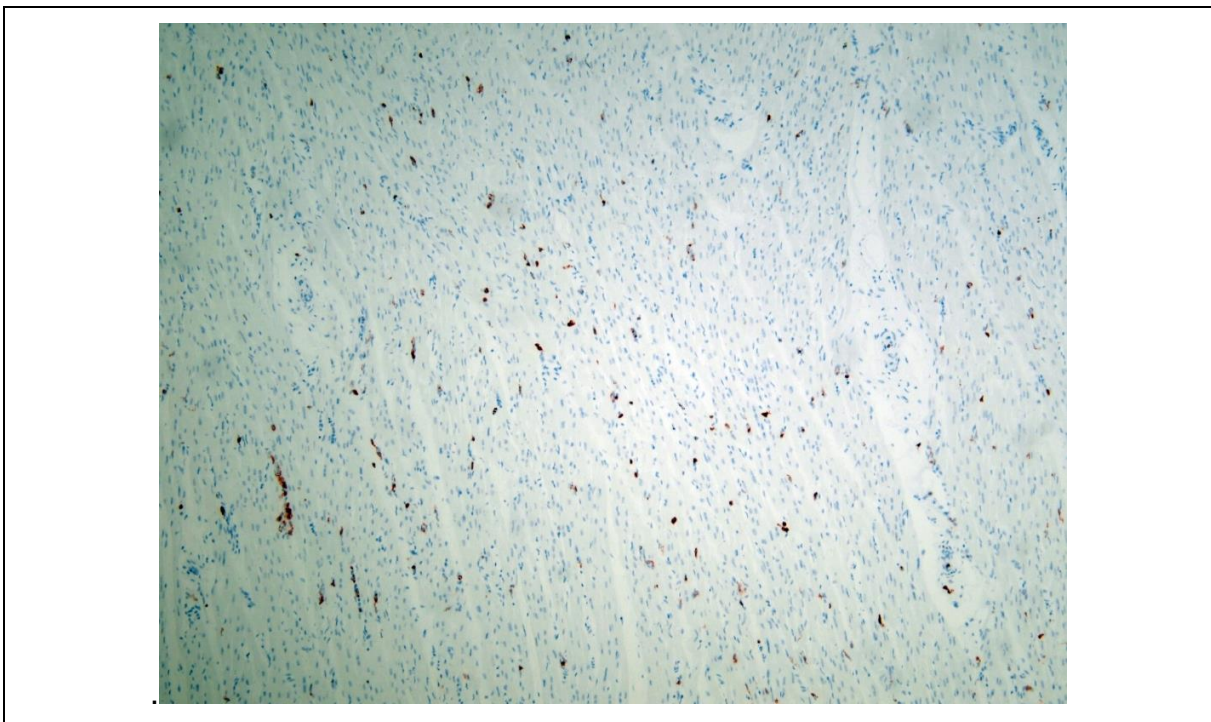
Für diese immunhistochemischen Marker zeigt sich ebenfalls zum Teil eine starke Schwankung der Zellzahlen von Probeentnahmestelle zu Probeentnahmestelle und innerhalb einer Probeentnahmestelle. In dem Fall 66 beträgt die durchschnittliche Zellzahl pro HPF 4,37. Betrachtet man jedoch die einzelnen Probeentnahmestellen, so finden sich Mittelwerte von minimal 1,4 bis maximal 9,9 Zellen/HPF (Abb. 46) mit Zellzahlen von 4- 21 in den einzelnen Gesichtsfeldern (Abb. 47). Die Hälfte der Gesichtsfelder weist darüber hinaus mehr als fünf Zellen/HPF auf.



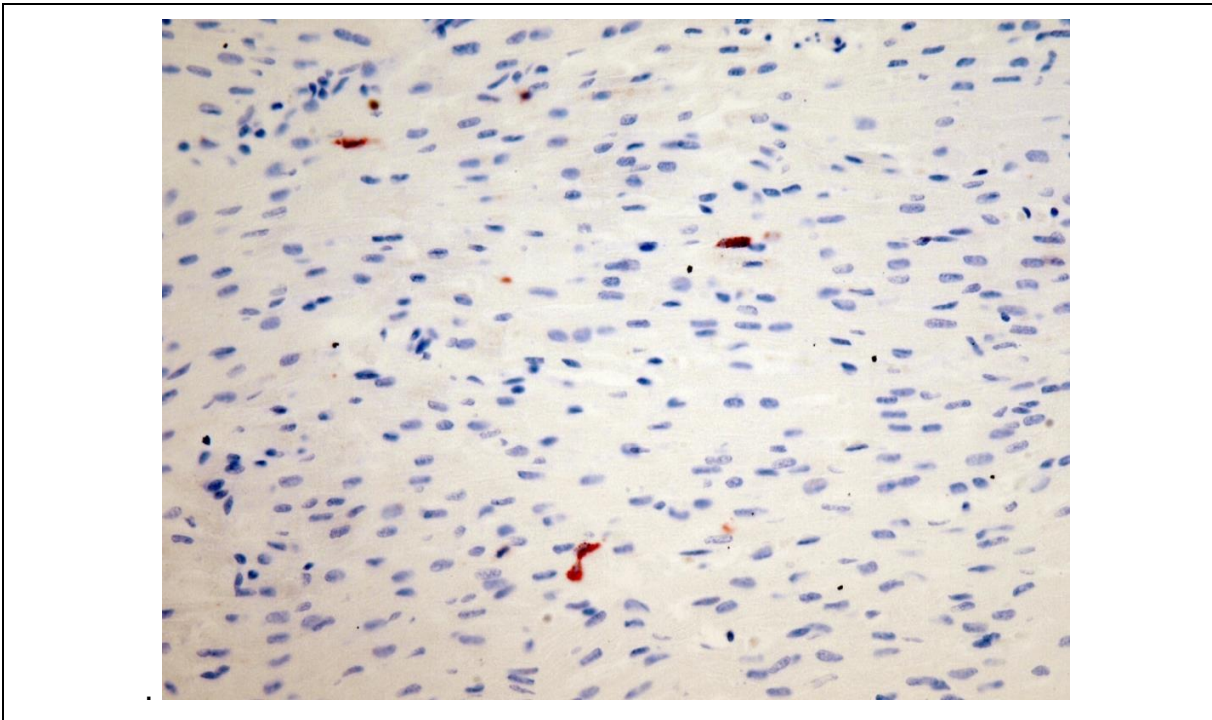
**Abb. 46:** Fall 66: Zellzahl/HPF für die acht PES A-H: deutliche Schwankung von PES zu PES und innerhalb einer PES



**Abb. 47:** Fall 66: durchschnittliche Zellzahl/HPF: Schwankungen innerhalb der PES E mit einem Minimum von 4 Zellen/HPF und einem Maximum von 21 Zellen

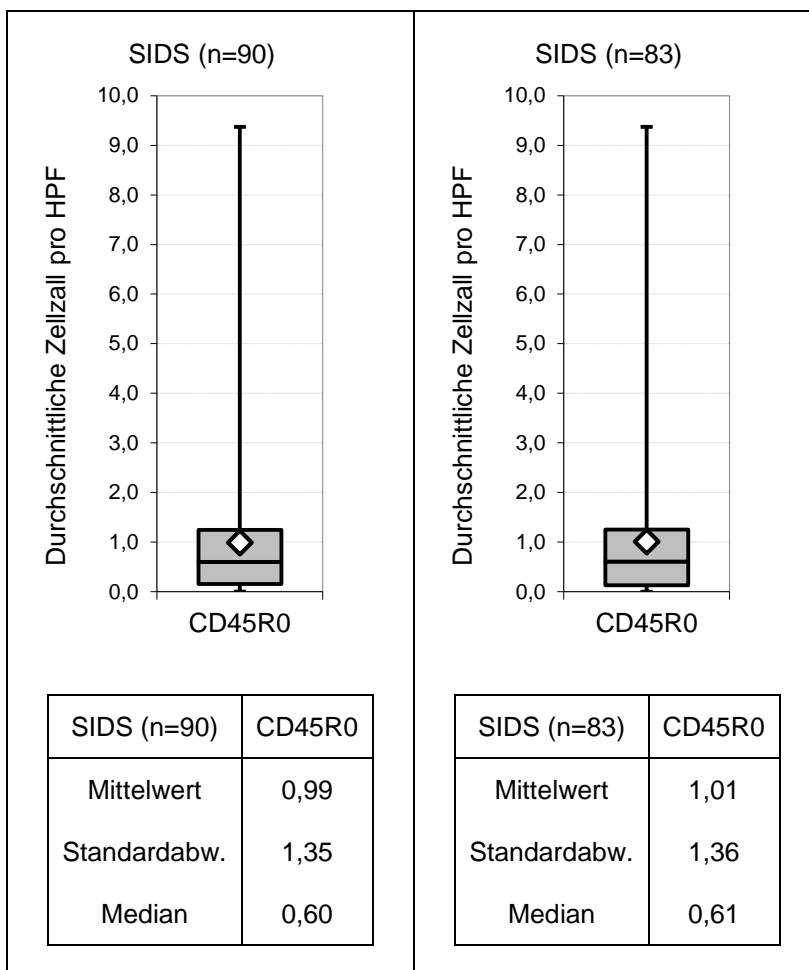


**Abb. 48:** Fall 66, CD45-R0, D, 100fache Vergrößerung



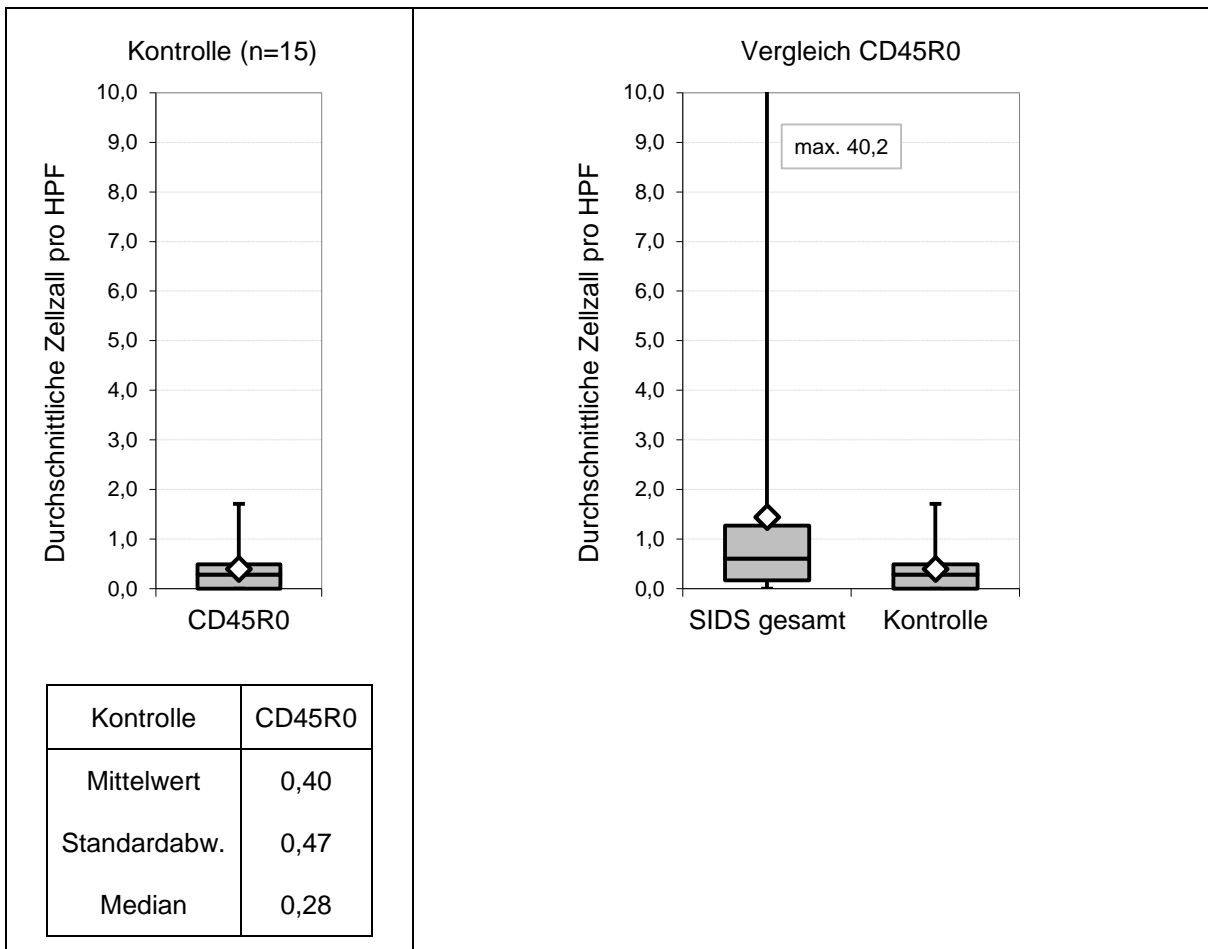
**Abb. 49:** Fall 66, CD45-R0, D, 400fache Vergrößerung

Ohne Berücksichtigung der Myokarditisfälle (n=90) werden durchschnittlich  $0,99 \pm 1,35$  T-Lymphozyten/HPF und bei ausschließlicher Betrachtung aller in HE unauffälligen SIDS-Fälle (n=83)  $1,01 \pm 1,36$  T-Lymphozyten/HPF nachgewiesen (Abb. 50).



**Abb. 50:** Darstellung der durchschnittlichen T-Lymphozytenzahl bereinigt um die Myokarditisfälle 4 und 10 sowie die weiteren in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47)

Das Kontroll-Kollektiv weist eine durchschnittliche lymphozytäre Infiltration von  $0,40 \pm 0,47$  Zellen/HPF auf (Abb. 51).



**Abb. 51:** Darstellung der durchschnittlichen Lymphozytenzahl des Kontrollkollektivs (n=15) und Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl für SIDS und Kontrollgruppe

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen zellulären Infiltration besteht auch für die Lymphozyten. Jedoch handelt es sich hier ebenfalls bei Betrachtung des Gesamtkollektivs um einen Unterschied von weniger als einer Zelle/HPF. Werden die Signifikanzen für das SIDS-Kollektiv ohne die Myokarditisfälle sowie ohne alle in HE auffälligen SIDS-Fälle ermittelt, ist der Unterschied noch geringer. Somit kann analog zu den Leukozyten, trotz vorhandener statistischer Signifikanz, nicht von einer klinischen Relevanz gesprochen werden (Tab. 7).

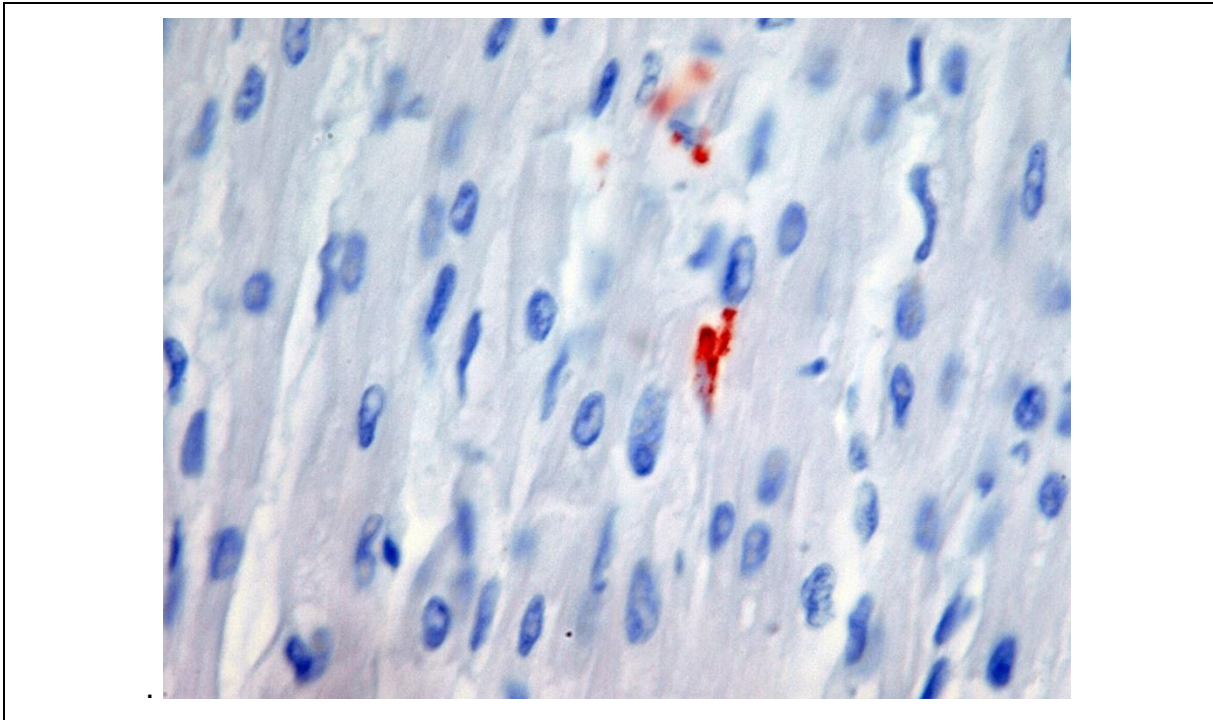


**Tab. 7:** Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv

<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS gesamt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD45R0 SIDS</td> <td>92</td> <td>56,65</td> <td>934</td> </tr> <tr> <td>CD45R0 Kontrolle</td> <td>15</td> <td>37,73</td> <td>446</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U	CD45R0 SIDS	92	56,65	934	CD45R0 Kontrolle	15	37,73	446	<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS ohne Myokarditisf.</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD45R0 SIDS</td> <td>90</td> <td>55,54</td> <td>904</td> </tr> <tr> <td>CD45R0 Kontrolle</td> <td>15</td> <td>37,73</td> <td>446</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U	CD45R0 SIDS	90	55,54	904	CD45R0 Kontrolle	15	37,73	446
SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U																												
CD45R0 SIDS	92	56,65	934																												
CD45R0 Kontrolle	15	37,73	446																												
SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U																												
CD45R0 SIDS	90	55,54	904																												
CD45R0 Kontrolle	15	37,73	446																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,191</td> <td>0,028</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,191	0,028	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,098</td> <td>0,036</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,098	0,036																
Z	P																														
-2,191	0,028																														
Z	P																														
-2,098	0,036																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS bereinigt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD45R0 SIDS</td> <td>83</td> <td>52,04</td> <td>833</td> </tr> <tr> <td>CD45R0 Kontrolle</td> <td>15</td> <td>35,47</td> <td>412</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U	CD45R0 SIDS	83	52,04	833	CD45R0 Kontrolle	15	35,47	412																
SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U																												
CD45R0 SIDS	83	52,04	833																												
CD45R0 Kontrolle	15	35,47	412																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,078</td> <td>0,038</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,078	0,038																								
Z	P																														
-2,078	0,038																														

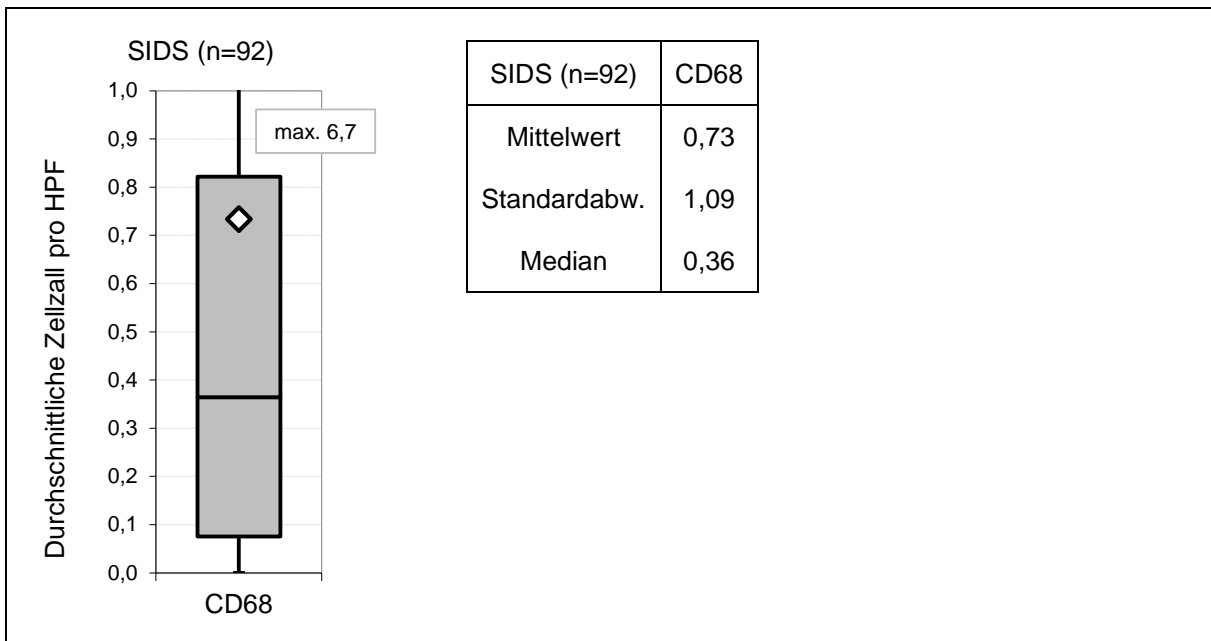
#### 4.5 Makrophagen (CD68)

Mit Hilfe des membranständigen Antigen CD68 werden, wie in Kapitel 3.2.3.3 bereits beschrieben, Makrophagen nachgewiesen.

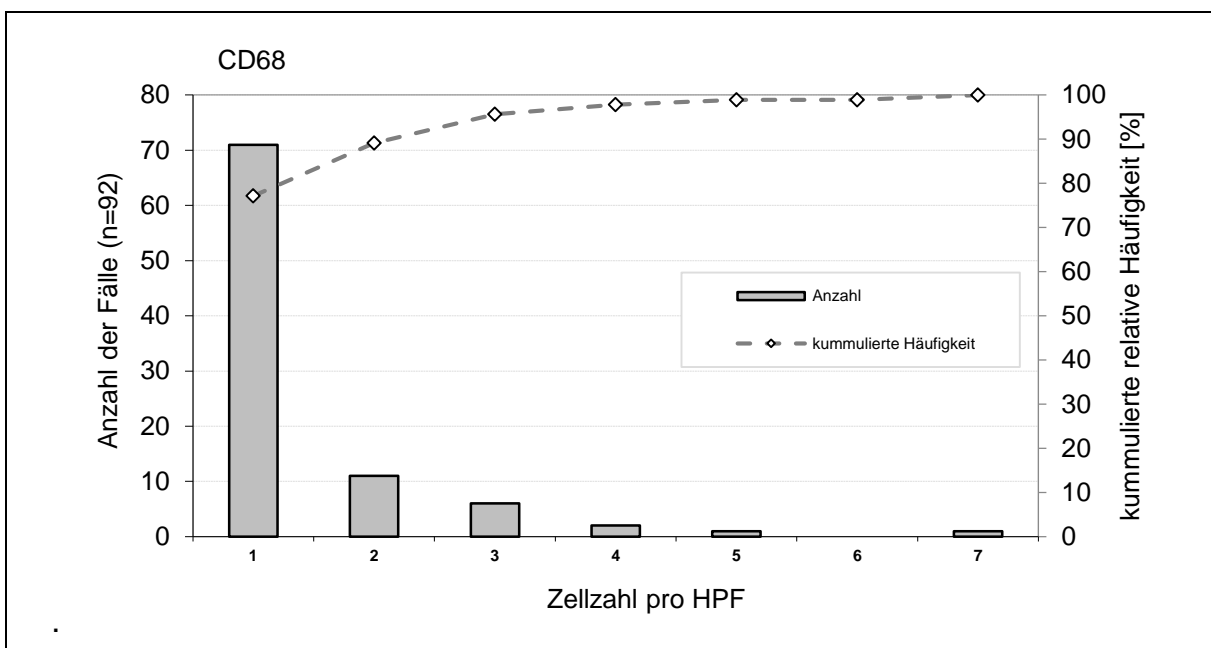


**Abb. 52:** Beispiel CD68, 1000fache Vergrößerung

Für die Makropagen kann ein Mittelwert für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=92) von  $0,73 \pm 1,09$  Zellen/HPF ermittelt werden (Abb. 53). Rund 77,2 % der 92 SIDS-Fälle weisen Zellzahlen kleiner einer Zelle/HPF auf (Abb. 54).



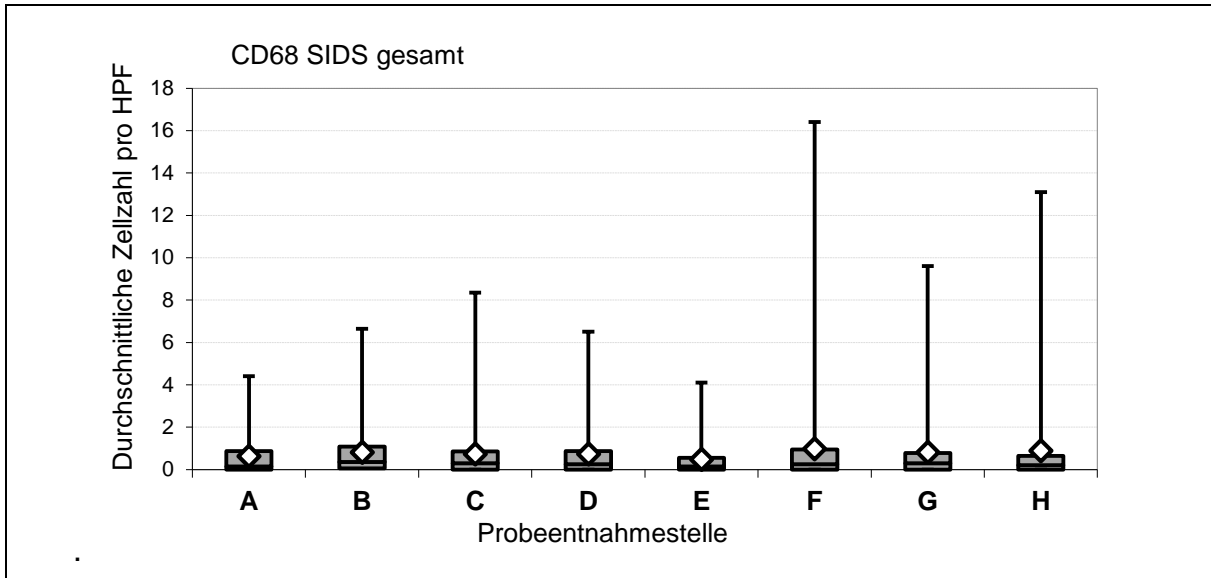
**Abb. 53:** Darstellung der durchschnittlichen Makrophageninfiltration im SIDS-Kollektiv (n=92)



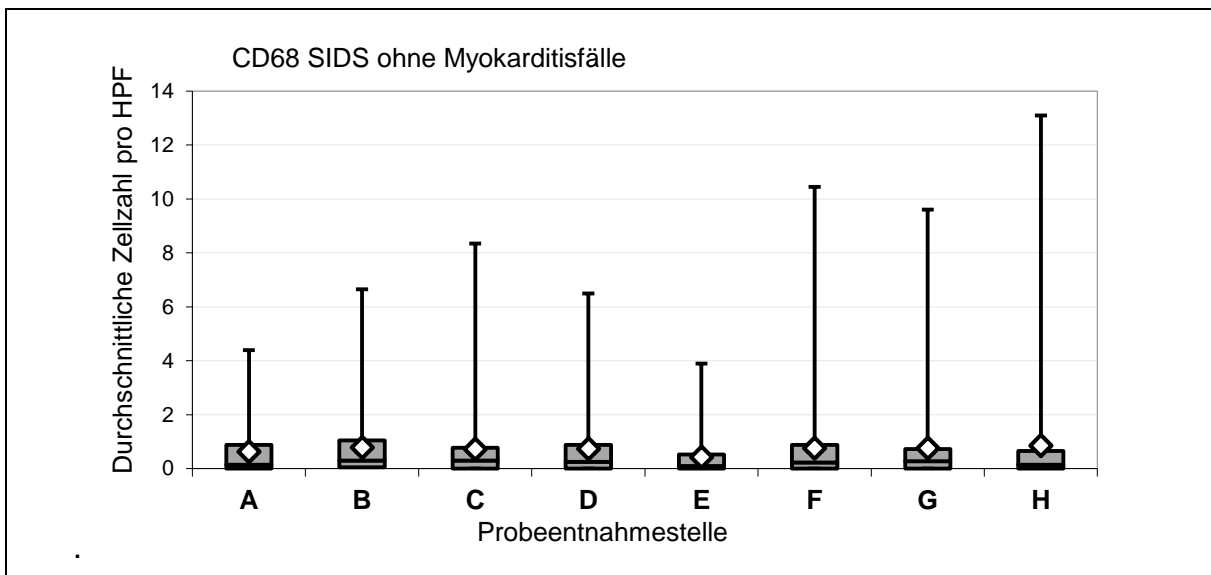
**Abb. 54:** Häufigkeitsverteilung CD68 des gesamten SIDS-Kollektives: 77,2 % weisen eine oder weniger Zellen/HPF auf

Die durchschnittliche zelluläre Infiltration über die acht Probeentnahmestellen ist sehr gleichmäßig und zeigte keine Prävalenz einer Herzregion an, auch bei selektiver Darstellung unter Ausschluss der Myokarditisfälle sowie aller in HE auffälligen Fälle (Abb. 55-57). Auch Schwankungen der Zellzahl von PES zu PES sowie innerhalb einer PES

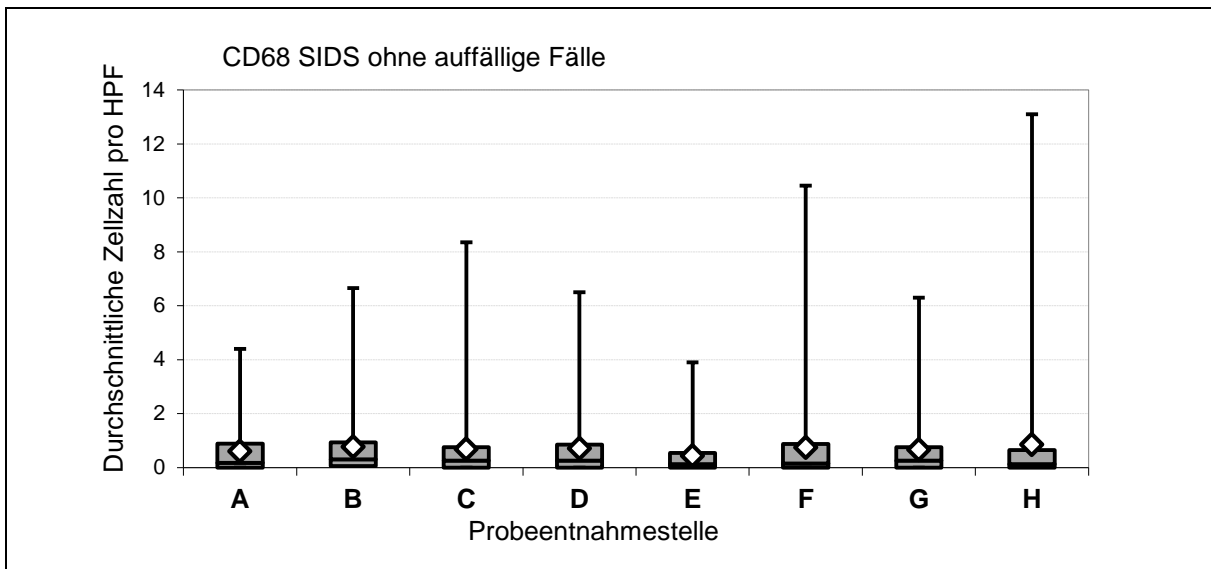
finden sich nicht so häufig wie bei den zuvor genannten immunhistochemischen Markern LCA und CD45-R0.



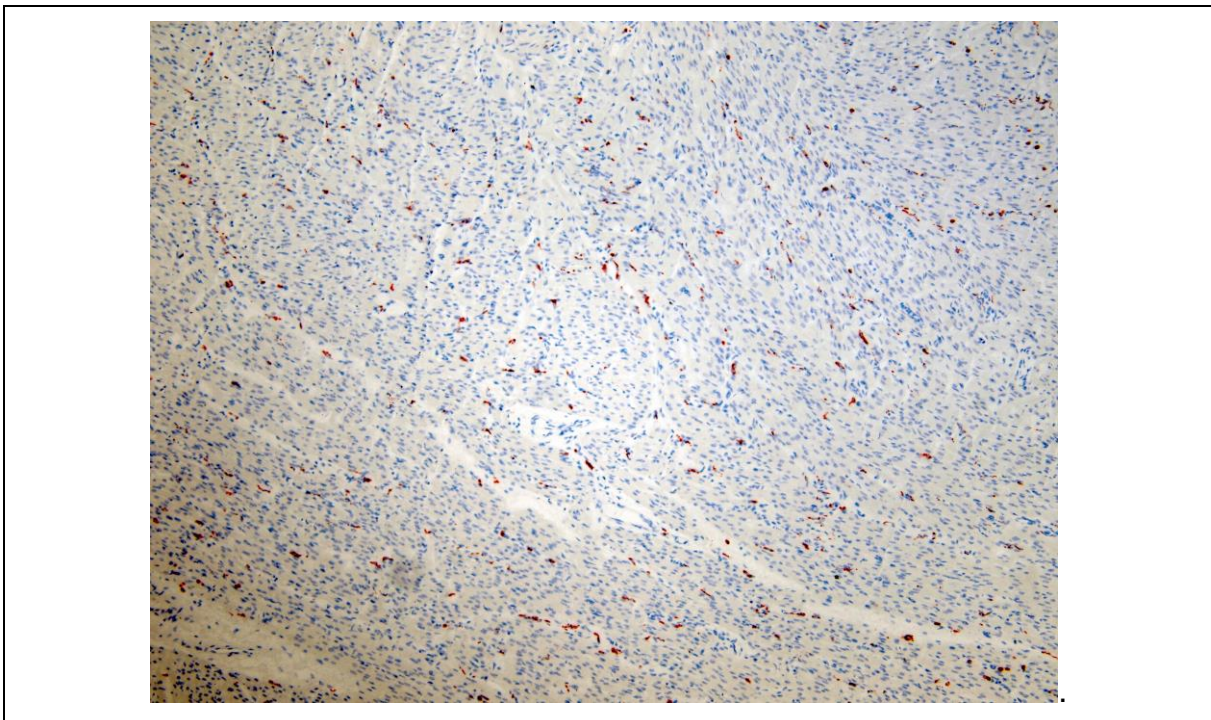
**Abb. 55:** Durchschnittliche Zellzahl/HPF des gesamten Kollektivs für CD68 über die acht PES (n=92)



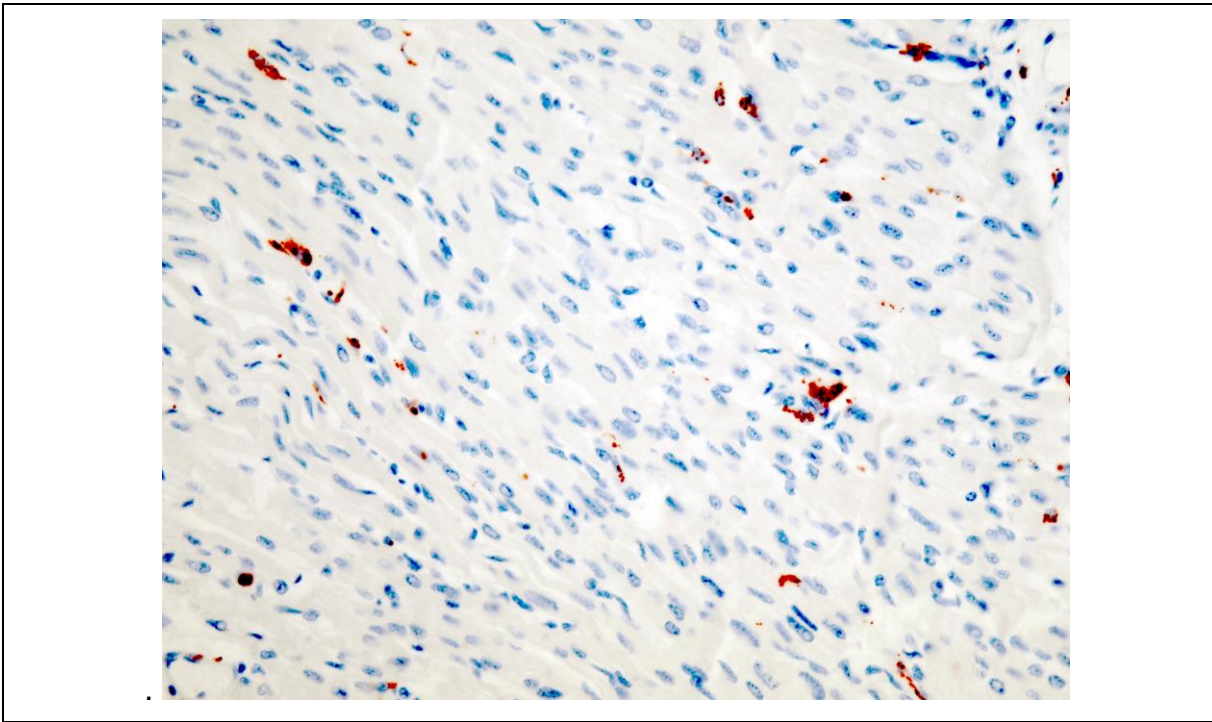
**Abb. 56:** Durchschnittliche Zellzahl/HPF des um die Myokarditisfälle bereinigte Kollektiv für CD68 über die acht PES (n=90)



**Abb. 57:** Durchschnittliche Zellzahl/HPF des um alle in HE auffälligen Fälle bereinigte Kollektiv für CD68 über die acht PES (n=83)

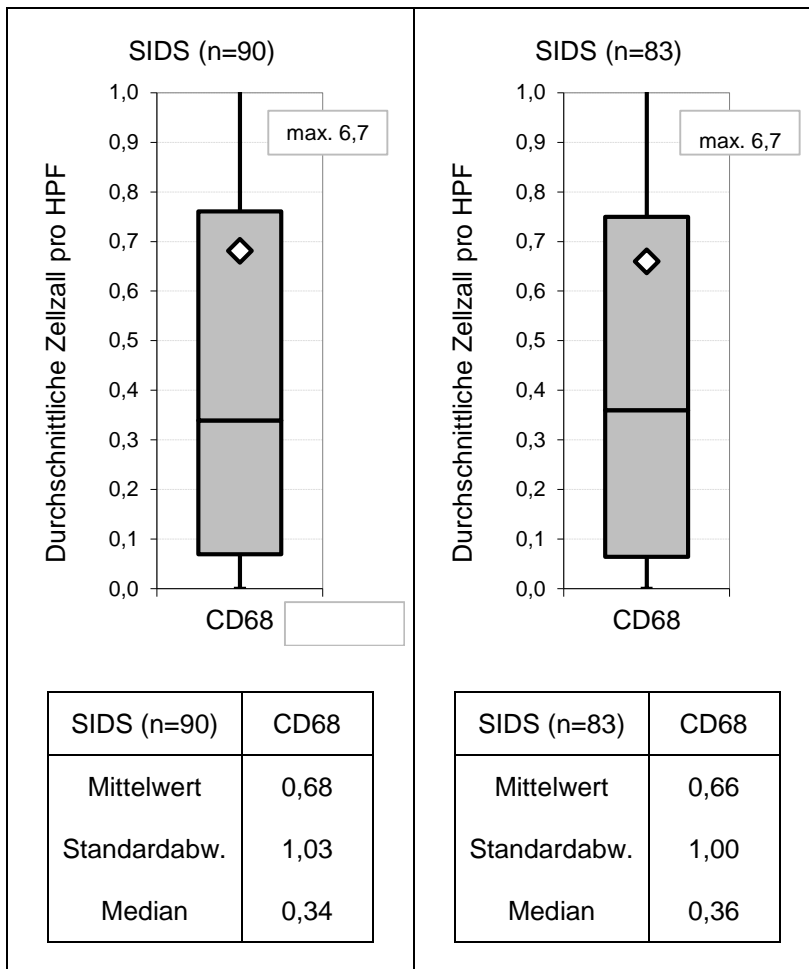


**Abb. 58:** Fall 39, CD68, A, 100fache Vergrößerung



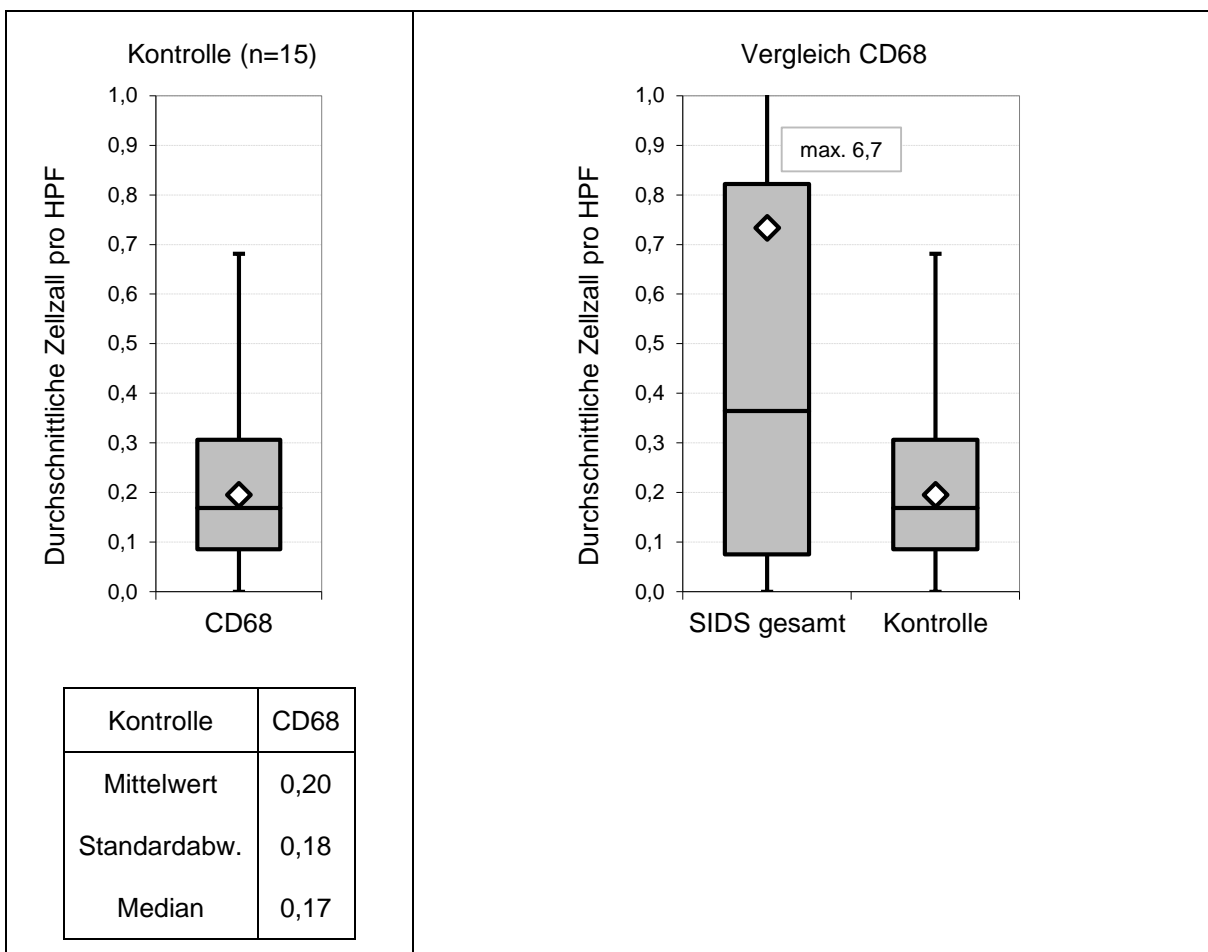
**Abb. 59:** Fall 39,CD68, A, 400fache Vergrößerung

Werden die beiden Myokarditisfälle herausgenommen (n=90), so ergibt sich ein Mittelwert von  $0,68 \pm 1,03$  Makrophagen/HPF und ohne Betrachtung aller in HE auffälligen Fälle (n=83) von  $0,66 \pm 1,00$  Makrophagen/HPF (Abb. 60).



**Abb. 60:** Darstellung der durchschnittlichen Makrophageninfiltration bereinigt um die Myokarditisfälle 4 und 10 sowie die weiteren in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47)

In der Kontrollgruppe werden durchschnittlich  $0,20 \pm 0,18$  Makrophagen/HPF nachgewiesen (Abb. 61).



**Abb. 61:** Darstellung der durchschnittlichen Makrophageninfiltration des Kontrollkollektivs (n=15) und Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl für SIDS und Kontrollgruppe

Eine statistische Signifikanz lässt sich sowohl für das gesamte SIDS-Kollektiv als auch unter Verwerfung der beiden Myokarditisfälle sowie aller in HE auffälligen Fälle berechnen. Jedoch beträgt der Unterschied lediglich eine halbe Zelle/HPF und kann somit als klinisch irrelevant gewertet werden (Tab. 8).

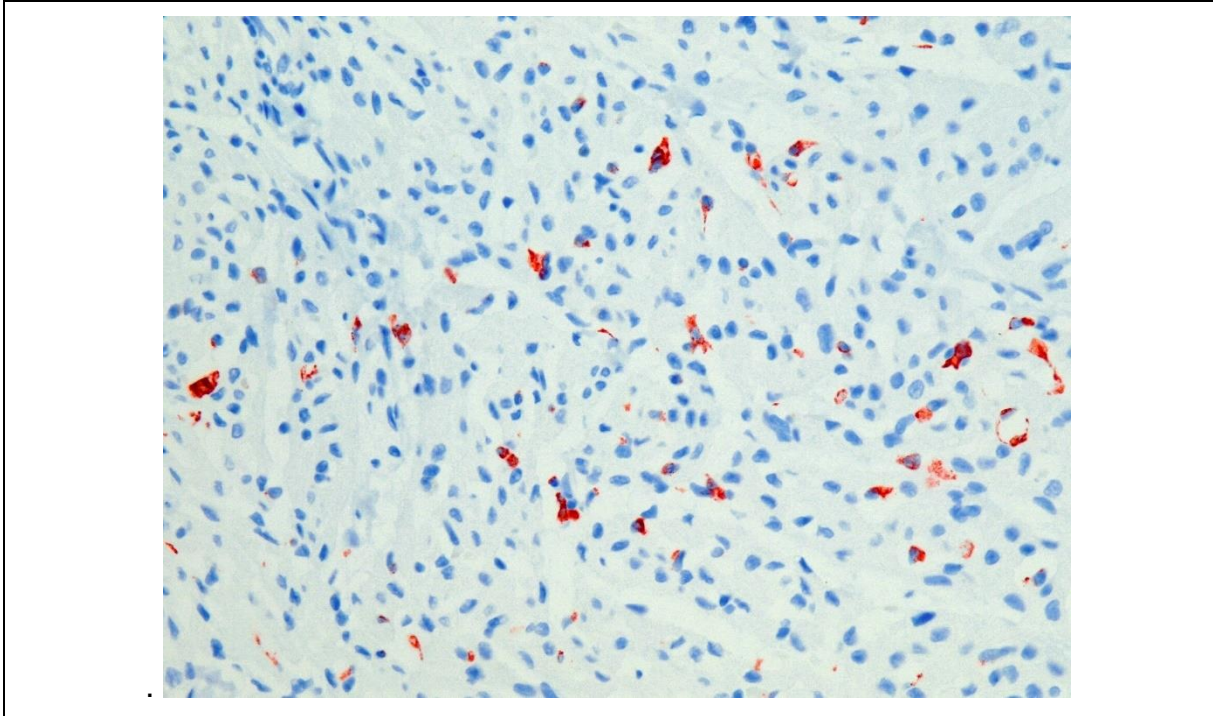


**Tab. 8:** Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv

<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS gesamt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD68 SIDS</td> <td>92</td> <td>56,83</td> <td>950</td> </tr> <tr> <td>CD68 Kontrolle</td> <td>15</td> <td>36,67</td> <td>430</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U	CD68 SIDS	92	56,83	950	CD68 Kontrolle	15	36,67	430	<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS ohne Myokarditisf.</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD68 SIDS</td> <td>90</td> <td>55,72</td> <td>920</td> </tr> <tr> <td>CD68 Kontrolle</td> <td>15</td> <td>36,67</td> <td>430</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U	CD68 SIDS	90	55,72	920	CD68 Kontrolle	15	36,67	430
SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U																												
CD68 SIDS	92	56,83	950																												
CD68 Kontrolle	15	36,67	430																												
SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U																												
CD68 SIDS	90	55,72	920																												
CD68 Kontrolle	15	36,67	430																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,334</td> <td>0,020</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,334	0,020	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,245</td> <td>0,025</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,245	0,025																
Z	P																														
-2,334	0,020																														
Z	P																														
-2,245	0,025																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS bereinigt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD68 SIDS</td> <td>83</td> <td>52,12</td> <td>840</td> </tr> <tr> <td>CD68 Kontrolle</td> <td>15</td> <td>35</td> <td>405</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U	CD68 SIDS	83	52,12	840	CD68 Kontrolle	15	35	405																
SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U																												
CD68 SIDS	83	52,12	840																												
CD68 Kontrolle	15	35	405																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,147</td> <td>0,032</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,147	0,032																								
Z	P																														
-2,147	0,032																														

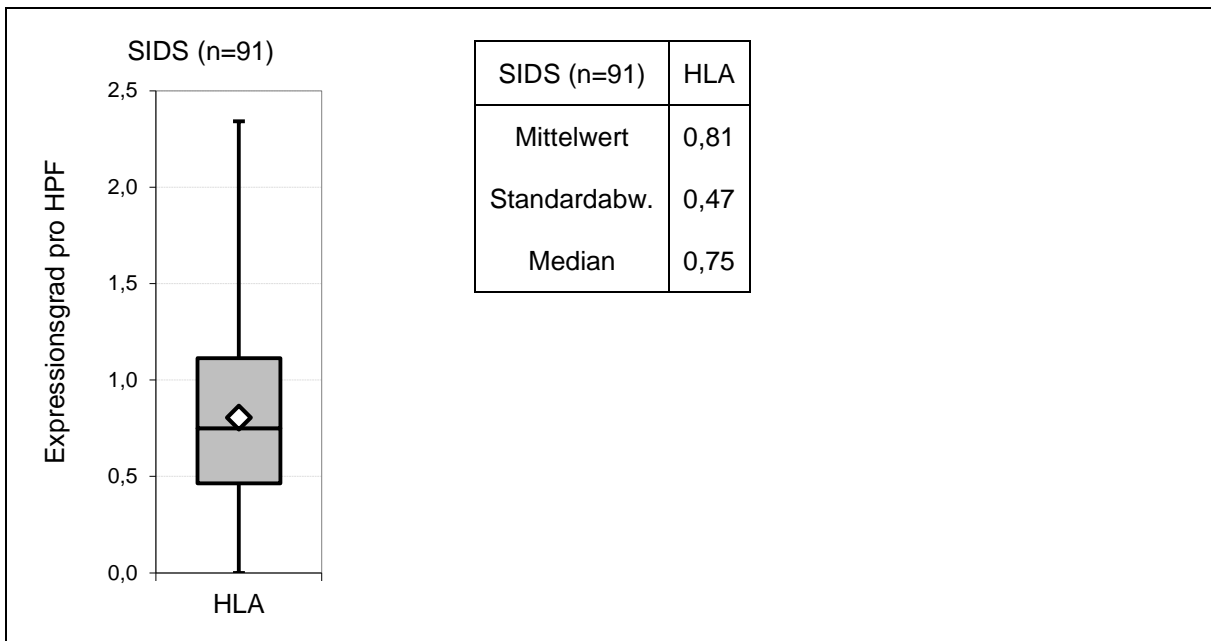
#### 4.6 Humanes Leukozyten Antigen (HLA)

Mit Hilfe des HLA-DR-Antigens werden MHC-Klasse-II-Moleküle nachgewiesen.

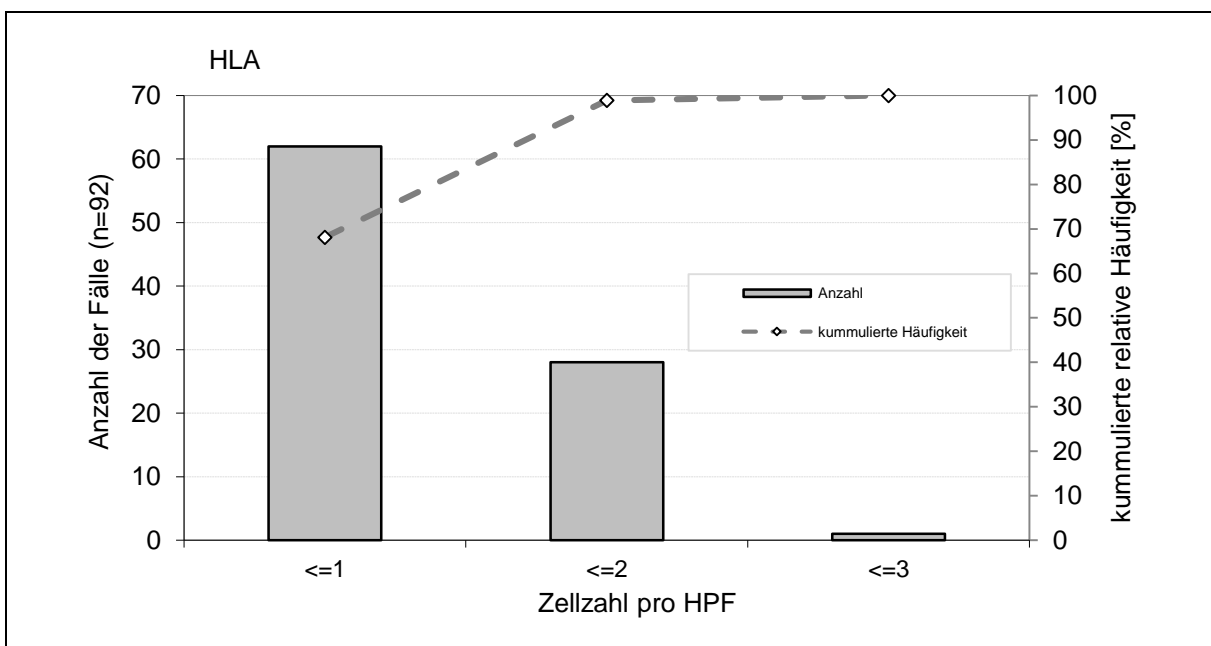


**Abb. 62:** Beispiel HLA, 400fache Vergrößerung

Für die Färbung von MHC-Klasse-II-Moleküle standen in dem untersuchten Kollektiv 91 Fälle zur Verfügung. In dem gesamten SIDS-Kollektiv (n=91) fand sich eine schwache Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle. Nach Überführen in die numerische Skala (siehe Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.6.) ergibt sich ein Mittelwert von  $0,81 \pm 0,47$  Expressionsgrad/HPF (Abb. 63). Von den 91 SIDS-Fällen weisen 68,1 % (62) keine bis eine schwache, 30,8 % (28) eine moderate, kein einziger Fall eine starke Expression auf (Abb. 64). Somit kann keine erhöhte HLA-Expression im SIDS-Kollektiv nachgewiesen werden.

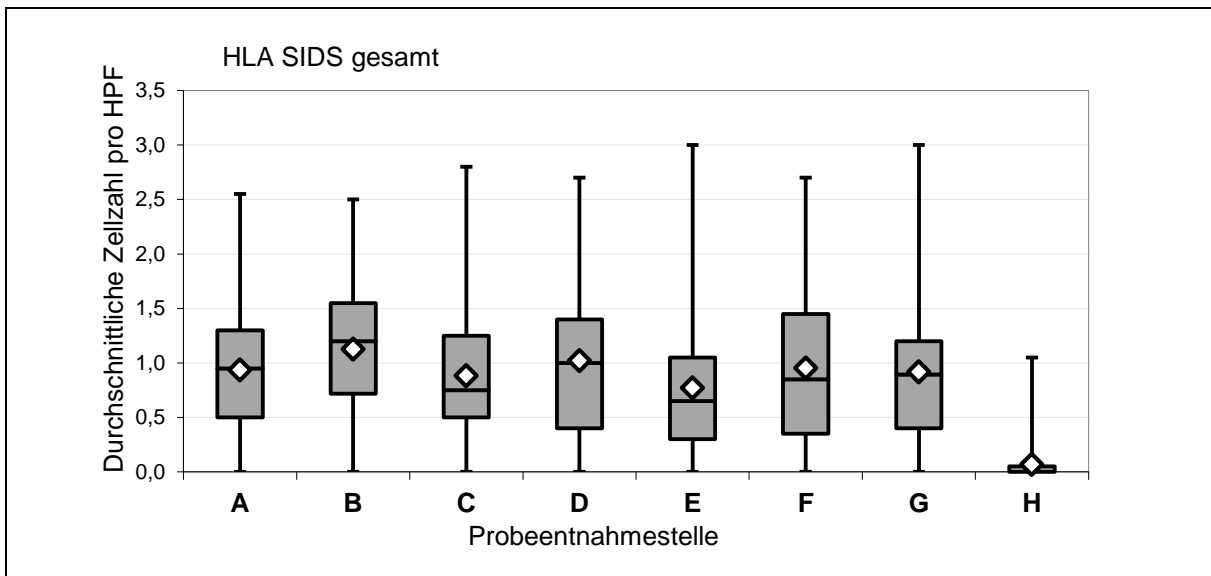


**Abb. 63:** Darstellung der ermittelten durchschnittlichen Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im SIDS-Kollektiv (n=91)

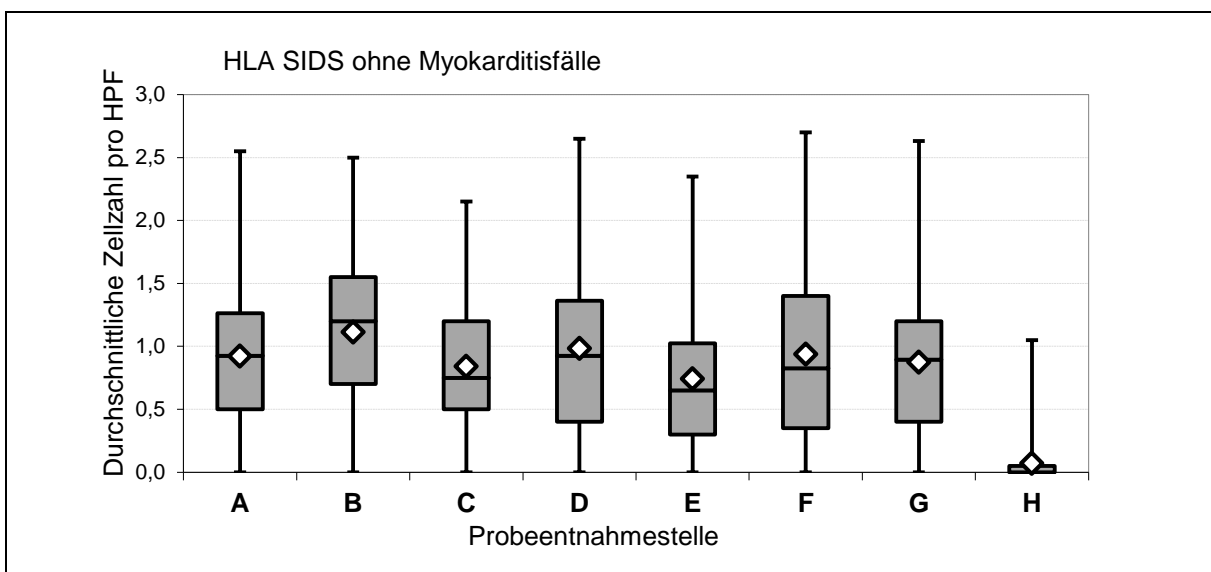


**Abb. 64:** Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte gemessen an den SIDS-Fällen: 68,1 % der SIDS-Fälle weisen keine bis eine geringe HLA-Expression auf

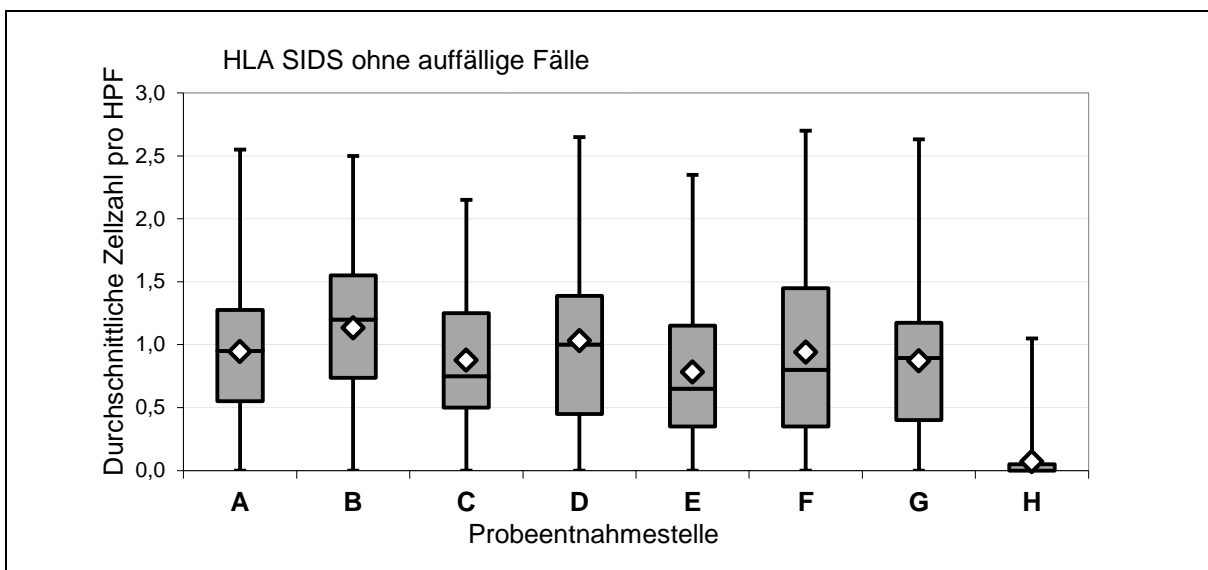
Die HLA-Expression ist im Herzen annähernd homogen verteilt ohne Präferenz einer Probeentnahmestelle (Abb. 65). Dies ändert sich auch nicht, wenn die Myokarditisfälle oder alle in HE auffälligen Fälle herausgenommen werden (Abb. 66 und 67).



**Abb. 65:** HLA-Expression im gesamten SIDS-Kollektiv (n=92) über die PES, insgesamt relativ homogene Verteilung



**Abb. 66:** HLA-Expression im um die Myokarditisfälle bereinigte SIDS-Kollektiv (n=90) über die PES, insgesamt relativ homogene Verteilung

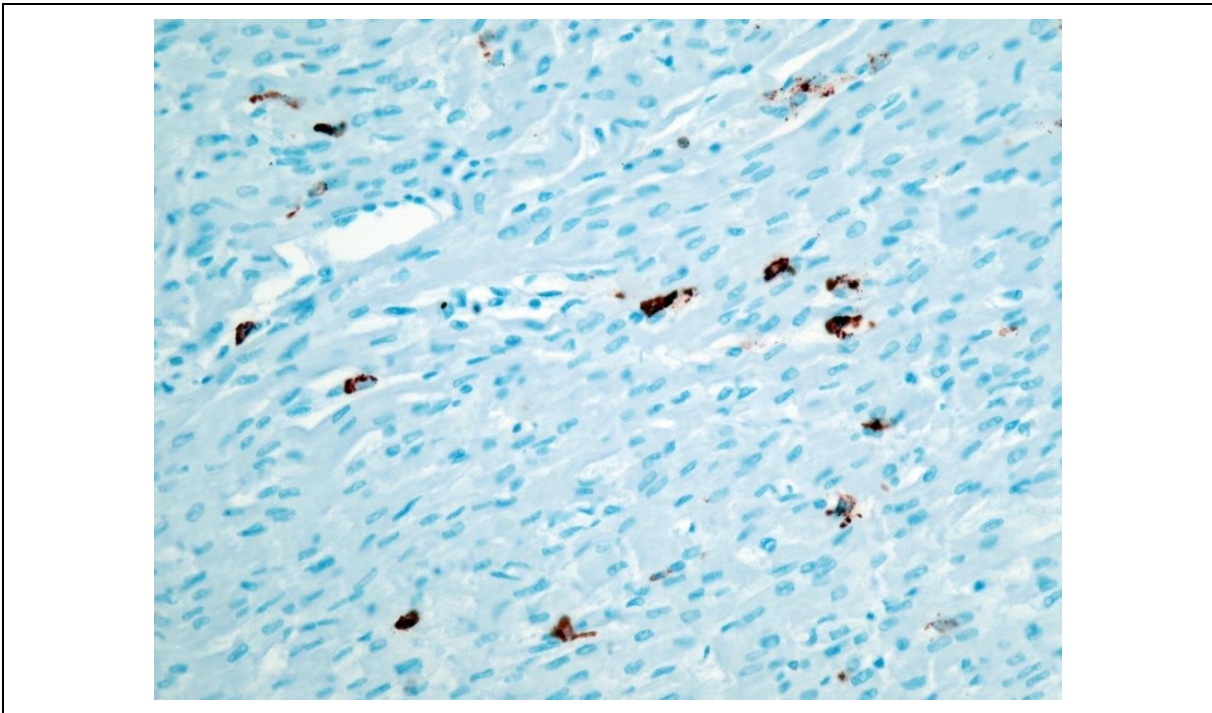


**Abb. 67:** HLA-Expression im um alle auffälligen Fälle bereinigte SIDS-Kollektiv (n=83) über die PES, insgesamt relativ homogene Verteilung

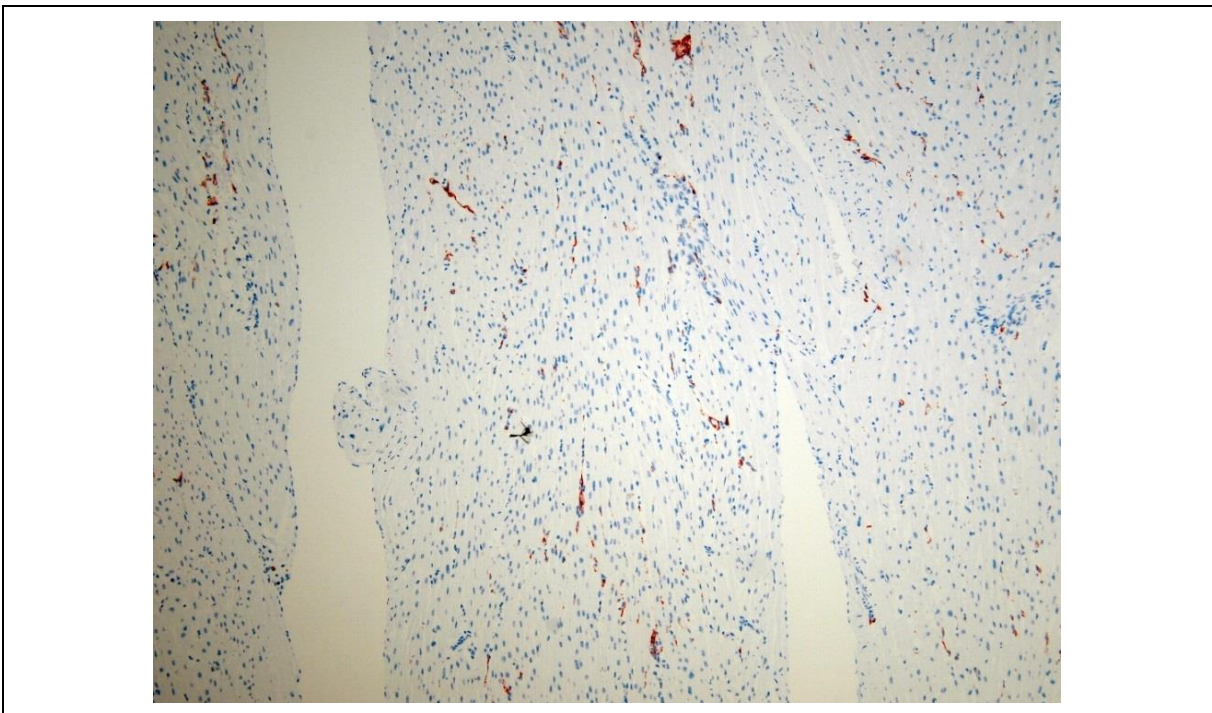
Es zeigt sich auch keine Korrelation zu der Höhe der Zellzahlen von Leukozyten, ebenso zu denen von Lymphozyten und Makrophagen. Nur in zwei der 91 Fälle (Fall 4 und 75) geht eine geringe bis mäßige HLA-Expression mit einer hohen zellulären Infiltration von Leukozyten und T-Lymphozyten einher (Tab. 9). Fall 4 ist einer der beiden Myokarditisfälle gemäß den DALLAS-Kriterien, der auch eine erhöhte Leukozyten- und Lymphozytenzahl/HPF aufweist, anamnestisch eine Erkältung hatte sowie in der Obduktion eine Mittelohrentzündung und einen schleimigen Atemwegsinfekt aufweist. Fall 75 zeigt ebenfalls erhöhte Leukozyten- und Lymphozytenzahlen/HPF und in der Obduktion eine Pneumonie.

**Tab. 9:** Darstellung der Fälle gefiltert nach HLA-Expression und Leukozyteninfiltration: Fall 4 und 10: Myokarditis in HE, Korrelation einer erhöhten zellulären Infiltration in HE sowie immunhistochemisch mit der HLA-Expression; Fall 8: Ödem und erhöhte zelluläre Infiltration in HE aber keine erhöhte zelluläre Infiltration in der Immunhistochemie sowie sehr geringe HLA-Expression

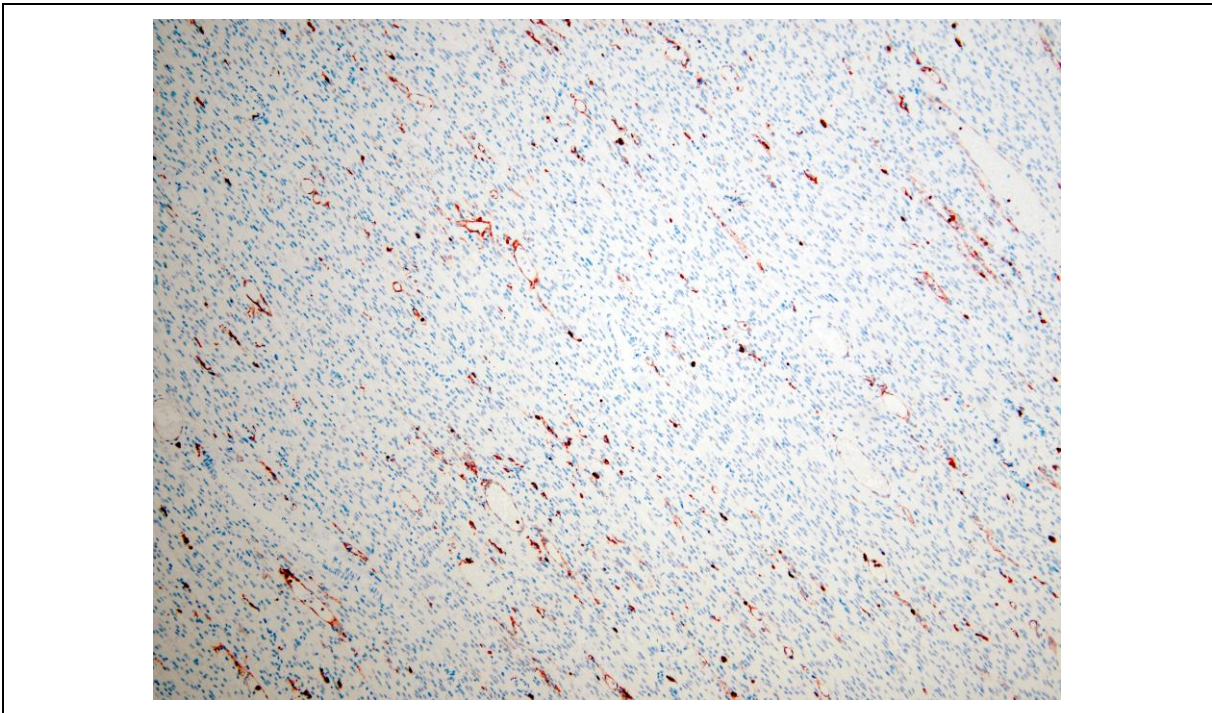
Fall	CD68	CD45-R0	LCA	HLA	E-sel	Alle SIDS-Fälle mit HLA-Expression > 1,5 (moderate Expression)
4.	2,28	40,42	35,73	2,34	0,07	
10.	3,89	3,29	8,23	1,52	0,00	
22.	2,53	0,90	14,69	1,66	0,02	
27.	0,39	0,22	4,39	1,52	0,50	
53.	0,73	1,28	3,01	1,59	0,11	
66.	4,45	4,37	5,21	1,80	0,03	
67.	0,27	0,61	0,49	1,53	0,03	
72.	0,67	2,03	1,14	1,73	0,21	
75.	2,03	9,38	17,09	1,84	0,20	
Fall	CD68	CD45-R0	LCA	HLA	E-Sel	Alle SIDS-Fälle, die in LCA im Mittel >10 Zellen/HPF aufweisen
4.	2,28	40,42	35,73	2,34	0,07	
8.	0,27	0,34	11,84	0,49	0,00	
22.	2,53	0,90	14,69	1,66	0,02	
29.	0,61	0,90	10,18	0,39	0,44	
32.	2,01	0,08	10,48	0,36	0,08	
50.	2,60	2,89	12,67	0,81	0,09	
54.	0,62	1,10	12,86	1,11	0,38	
75.	2,03	9,38	17,09	1,84	0,20	
84.	0,45	0,56	11,08	1,44	0,02	
87.	0,84	1,24	12,14	0,75	0,00	
88.	0,76	0,53	12,01	1,28	0,01	



**Abb. 68:** Fall 82, HLA, PES C, 400fache Vergrößerung



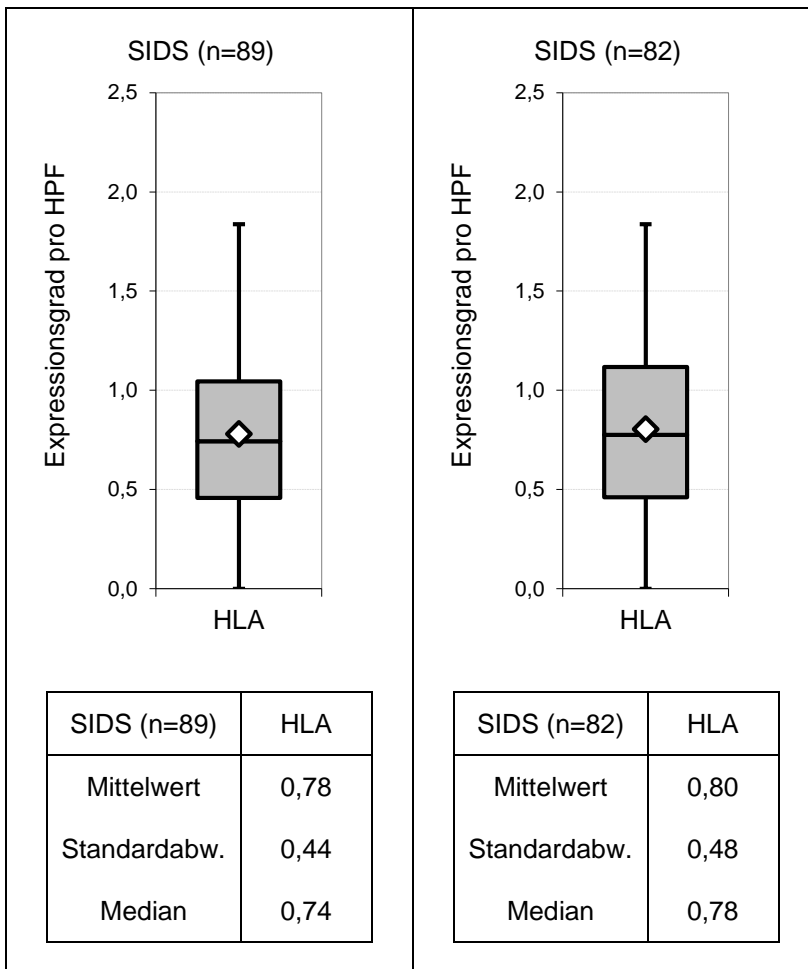
**Abb. 69:** Fall 88, HLA, PES A, 100fache Vergrößerung, mäßige Expression



**Abb. 70:** Fall 72, HLA, PES A, 100fache Vergrößerung, starke Expression

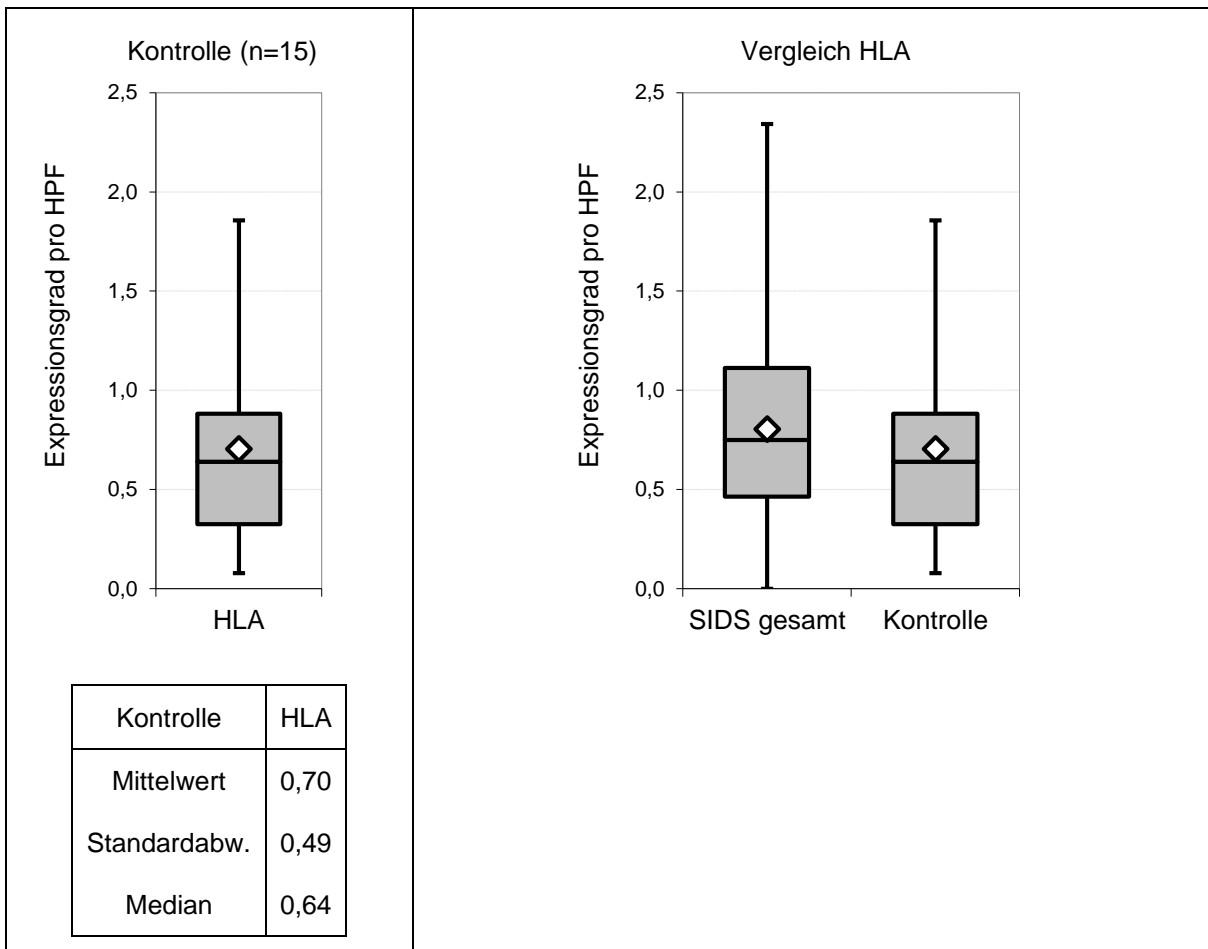
Ohne Betrachtung der Myokarditisfälle beträgt der Mittelwert  $0,78 \pm 0,44$  Expressionsgrad/HPF und ohne alle in HE auffälligen Fälle  $0,80 \pm 0,48$  Expressionsgrad/HPF (Abb. 71).





**Abb. 71:** Ergebnis der semiquantitativen Auswertung für HLA bereinigt um die Myokarditisfälle sowie die übrigen in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47)

Das Kontrollkollektiv weist mit durchschnittlich  $0,70 \pm 0,49$  Expressionsgrad/HPF ebenfalls eine sehr geringe Expression von MHC-II-Klasse-Molekülen auf (Abb. 72).



**Abb. 72:** Durchschnittliche Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im Kontrollkollektiv und Vergleich der durchschnittlichen Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im Kontrollkollektiv und gesamten SIDS-Kollektiv

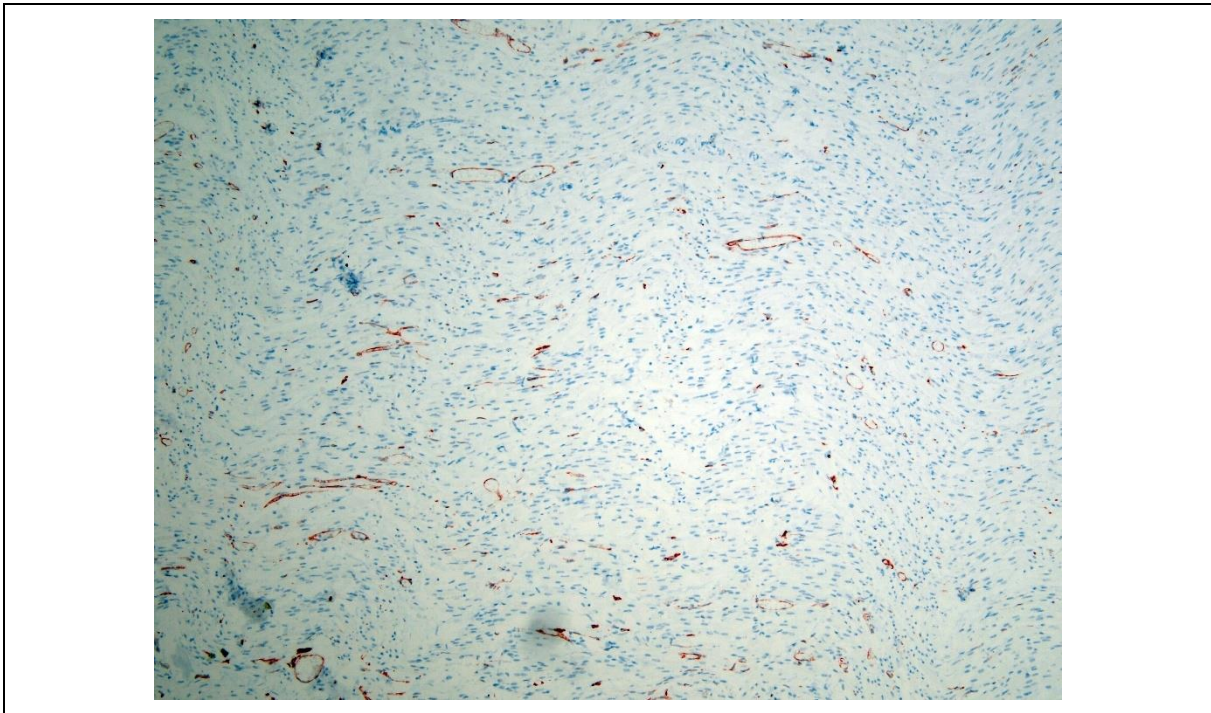
Ein statistischer signifikanter Unterschied besteht nicht ( $p > 0,05$ ) (Tab. 10).

**Tab. 10:** Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv

<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS gesamt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HLA SIDS</td> <td>91</td> <td>54,48</td> <td>772</td> </tr> <tr> <td>HLA Kontrolle</td> <td>15</td> <td>47,53</td> <td>593</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U	HLA SIDS	91	54,48	772	HLA Kontrolle	15	47,53	593	<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS ohne Myokarditisf.</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HLA SIDS</td> <td>89</td> <td>53,36</td> <td>744</td> </tr> <tr> <td>HLA Kontrolle</td> <td>15</td> <td>47,4</td> <td>591</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U	HLA SIDS	89	53,36	744	HLA Kontrolle	15	47,4	591
SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U																												
HLA SIDS	91	54,48	772																												
HLA Kontrolle	15	47,53	593																												
SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U																												
HLA SIDS	89	53,36	744																												
HLA Kontrolle	15	47,4	591																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-0,81</td> <td>0,42</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-0,81	0,42	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-0,71</td> <td>0,48</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-0,71	0,48																
Z	P																														
-0,81	0,42																														
Z	P																														
-0,71	0,48																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>SIDS bereinigt</th> <th>N</th> <th>Rang- mittel</th> <th>U</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HLA SIDS</td> <td>82</td> <td>50,10</td> <td>705</td> </tr> <tr> <td>HLA Kontrolle</td> <td>15</td> <td>43</td> <td>525</td> </tr> </tbody> </table>				SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U	HLA SIDS	82	50,10	705	HLA Kontrolle	15	43	525																
SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U																												
HLA SIDS	82	50,10	705																												
HLA Kontrolle	15	43	525																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,90</td> <td>0,37</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	0,90	0,37																								
Z	P																														
0,90	0,37																														

#### 4.7 E-selectin

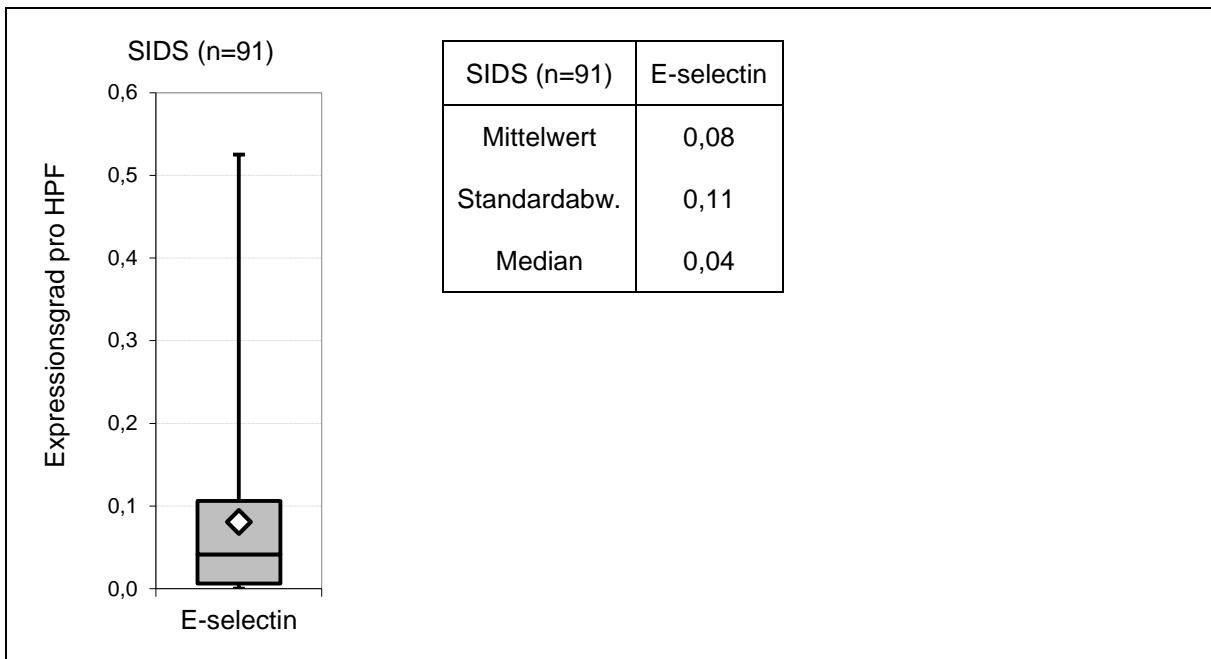
Das membranständige Antigen CD62E färbt das Adhäsionsmolekül E-selectin der Gefäßwand an. Im Falle einer Expression kommt das angeschnittene Gefäß zur Darstellung wie in der Abbildung 73 dargestellt.



**Abb. 73:** Beispiel E-selectin, 400fach

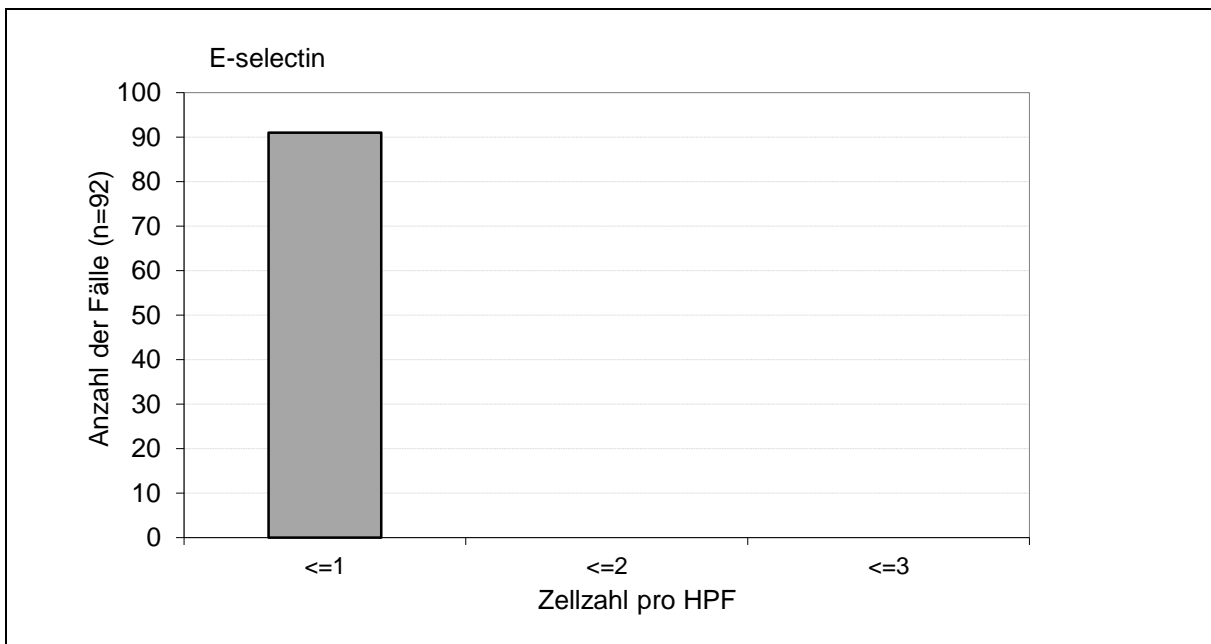
Auch für das Adhäsionsmolekül E-selectin stehen 91 SIDS-Fälle zur Verfügung. Die Beurteilung der Expression erfolgte auf dieselbe Weise wie für HLA (siehe Kapitel 3.2.3.5 und 3.2.6)

Insgesamt zeigte sich im gesamten Kollektiv eine geringe bis fehlende Expression von E-selectin. Der ermittelte Mittelwert liegt bei  $0,08 \pm 0,12$  Grad der Expression/HPF. Somit liegt auch für E-selectin keine erhöhte Expression im SIDS-Kollektiv analog zu HLA vor (Abb. 74).



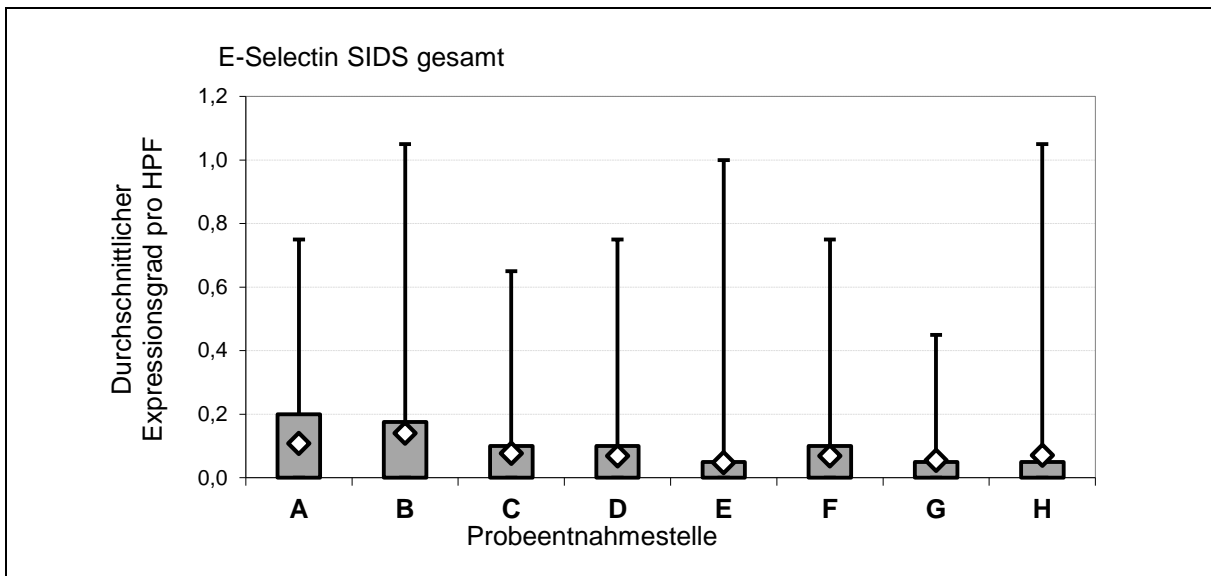
**Abb. 74:** Ergebnisdarstellung der durchschnittlichen Expression von E-selectin im SIDS-Kollektiv (n=91)

Im gesamten Kollektiv findet sich keine bis eine schwache endotheliale Expression. Dabei weisen 21 Fälle (23,1 %) keine und die restlichen 70 Fälle nur eine geringe Expression auf (Abb. 75).

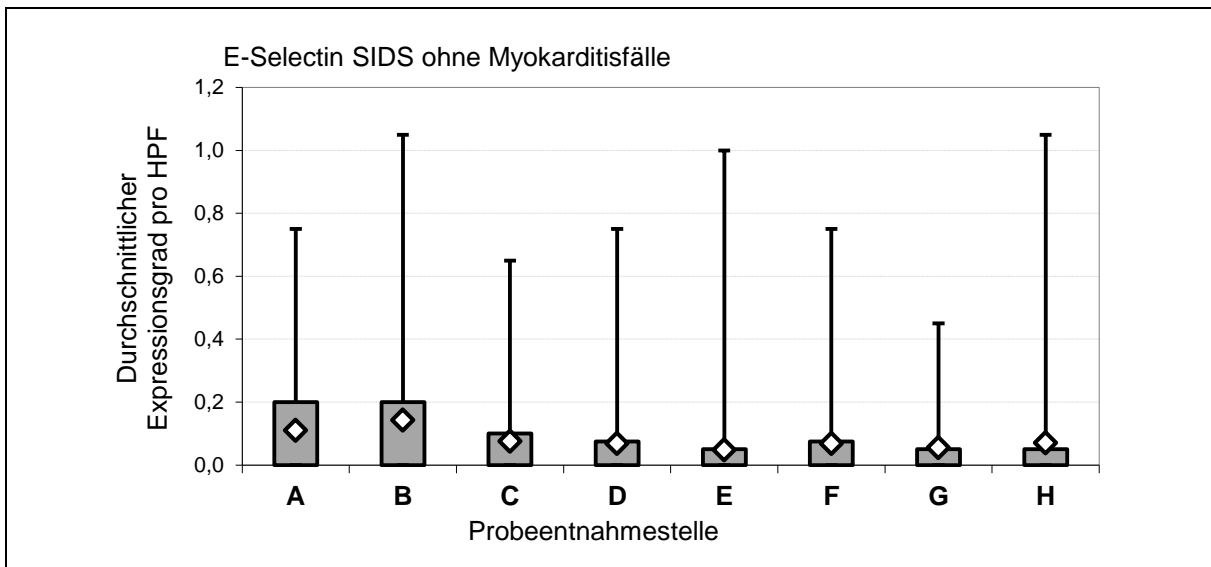


**Abb. 75:** Häufigkeitsverteilung von E-Selectin im gesamten SIDS-Kollektiv (n=91)

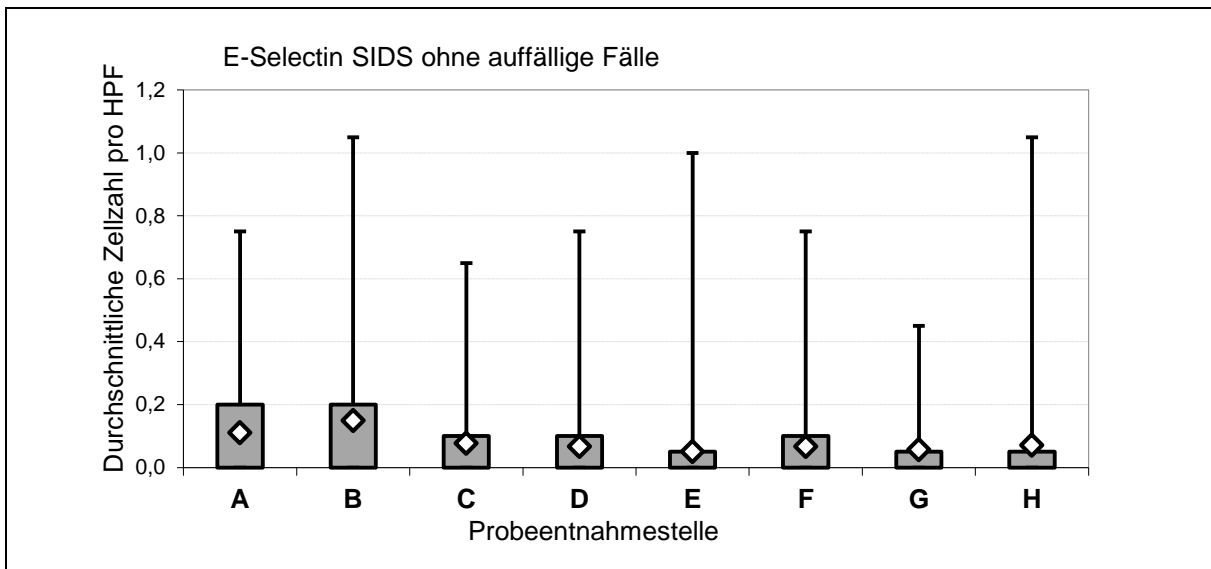
Wird die Verteilung über die acht Probeentnahmestellen betrachtet, so zeigt sich hier für alle drei Kollektive analog zu den MHC-Klasse-II-Molekülen eine homogene Verteilung (Abb. 76-78). Allerdings weisen fünf Fälle zum Teil fokale eine mäßige bis starke endotheliale Expression von E-selectin auf (siehe Tab. 11). In wenigen Fällen kann eine Schwankung innerhalb des Falles nachgewiesen werden mit einer fokalen Häufung innerhalb einer Probeentnahmestelle (Abb. 79 und 80).



**Abb. 76:** Mittelwerte für E-selectin über die acht PES für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=91)



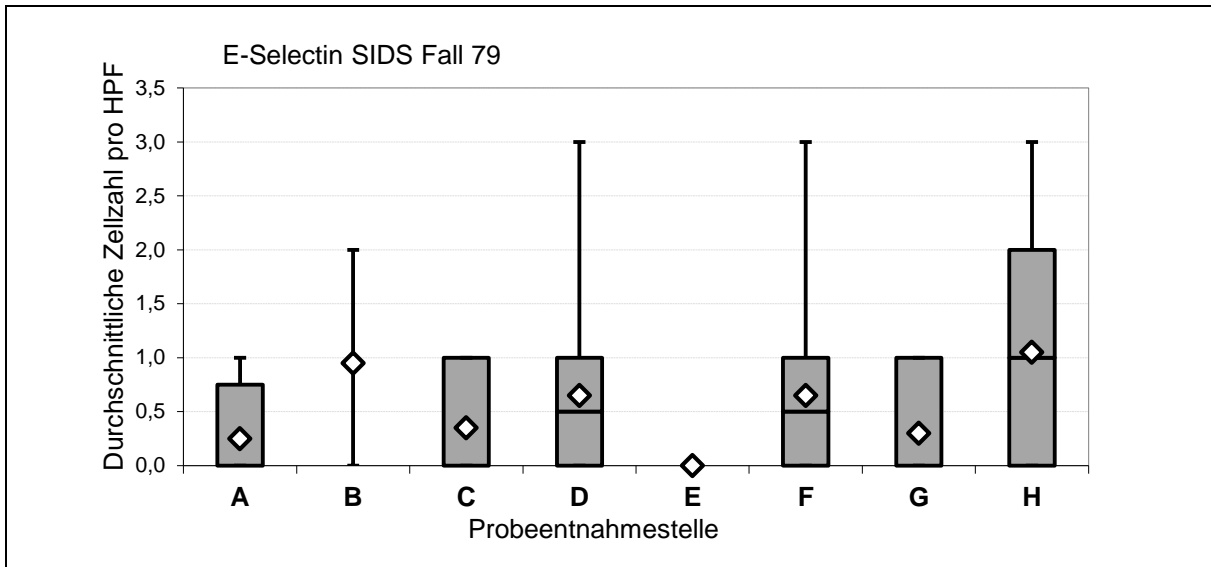
**Abb. 77:** Mittelwerte für E-selectin über die acht PES für das um alle Myokarditidfälle bereinigte Kollektiv (n=89)



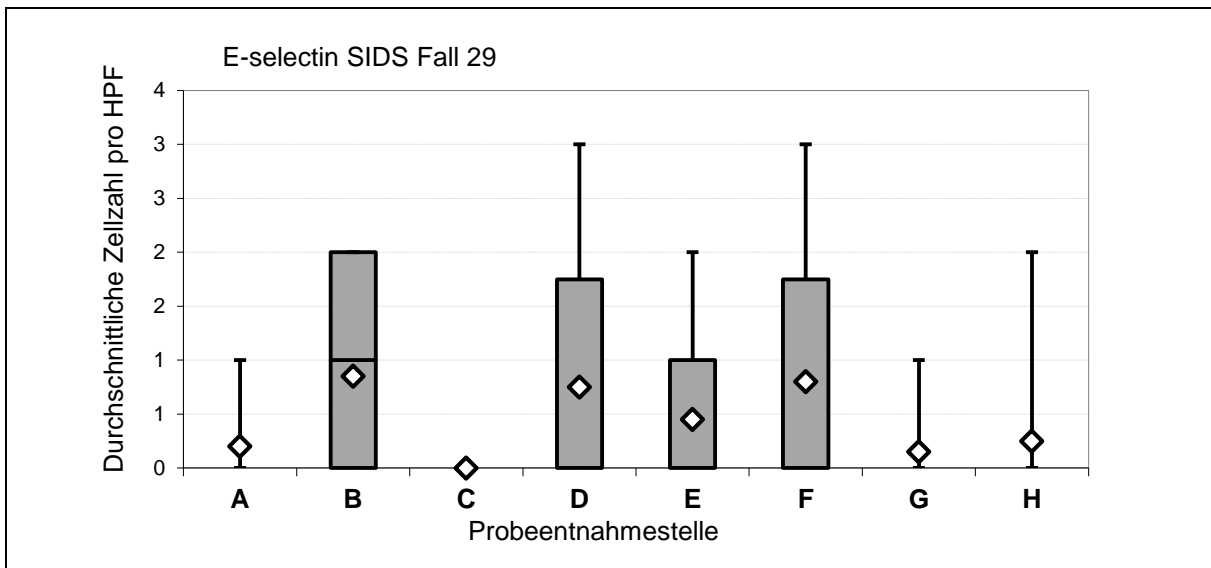
**Abb. 78:** Mittelwerte für E-selectin über die acht PES für das um alle auffälligen Fälle bereinigte Kollektiv (n=82)

**Tab. 11:** SIDS-Fälle mit mäßiger E-selectinexpression

Fall	CD68	CD45-R0	LCA	HLA	E-sel
26.	0,07	1,20	3,70	1,15	0,33
27.	0,39	0,22	4,39	1,52	0,50
29.	0,61	0,90	10,18	0,39	0,44
54.	0,62	1,10	12,86	1,11	0,38
79.	0,46	1,28	2,94	0,92	0,53
26.	0,07	1,20	3,70	1,15	0,33

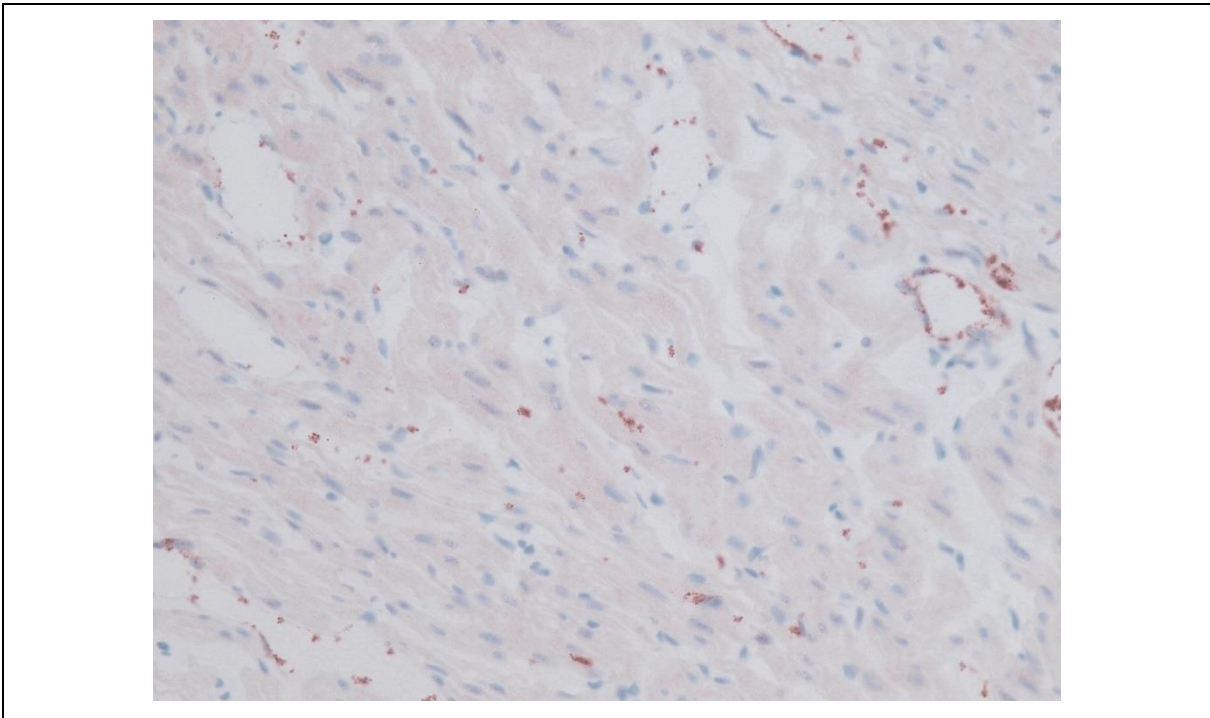


**Abb. 79:** Fall 79 E-selectin: Mittelwerte pro PES, schwankende Expressionsintensität von PES zu PES und innerhalb einer PES, zum Teil auch starke Expression



**Abb. 80:** Fall 29 E-selectin: Mittelwerte pro PES, schwankende Expressionsintensität von PES zu PES und innerhalb einer PES, zum Teil auch starke Expression (PES F)





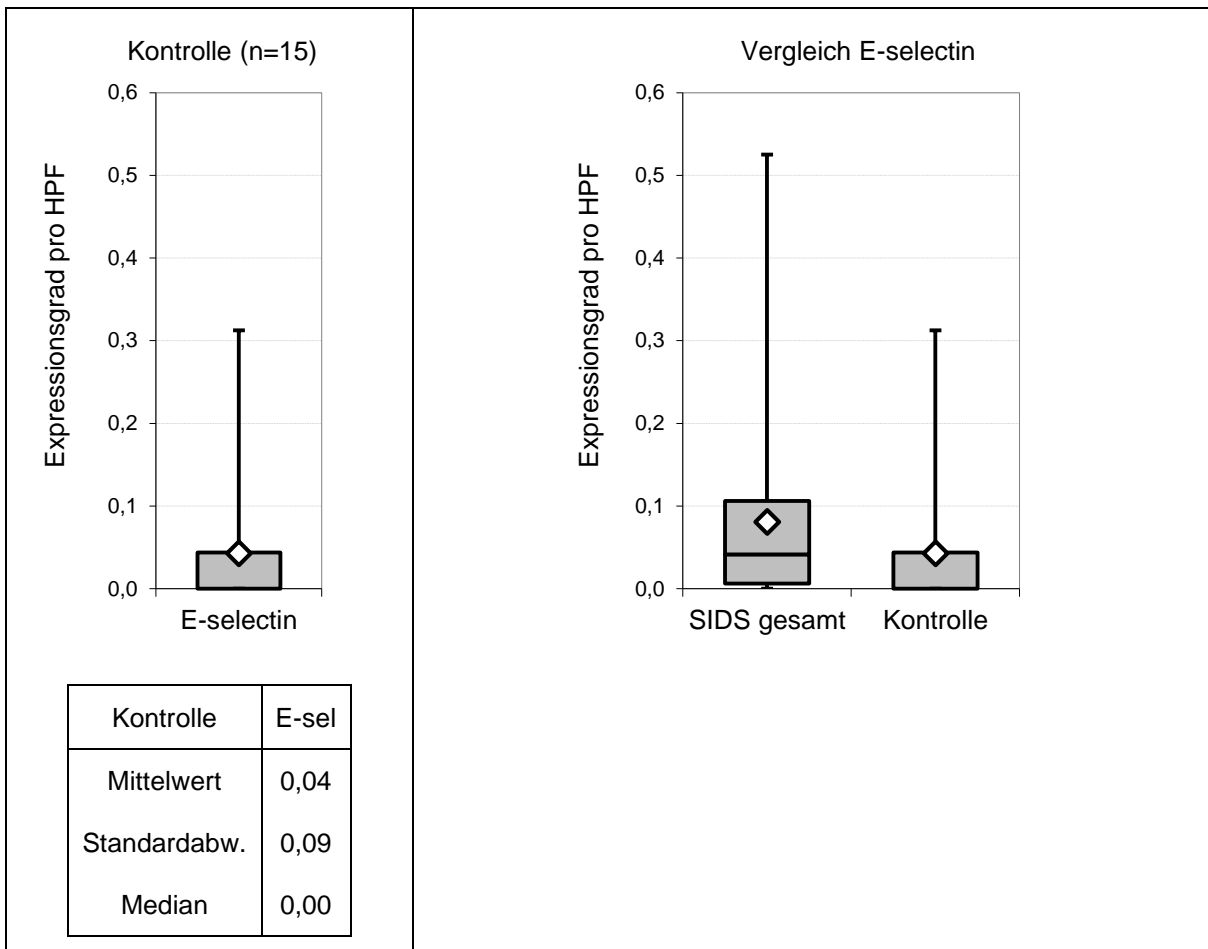
**Abb. 81:** Fall 50, E-selectin, PES A, 400fache Vergrößerung, moderate Expression

Werden die Ergebnisse um die Myokarditisfälle sowie alle in HE auffälligen Fälle bereinigt, so ergeben sich keine Änderungen (siehe Tab. 12).

**Tab. 12:** Ergebnis der semiquantitativen Auswertung für E-selectin bereinigt um die Myokarditisfälle sowie die übrigen in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47)

<b>SIDS (n=89)</b>	<b>E-selectin</b>	<b>SIDS (n=82)</b>	<b>E-selectin</b>
Mittelwert	0,08	Mittelwert	0,08
Standardabw.	0,11	Standardabw.	0,11
Median	0,04	Median	0,04

Im Kontrollkollektiv findet sich in neun der fünfzehn Fälle keine Expression von E-selectin und in den restlichen sechs nur eine sehr schwache, sodass hier ein Mittelwert von  $0,04 \pm 0,09$  Expressionsgrad/HPF ermittelt wird (Abb. 82).



**Abb. 82:** Durchschnittliche Expression von E-selectin im Kontrollkollektiv und Vergleich der durchschnittlichen Expression von E-selectin im Kontrollkollektiv und im gesamten SIDS-Kollektiv

Im Vergleich beider Kollektive lässt sich hier erneut eine statistische Signifikanz ermitteln, aufgrund des so geringen Mittelwertes und fehlender Korrelation zu HLA und den anderen immunhistochemischen Markern wird dem jedoch ebenfalls keine klinische Relevanz beigemessen (Tab. 13).

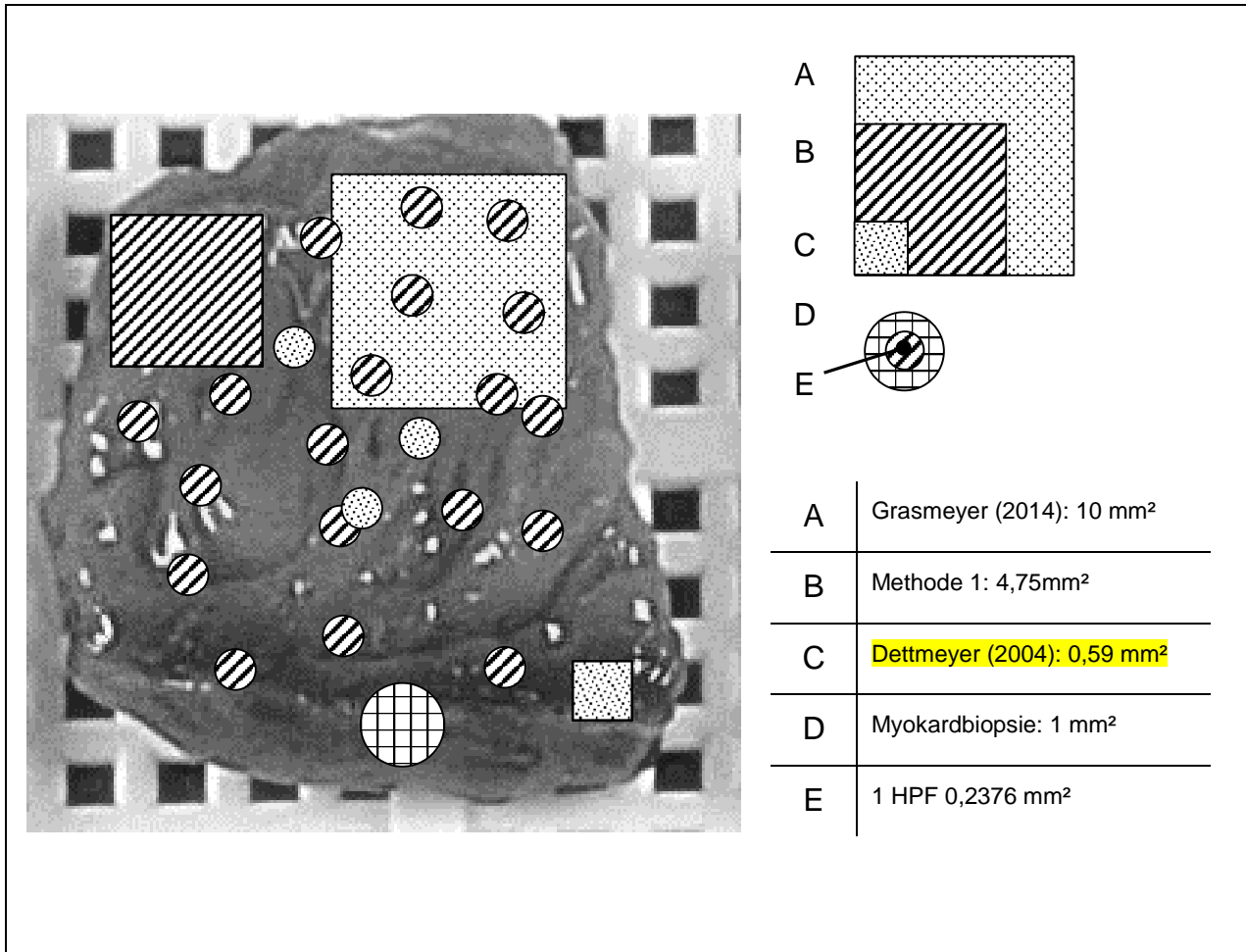
**Tab. 13:** Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive

SIDS gesamt	N	Rang- mittel	U	SIDS ohne Myokarditisf.	N	Rang- mittel	U								
E-sel SIDS	91	56,39	946	E-sel SIDS	89	55,45	930								
E-sel Kontrolle	15	35,87	420	E-sel Kontrolle	15	35	405								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,412</td> <td>0,016</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,412	0,016	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,456</td> <td>0,014</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,456	0,014
Z	P														
-2,412	0,016														
Z	P														
-2,456	0,014														
SIDS bereinigt	N	Rang- mittel	U												
E-sel SIDS	82	51,87	851												
E-sel Kontrolle	15	33,30	380												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Z</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-2,379</td> <td>0,017</td> </tr> </tbody> </table>				Z	P	-2,379	0,017								
Z	P														
-2,379	0,017														

#### 4.8 Vergleich der Auszählmethoden der vorliegenden Arbeit (Methode1) mit der von Grasmeyer (2014) (Methode2)

In der vorliegenden Arbeit wurden 20 Gesichtsfelder in 400facher Vergrößerung pro Probeentnahmestelle ausgezählt (Methode 1). In der von Grasmeyer erstellten Dissertation 2014 wurde das gleiche SIDS- und Kontrollkollektiv wie für die vorliegende Arbeit ausgewertet, jedoch erfolgte die Auszählung der Objektträger mittels eines standardisierten 1 mm<sup>2</sup> großen Rasters in 100facher Vergrößerung (Methode 2) (Grasmeyer, 2014). Dabei wurden zehn 1 mm<sup>2</sup> große Flächen pro Probeentnahmestelle ausgezählt. Dies entspricht einer Fläche von 80 mm<sup>2</sup> pro Herz. Die Fläche eines Gesichtsfeldes des hier verwendeten Mikroskops beträgt ca. 0,24 mm<sup>2</sup> und ergibt somit eine in dieser Arbeit ausgewertete Gesamtfläche von ca. 38,02 mm<sup>2</sup> pro Herz. Hier zeigt sich bereits, dass mittels der hier verwendeten Auszählmethode weniger als die Hälfte der Fläche im Vergleich zur Methode 2 ausgewertet werden. In der Abb. 85 werden die Flächen der beiden Zählmethoden mit der Fläche einer Probeentnahmestelle, der Größe einer

Myokardbiopsie sowie der in einer Arbeit aus Deutschland aus dem Jahr 2004 ausgewerteten Fläche (Dettmeyer, 2004) verglichen. Daran wird deutlich, dass die von Grasmeyer verwendete Auszählmethode eine repräsentativere Fläche auswertet.



**Abb. 83:** Vergleich der ausgezählten Flächen der Methode 1, der von Grasmeyer (2014) sowie der von Dettmeyer (2004) mit der Fläche der einzelnen Probeentnahmestelle (Obduktionsbild Fall 90, PES D) und einer Myokardbiopsie im Maßstab 10:1

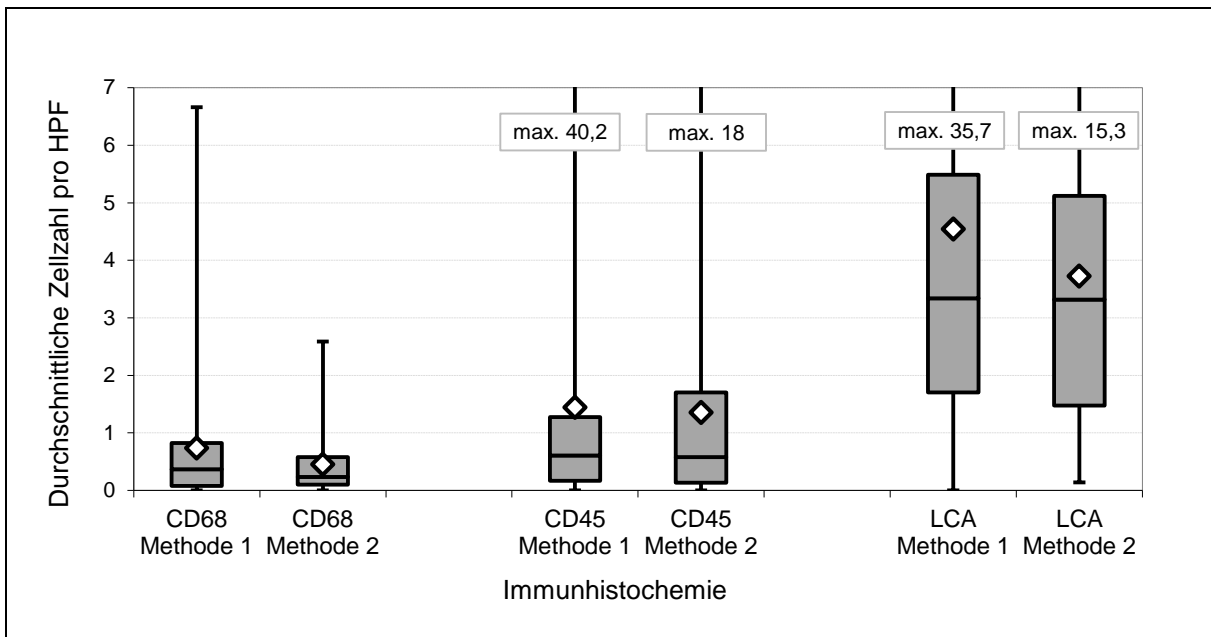
Mittels eines Umrechnungsfaktors (siehe Kapitel 3.2.1.3) wurde die mittlere Zellzahl/HPF der Methode 1 auf 1 mm<sup>2</sup> hochgerechnet und ebenso die Werte von Grasmeyers Arbeit auf HPF umgerechnet. Es wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Marker LCA, CD45-R0 und CD68 verglichen (Tab. 14 und Abb. 84).

**Tab. 14:** Mittelwerte für die Färbungen LCA, CD45-R0 und CD68 je Kollektiv und Methode

SIDS-Kollektiv	Methode 1 (HPF berechnet auf mm <sup>2</sup> )			Methode 2 (Auszählung in mm <sup>2</sup> )			
	Zellen/mm <sup>2</sup>	92 Fälle	90 Fälle	83 Fälle	92 Fälle	90 Fälle	83 Fälle
LCA		19,13 ± 20,41	17,50 ± 15,12	16,73 ± 15,12	15,67 ± 12,13	15,17 ± 11,22	16,61 ± 11,40
CD45-R0		6,07 ± 18,23	5,16 ± 5,70	4,25 ± 5,72	5,70 ± 10,09	4,87 ± 6,88	4,81 ± 6,83
CD68		3,09 ± 4,58	2,87 ± 4,33	2,78 ± 4,22	1,90 ± 2,39	1,87 ± 2,40	1,78 ± 2,30

SIDS-Kollektiv	Methode 1 (Auszählung in HPF)			Methode 2 (berechnet in HPF)			
	Zellen/HPF	92 Fälle	90 Fälle	83 Fälle	92 Fälle	90 Fälle	83 Fälle
LCA		4,54 ± 4,84	4,16 ± 3,59	3,97 ± 3,59	3,73 ± 2,88	3,60 ± 2,67	3,47 ± 2,71
CD45-R0		1,44 ± 4,33	0,68 ± 1,35	1,01 ± 1,36	1,35 ± 2,40	1,16 ± 1,63	1,14 ± 1,62
CD68		0,73 ± 1,09	0,99 ± 1,03	0,66 ± 1,00	0,45 ± 0,57	0,44 ± 0,57	0,42 ± 0,55

Der Vergleich ergibt etwas höhere Mittelwerte für die in HPF ausgezählte Methode sowohl bei Hochrechnung der Gesichtsfelder auf 1 mm<sup>2</sup> als auch wenn die Ergebnisse der Methode 2 auf ein HPF heruntergerechnet werden. Die Werte liegen jedoch im Bereich der Standardabweichung und der Unterschied ist nicht statistisch signifikant (Tab. 15).



**Abb. 84:** Vergleich der Mittelwerte beider Auszählmethoden für die Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=92) (zur besseren Darstellbarkeit wurde die y-Achse auf einen Maximalwert von 7 Zellen/HPF skaliert, der größte Wert findet sich für LCA der Methode 1 (HPF) mit durchschnittlich 40,2 Zellen/HPF).

**Tab. 15:** U-Test für nicht parametrische unverbundene Stichproben jeweils für LCA, CD45-R0, CD68 an den Methoden 1 und 2 für das gesamte SIDS-Kollektiv: der Unterschied ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

	N	Rang- mittel	U		N	Rang- mittel	U
LCA HPF Methode 1	91	92,2	4203	CD45 R0 HPF Methode 1	91	90,5	4048
LCA HPF Methode 2	91	90,8	4078	CD45 R0 HPF Methode 2	91	92,5	4233
	Z	P			Z	P	
	0,18	0,86			-0,26	0,79	
	N	Rang- mittel	U				
CD68 HPF Methode 1	91	97,2	4658				
CD68 HPF Methode 2	91	85,8	3623				
	Z	P					
	-1,5	0,1					

Es gibt allerdings zehn Fälle, bei denen die Differenz der Zellen pro HPF für die Leukozyten mehr als drei beträgt. Darunter sind fünf Fälle, die um mehr als fünf Zellen differieren, wobei zwei davon die beiden Myokarditisfälle sind. Für den Marker CD45R0 gibt es in drei Fällen einen Unterschied von mehr als drei T-Lymphozyten pro HPF. Bei CD68 sind vier Fälle mit einer Abweichung im Mittelwert von mehr als 2 Makrophagen/HPF vorhanden (Tab. 16).

**Tab. 16:** Darstellung der SIDS-Fälle je Färbung, deren Mittelwerte um mehr als drei Zellen/HPF bei LCA und CD45R0 bzw. mehr als zwei Zellen/HPF bei CD68 zwischen den beiden Auszählmethoden differieren; Differenz mit positivem Vorzeichen: Mittelwert bei Methode 1 höher; Differenz mit negativem Vorzeichen: Mittelwert bei Methode 2 höher; grau unterlegt: Fall in HE auffällig (Ödem, erhöhte zelluläre Infiltration, eindeutige Myokarditis)

LCA	Methode 1 HPF	Methode 2 mm <sup>2</sup>	Differenz	Methode 1 HPF	Methode 2 mm <sup>2</sup>	Differenz
SIDS-Fall	Zellen/HPF	Zellen/HPF	Zellen/HPF	Zellen/mm <sup>2</sup>	Zellen/mm <sup>2</sup>	Zellen/mm <sup>2</sup>
2	7,50	3,82	3,68	31,57	16,07	15, 51
4	35,00	15,27	19,72	147,35	64,30	83,05
10	8,23	3,23	5,00	34,65	13,60	21,05
22	14,69	6,69	8,00	61,84	28,18	33,66
50	12,67	8,22	4,45	53,34	34,61	18,73
53	0,30	3,58	-3,28	1,27	15,06	-13,80
54	12,86	8,03	4,83	54,12	33,81	20,31
75	17,09	12,49	4,60	71,97	52,60	19,37
84	1,08	6,98	-5,90	4,55	29,40	-24,85
87	12,14	6,95	5,19	51,10	29,24	21,86

CD45-R0	Methode 1 HPF	Methode 2 mm <sup>2</sup>	Differenz	Methode 1 HPF	Methode 2 mm <sup>2</sup>	Differenz
SIDS-Fall	Zellen/HPF	Zellen/HPF	Zellen/HPF	Zellen/mm <sup>2</sup>	Zellen/mm <sup>2</sup>	Zellen/mm <sup>2</sup>
4	40,42	18,01	22,42	170,17	75,80	94,37
36	0,56	3,96	-3,40	2,35	16,67	-14,33
63	3,21	7,93	-4,72	13,50	33,36	-19,87



CD68	Methode 1 HPF	Methode 2 mm <sup>2</sup>	Differenz	Methode 1 HPF	Methode 2 mm <sup>2</sup>	Differenz
SIDS-Fall	Zellen/HPF	Zellen/HPF		Zellen/mm <sup>2</sup>	Zellen/mm <sup>2</sup>	
10	3,80	0,57	3,32	16,38	2,42	13,96
66	4,45	2,37	2,08	18,74	9,99	8,75
74	6,66	2,59	4,08	28,05	10,89	17,16
78	3,77	1,25	2,52	15,87	5,26	10,61

Prüft man diese vierzehn Fälle auf Signifikanz, so ergibt sich für sieben Fälle eine statistische Signifikanz mit  $p < 0,05$ . Darunter sind nur zwei Fälle mit einer Differenz von über fünf Zellen/HPF (LCA Fall 84 und 87) und diese sind zudem auch nur sehr knapp signifikant (Tab. 17).

**Tab. 17:** Auflistung der SIDS-Fälle, die beim Vergleich der Mittelwerte der beiden Auszählmethoden einen statistisch signifikanten Unterschied in einer der drei immunhistochemischen Färbungen aufweisen

Fall	Immunhistochemische Färbung	Methode 1	Methode 2	P Wert $\leq$ 0,05	Bewertung
		Mittelwert [Zellen/HPF]			
22	CD45-R0	0,9	0,25	0,0286	nicht relevant, da Mittelwert <1 Zelle/HPF
36	CD45-R0	0,55	2,34	0,007	Unterschied nicht relevant da < 5 Lymphozyten/HPF normal, sogar bei Erwachsenen
66	CD68	4,45	2,37	0,0379	Unterschied nicht relevant da 2 oder 4 Makrophagen/HPF keine klinische Relevanz haben
74	LCA	4,09	2,05	0,0499	gerade signifikant, Mittelwerte liegen unter 5 Zellen/HPF, keine klinische Relevanz
74	CD68	6,63	2,59	0,0104	hohe Mittelwerte in beiden Zählmethoden
78	CD68	3,77	1,25	0,0356	nicht relevant, Unterschied 1 oder 3 Makrophagen klinisch nicht relevant
84	LCA	11,08	7	0,0499	hohe Mittelwerte mit Differenz von >5 Leukozyten/HPF aber nicht relevant, da gerade signifikant
87	LCA	12,13	6,94	0,0499	gerade signifikant, Zellzahl beider Methoden hoch, bei Methode 1 aber doppelt so hoch; Ursache: Flächendifferenz mit Auszählung von mehr unauffälligem Gewebe bei 100facher Vergrößerung
87	CD68	0,84	0,36	0,018	nicht relevant, beide Methoden Zellzahl <1

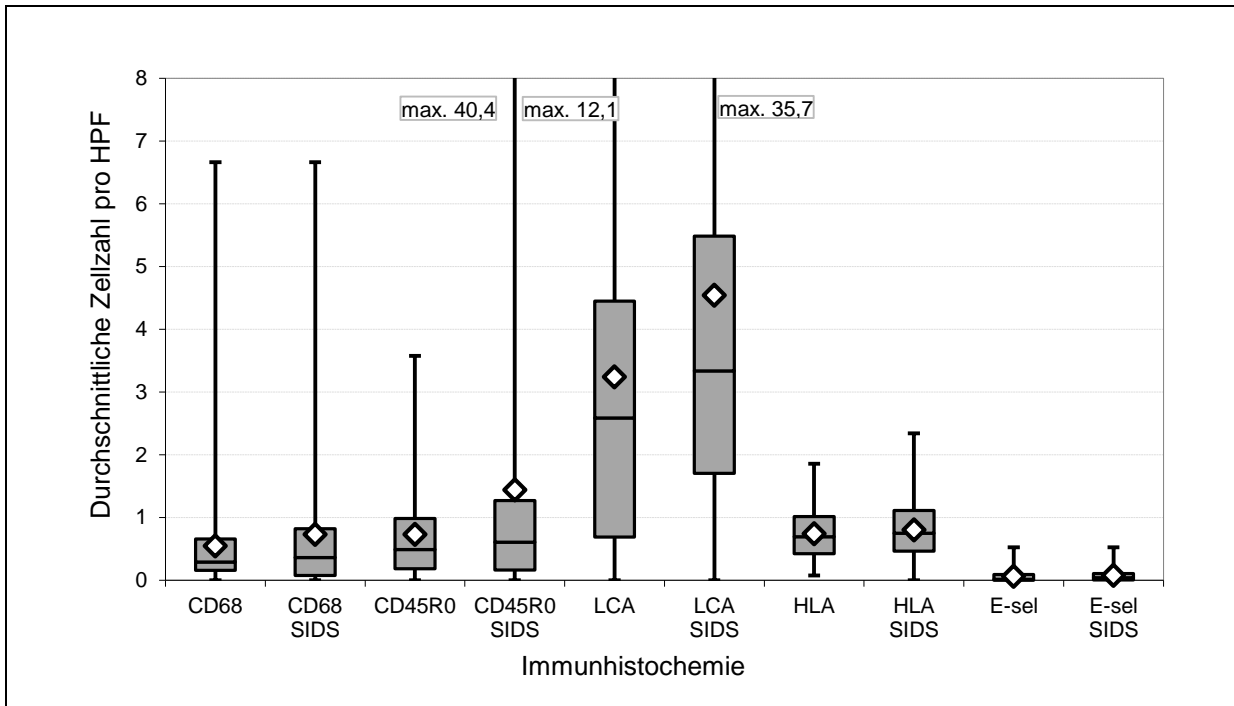
#### 4.9 Darstellung einer möglichen physiologischen Infiltration von inflammatorischen Zellen

Zur Darstellung einer möglichen physiologischen Infiltration von Myokardgewebe mit inflammatorischen Zellen bei Säuglingen und Kleinstkindern wurden das SIDS- sowie das Kontrollkollektiv zusammen beurteilt. Die auswertbare Fallzahl wurde um alle Myokarditisfälle, Myokarditis-Verdachtsfälle, immunhistochemisch und in HE auffällige Fälle sowie alle Fälle mit einer positiven Infektanamnese bereinigt. Somit standen für diese Betrachtung 56 Fälle zur Verfügung. Hier kann eine durchschnittliche zelluläre Infiltration von 3,24 Leukozyten, 0,74 T-Lymphozyten und 0,55 Makrophagen pro HPF mit geringer Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie E-selectin ermittelt werden (Tab. 18 und Abb. 85 und 86).

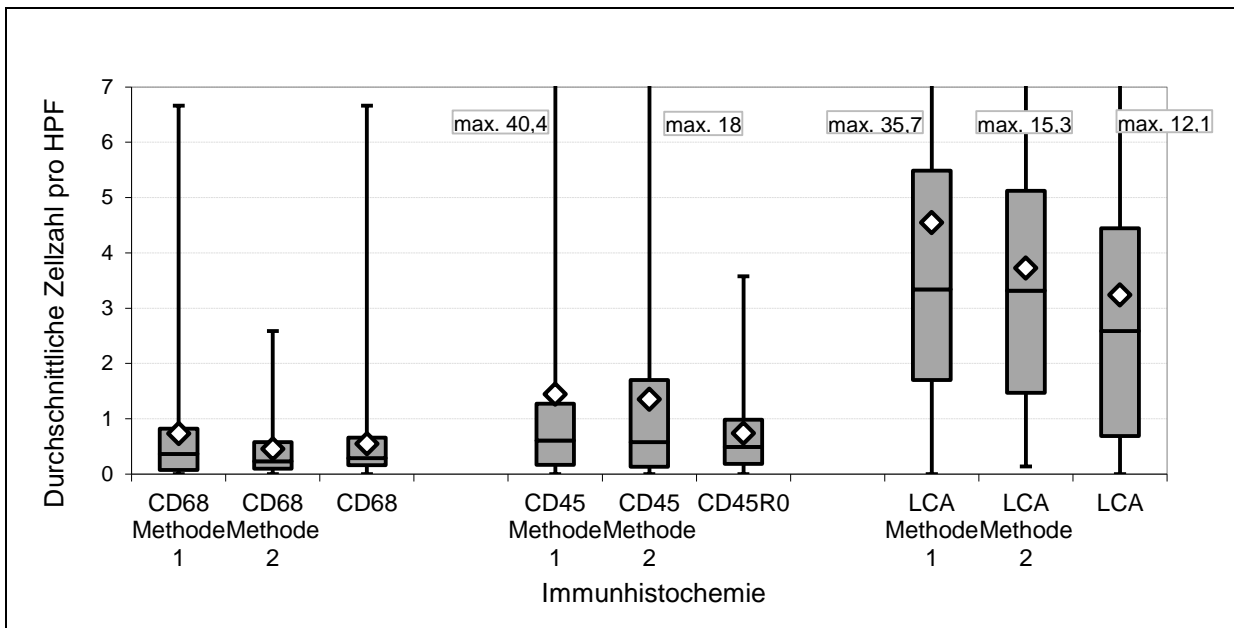
**Tab. 18:** Mittelwert, Standardabweichung und Median aller immunhistochemischen Marker für das bereinigte Kollektiv (n=56)

	<b>LCA</b>	<b>CD45R0</b>	<b>CD68</b>	<b>HLA</b>	<b>E-selectin</b>
Mittelwert	3,24	0,74	0,55	0,74	0,06
Median	2,59	0,49	0,29	0,69	0,02
Standardabw.	3,15	0,80	0,94	0,41	0,11

Werden die ermittelten durchschnittlichen Zellzahlen des bereinigten Kollektivs (n=56) mit denen des gesamten SIDS-Kollektivs (n=92) verglichen, so ergibt sich nur für die Leukozyten eine statistische Signifikanz. Jedoch ist diese mit einem p von 0,045 sehr knapp. Betrachtet man die bereinigten SIDS-Kollektive, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied in den durchschnittlichen Zellzahlen aller immunhistochemischen Marker (Anhang Tab. 24)



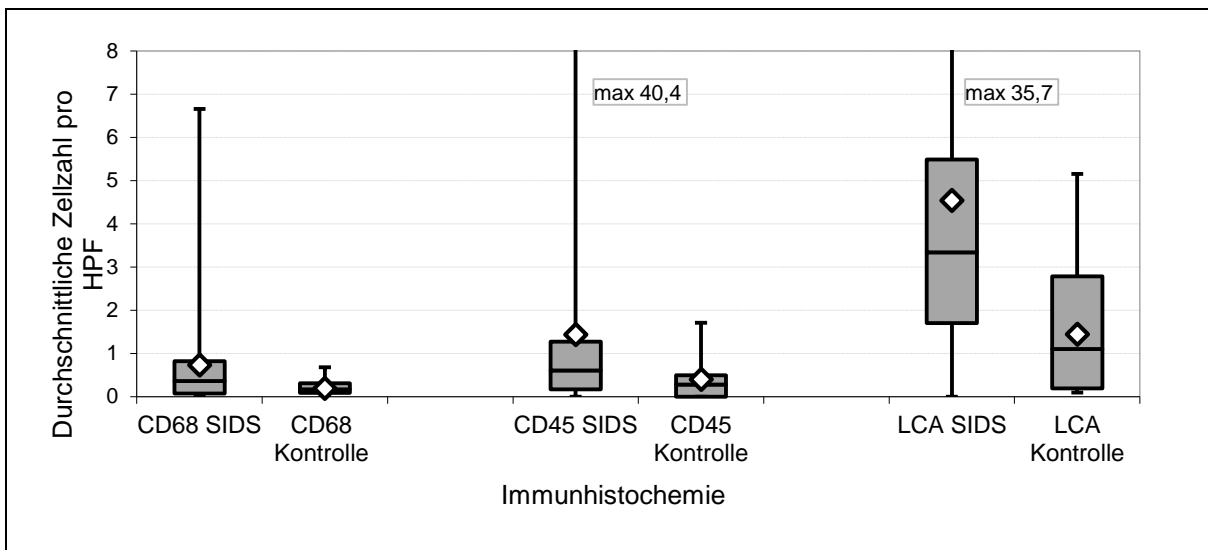
**Abb. 85:** Vergleich der Ergebnisse der Auswertung des bereinigten Kollektives (n=56) mit dem gesamten SIDS-Kollektiv (n=92): Mittelwerte der einzelnen immunhistochemischen Marker



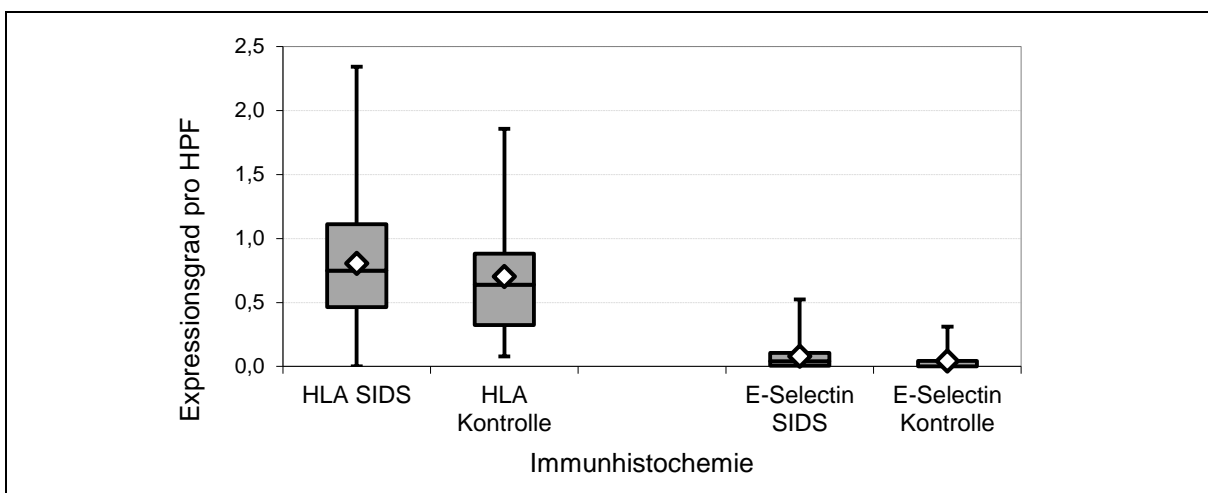
**Abb. 86:** Vergleich der Ergebnisse der Auszählung von Makrophagen, Lymphozyten und Leukozyten des gesamten SIDS-Kollektives nach Methode 1 (n=92) und Methode 2 (n=92) mit dem bereinigten Kollektiv (n=56)

#### 4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit zusammengefasst und graphisch dargestellt (Abb. 89 und 90). Es wird deutlich, dass die durchschnittlichen Zellzahlen für die Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen zwischen SIDS-Kollektiv und der Kontrollgruppe sichtbar unterscheiden, jedoch der Unterschied bei zwei Zellen für die Leukozyten und von maximal einer Zelle bei den Lymphozyten sehr gering ist.



**Abb. 87:** Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse für Makrophagen, Lymphozyten und Leukozyten des SIDS-Kollektives und des Kontrollkollektives



**Abb. 88:** Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse für HLA und E-Selectin des SIDS-Kollektives und des Kontrollkollektives

**Tab. 19:** Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Kollektive

		SIDS-Kollektive			Kontroll- kollektiv	bereinigtes Kollektiv
		Zellen/HPF				
		n=92	n=90	n=83	n=15	n=56
LCA	Median	4,54	4,16	3,97	1,45	3,24
	Mittelwert	3,34	3,59	3,59	1,10	2,59
	Standardabw.	4,86	3,27	3,11	1,57	3,15
CD45- R0	Median	1,44	0,99	1,01	0,40	0,74
	Mittelwert	0,61	1,35	1,36	0,28	0,49
	Standardabw.	4,33	0,6	0,61	0,47	0,8
CD68	Median	0,73	0,68	0,66	0,20	0,55
	Mittelwert	0,36	1,03	1	0,17	0,29
	Standardabw.	1,09	0,34	0,36	0,18	0,94
HLA	Median	0,81	0,78	0,8	0,70	0,74
	Mittelwert	0,75	0,44	0,48	0,64	0,69
	Standardabw.	0,46	0,74	0,78	0,49	0,41
E- selectin	Median	0,08	0,08	0,08	0,04	0,06
	Mittelwert	0,04	0,11	0,11	0,00	0,02
	Standardabw.	0,11	0,04	0,04	0,09	0,11

## 5. Diskussion

### 5.1 Größe des SIDS-Kollektivs

Die erfreuliche sinkende SIDS-Inzidenz in Deutschland und im Raum Bonn bedingt, dass retrospektive Studien einen großen Zeitraum umfassen müssen, um eine hinreichend hohe Fallzahl aufzuweisen. Die vorliegende Studie umfasst 92 Fälle in einem Zeitraum von 13 Jahren. Mit Blick auf ähnlich strukturierte Untersuchungen zum Thema Myokarditis beim plötzlichen Kindstod wird die Fallzahl als ausreichend eingeschätzt. Die von Krous et al. (2009) veröffentlichte Studie untersuchte 24 SIDS-Fälle von 1991-2005, hatte jedoch im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ein ebenso großes Kontrollkollektiv. Andere vergleichbare Studien wie zum Beispiel von Rasten-Almquist et al. (2002) untersuchten 437 Kinder, davon 313 Fälle von SIDS in einem Zeitraum von 17 Jahren. Dettmeyer (2004) untersuchte 63 SIDS-Fälle, 11 Kontrollfälle und 25 zusätzliche Fälle.

**Tab. 20:** Vergleich von vier Untersuchungen zum Thema Myokarditis beim plötzlichen Kindstod

	Krous, 2009	Dettmeyer, 2004	Oswald, 2014	Grasmeyer, 2014
Fälle	24 SIDS, 25 Ersticken, 3 Myokarditis	63 SIDS, 11 Kontrollfälle, 25 Zusatzkollektiv	92 SIDS, 15 Kontrollfälle	92 SIDS, 15 Kontrollfälle
Material	2 Myokardproben pro Fall	8 Myokardproben pro Fall	8 Myokardproben pro Fall	8 Myokardproben pro Fall
Vergrößerung	HPF	HPF	HPF	100fach
Form der Quantifizierung	20 HPF pro Fall, durchschnittlich 10 HPF pro Myokardprobe	20 HPF pro Fall, durchschnittlich 2,5 HPF pro Myokardprobe	160 HPF pro Fall, durchschnittlich 20 HPF pro Myokardprobe	80 x 1mm <sup>2</sup> pro Fall, durchschnittlich 20 HPF pro Myokardprobe
Immunhistoche- mische Zellen	CD3, CD68	LCA, CD45R0, CD68, HLA, E- selectin	LCA, CD45R0, CD68, HLA, E- selectin	LCA, CD45R0, CD68, HLA, E- selectin

## 5.2 Anzahl der ausgewerteten Myokardproben

Zur erforderlichen Anzahl von entnommenen Endomyokardbiopsien an vitalem Gewebe, mit der eine hinreichend repräsentative Untersuchung des Herzens gelingt, gibt es unterschiedliche Angaben. So empfehlen Baandrup et al. (1982) fünf Biopsien im rechten Ventrikel zu entnehmen, um den sampling error (Aretz et. al., 1987a) so gering wie möglich zu halten. Cooper et al. (2007) schlugen vor, von „mehr als einer Stelle des rechten Ventrikelseptums fünf bis zehn Proben von ein bis zwei mm<sup>3</sup> Größe zu entnehmen“. Dies entspräche einer maximal auswertbaren Myokardgröße von 10 mm<sup>3</sup> pro Fall. Im Vergleich dazu bieten Untersuchungen von post mortem gewonnenen Myokardproben die Möglichkeit, weitaus mehr Gewebe auf entzündliche Infiltrate hin zu analysieren und somit eine größere Repräsentanz zu erzielen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund von Bedeutung, da die virale Myokarditis häufig eine fokale Verteilung aufweist (Rasten-Almquist et al., 2002; Casali et al., 2012; Dettmeyer et al., 2004). Somit spielt der sampling error bei Endomyokardbiopsien eine größere Rolle.

Die meisten zur Verfügung stehenden Studien und Ergebnisse zum Thema Myokarditis untersuchen größtenteils Myokardgewebe von Erwachsenen. Dies erschwert die Vergleichbarkeit mit Myokardgewebe von Säuglingen unter einem Jahr aus der vorliegenden Arbeit. Es gibt drei Referenzstudien zu Myokarditis bei Säuglingen. Grasmeyer (2014) untersuchte dasselbe SIDS- und Kontrollkollektiv wie die vorliegende Arbeit und wertete durchschnittlich 80 mm<sup>2</sup> pro Fall aus (siehe auch Kapitel 3.2.1.2). Dettmeyer (2004) entnahm analog zur vorliegenden Arbeit bei Säuglingen unter einem Jahr an acht definierten Stellen Myokardproben und wertete 20 HPFs pro Fall verteilt über die acht Probeentnahmestellen aus. Krous et al. (2009) untersuchten durchschnittlich zwei Proben (linker Ventrikel und Septum interventrikulare) pro Säugling und zählten jeweils CD-3 Lymphozyten und Makrophagen in 20 kontinuierlichen HPFs aus. Sie bezogen ebenfalls Myozytolysen in ihre Beurteilung mit ein. Bis auf die Arbeiten von Dettmeyer und Grasmeyer ist eine genaue Berechnung der ausgewerteten Myokardfläche nicht zweifelsfrei möglich. Eine genaue Nachvollziehbarkeit der Auswahl der einzelnen Objektträger sowie der HPFs in ihrer Repräsentanz für die Gesamtauswertung ist ebenfalls nicht möglich.



In der vorliegenden Arbeit wurden 160 HPFs pro Fall ausgewertet. Bei einer maximalen Myokardprobengröße von 100mm<sup>2</sup> entspricht das ca. 5 % des Myokards pro Fall. Dies ist deutlich mehr Myokardfläche als bislang in vorangegangenen Studien untersucht wurde.

### **5.3 Auszählmethodik**

Die Auswahl der HPF pro Myokardprobe erfolgte zwar zufällig, jedoch gewährleistet das mäanderförmige Abtasten der Probe bei 20 HPFs bereits eine gute Abbildung der Fläche. Sicherlich könnte durch eine Erhöhung der Anzahl der HPFs pro Probeentnahmestelle ein unbeabsichtigtes Übersehen von Zellnestern verringert werden. Allerdings bleiben der Beginn der mäanderförmigen Auszählung in der PES und die anschließende Zählabfolge der weiteren HPFs auch dann dem Untersucher überlassen. Somit kann durchaus bei Erreichen der geforderten Anzahl an HPFs ein großer Teil der PES unberücksichtigt bleiben. Sinnvoll wäre es, die Verteilung der HPFs über der Probeentnahmestelle z. B. durch ein Computerprogramm vornehmen zu lassen. Ähnlich wurde dies bereits von Nielsen et al. (2014) vorgenommen.

### **5.4 Vergleich mit der Auszählmethode von Grasmeyer (2014)**

Durch den Vergleich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Auszählmethode mit der von Grasmeyer (2014) konnte gezeigt werden, dass beide Verfahren im Mittel fast identische Ergebnisse liefern, jedoch in der Betrachtung einzelner Fälle auch Abweichungen aufweisen. Ursachen für diese Unterschiede sind zum einen eine schlechte Differenzierung der Zellen gegenüber Artefakten, insbesondere bei starker Expression des Markers in der Probeentnahmestelle. Zum anderen sind die ausgezählten Flächen pro Einstellung nicht identisch. Dies wird vor allem an der Abbildung 83 Kapitel 4.8 sichtbar, in der die Verhältnisse der insgesamt ausgezählten Myokardfläche der Methoden zur Gesamtfläche einer Probeentnahmestelle dargestellt werden. Bei einer 100fachen Vergrößerung ist mehr Myokardgewebe im Gesichtsfeld sichtbar und es wird somit aufgrund der bereits erwähnten fokalen Anhäufungen durchschnittlich mehr unauffälliges Myokardgewebe ausgewertet. Die Differenzen in den Mittelwerten treten bei Fällen auf, die eine hohe zelluläre Infiltration aufweisen und somit bei Hochrechnung der Ergebnisse pro HPF auf 1 mm<sup>2</sup>, hohe Zellzahlen an Leukozyten, Makrophagen oder

Lymphozyten in den drei umliegenden Gesichtsfeldern angenommen werden. Dies ist jedoch in der Regel nicht der Fall, da häufig eine lokale Infiltration vorliegt, die nur 1-2 Gesichtsfelder umfasst. Somit wird diesen lokalen Infiltrationen bei der Hochrechnung ein zu großer Anteil an der gesamten Probeentnahmestelle zugemessen. Es ist somit nicht exakt möglich, über einen Umrechnungsfaktor die Flächen und damit Zellzahlen der beiden Methoden miteinander zu vergleichen und darüber eine Aussage über die Zählgenauigkeit zu treffen. Insgesamt, unter Ausschluss aller in HE auffälligen Fälle, handelt es sich jedoch lediglich um elf von 92 SIDS-Fällen, bei denen die ermittelten Zellzahlen zwischen beiden Auszählmethoden differieren. Darunter sind nur zwei Fälle, deren Differenz statistisch signifikant ist. Somit stimmen ungefähr 88 % der Mittelwerte der Fälle beider Methoden annähernd überein und es kann die Aussage getroffen werden, dass die Auszählung durch die beiden Verfahren valide ist.

Dennoch kann festgestellt werden, dass die Auszählung in  $\text{mm}^2$  die bessere Methode ist, da sie zum einen eine weitgehende Vergleichbarkeit erlaubt und zum anderen bei guter Färbetechnik die Erkennung der Zellen genauso gut ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass mehr Myokardfläche ausgewertet wird und die Wahrscheinlichkeit versehentlich übersehener Zellnester geringer ist.

## **5.5 Diagnosestellung Myokarditis anhand der DALLAS-Kriterien und Immunhistochemie**

Die Diagnose einer Myokarditis allein anhand der DALLAS-Kriterien zu stellen, wird in der jüngeren Zeit in der Fachwelt zunehmend als nicht ausreichend angesehen. Dies gilt insbesondere für die Anwendung an autoptisch gewonnenen Myokardproben. So beschreibt Kitulwatta et al. (2010), dass „die DALLAS-Kriterien niemals für post mortem Arbeiten gedacht waren und demnach ihre alleinige Anwendung zur Diagnosestellung einer Myokarditis in Obduktionsproben eventuell ungenügend ist“. Die Kritik an den DALLAS-Kriterien besteht im Wesentlichen darin, dass sie eine starke Abhängigkeit von der Expertise des Untersuchers aufweist und Zusatzinformationen wie Anamnese und Klinik unberücksichtigt lässt (Baughman, 2006; Shanes et al., 1987; Feldman et al., 2000). Vor allem die Annahme, den Nachweis einer viralen Myokarditis allein anhand der DALLAS-Kriterien zu stellen, erscheint vielen Autoren fraglich (Baughmann, 2008; Dettmeyer et al.,

2002). Die Immunhistochemie hat sich im vergangenen Jahrzehnt als Methodik zum Nachweis inflammatorischer Zellen bei Myokarditis etabliert. Vor allem bei bioptisch gewonnenen Myokardproben und unmittelbarer Bearbeitung erlaubt sie eine bessere und einfachere Differenzierung der verschiedenen inflammatorischen Zellen (Kandolf, 2011).

Der Nachweis einer Myokarditis ist vor allem im Fall von Borderline-Myokarditis schwierig, da sie häufig ein fokales Verteilungsmuster aufzeigt (Rasten-Almquist et al., 2002; Casali et al., 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich in einigen Fällen eine fokale Anhäufung inflammatorischer Zellen bei sonst eher unauffälligem Myokardgewebe. Zum Teil zeigt auch nur ein kleiner Teil einer einzelnen PES hohe Zellzahlen. Diese Schwankungen der zellulären Infiltration von PES zu PES sowie innerhalb einer PES ergeben im Mittel jedoch für den jeweiligen Fall eine geringe durchschnittliche Anzahl inflammatorischer Zellen und bleiben somit unberücksichtigt. Aufgrund der, in der Kontrollgruppe ebenfalls vorhandenen, fokalen Zellanhäufungen kann festgestellt werden, dass eine hohe Anzahl inflammatorischer Zellen in wenigen HPFs sicherlich nicht zum Tode führt. Weisen jedoch mehrere PES grenzwertüberschreitende Lymphozytenzahlen auf, so ist nicht sicher, ob diese letal waren, insbesondere, wenn nur die Lymphozytenzahlen an sich als alleiniges Entscheidungskriterium herangezogen werden. Die Bildung eines Mittelwertes über die ermittelten Zahlen inflammatorischer Zellen über alle PES als Entscheidungskriterium für oder gegen das Vorliegen einer Myokarditis ist daher nicht sinnvoll.

Aus den Untersuchungen ergibt sich somit, dass die Immunhistochemie zwar ein geeignetes diagnostisches Mittel ist, zelluläre Infiltrate nachzuweisen, die Diagnose einer Myokarditis sollte jedoch nicht allein durch sie gestellt werden. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen. So publizierten Casali et al. (2012) eine Studie, die mittels eines Punkte-Systems die Unterscheidung zwischen einer letalen Myokarditis und einer zufällig nachgewiesenen vereinfachen soll (Tab. 21). Sie untersuchten autoptisch gewonnene Myokardproben von 32 Fällen (Gruppe A), bei denen in der Obduktion als Nebenbefund eine Myokarditis bei bekannter anderweitiger Todesursache gefunden wurde, sowie 26 Fälle (Gruppe B) mit Myokarditis als alleinige Todesursache. Ihre Untersuchungen schließen jedoch nur Erwachsene ein. In dieser Studie bewerteten sie nicht nur die entzündlichen Infiltrate sondern auch histologische Kriterien wie Myozytolysen,

interstitielles Ödem und Fibrose, perivaskuläre Entzündung und Hämorrhagien sowie die Ausbreitung und Lokalisation der Entzündung. Zusätzlich bezogen sie Obduktionsbefunde und eine präklinische Anamnese mit ein. Dabei wies die Gruppe B häufiger isolierte oder kombinierte kardiale Symptome in der Vorgeschichte auf. Des Weiteren korrelierte in dieser Gruppe die Häufigkeit von anamnestischen Hinweisen für eine Myokarditis mit den makroskopischen Befunden in der Autopsie, während dies in Gruppe A nicht der Fall war. Ab einer Punktzahl von  $\geq 2$  liegt eine letale Myokarditis vor (siehe Tab. 21). In der vorliegenden Arbeit weist ein Fall (Fall 75) immunhistochemisch gemäß den WHO-Kriterien eine Myokarditis auf, ist jedoch sonst in HE sowie in der Obduktion unauffällig, und kann gemäß dem Punktesystem der Kategorie „zufällige Begleitmyokarditis ohne Todesfolge“ zugeordnet werden.

**Tab. 21:** Punktesystem von Casali et al. (2012)

	signifikante Eigenschaften für Myokarditis	Anzahl betroffener Areale	Punkte
1	anamnestisch kardiale Hinweise ohne Erkältungssymptome	-	0.5
	anamnestisch kardiale Hinweise mit Erkältungssymptomen	-	1
2	akute Befunde am Herzen bei der makroskopischen Untersuchung	-	1
3	Myozytennekrose	1	1
		2	2
		≥3	3
4	Interstitielles Ödem	1-2	1
		3	1.5
		4-5	2
5	Infiltration von Neutrophilen ohne perivaskuläre Zellanhäufung	-	0.5
	Infiltration von Neutrophilen mit perivaskulärer Zellanhäufung	-	1

## 5.6 Myokarditis beim plötzlichen Kindstod

Für die Myokarditisiagnostik bei Erwachsenen gibt es, wie bereits erwähnt, Grenzwerte, bei deren Überschreiten eine Myokarditis als gesichert gilt. Die Anwendung derselben Grenzwerte zur Myokarditisiagnostik bei Säuglingen und Kleinstkindern ist nicht etabliert, da es Studien gibt, die bei Säuglingen und Kleinstkindern per se eine vereinzelte Infiltration des Herzmuskels mit inflammatorischen Zellen ohne Krankheitswert vermuten (Krous et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit ergab die Auswertung des SIDS-Kollektives mittels konventioneller Histologie unter Verwendung der DALLAS-Kriterien eine Myokarditis-Inzidenz von nur 2,2 % (2 von 92 Fällen) mit Auffälligkeiten in allen gewonnenen PES. Nur einer dieser beiden Fälle weist auch in der Immunhistochemie in allen Markern (T-Lymphozyten, Leukozyten, Makrophagen, MHC-Klasse-II-Moleküle) stark erhöhte

Zellzahlen auf, die gemäß der WHO-Kriterien ( $>14$  Zellen/mm<sup>2</sup>; T-Lymphozyten und Makrophagen, zusätzlich erhöhte MHC-Klasse-II-Expression) die Diagnose einer Myokarditis erlauben (Kindermann et al., 2012). Allerdings ist dieser Grenzwert zum einen auf Endomyokardbiopsien von Erwachsenen bezogen und zum anderen nicht, wie in dieser Arbeit, auf HPF bezogen, wodurch die auf einen mm<sup>2</sup> hochgerechneten Zahlen nicht eins zu eins vergleichbar sind (hierzu siehe Kapitel 4.8). Der andere Fall kann mit ca. 30 Zellen/mm<sup>2</sup> (Summe der T-Lymphozyten und Makrophagen hochgerechnet auf einen mm<sup>2</sup>) ebenfalls als Myokarditis gewertet werden, allerdings weist er nur eine geringe HLA-Expression auf. Somit stimmt in zwei der 92 Fälle die immunhistochemische Auswertung mit den gefundenen histologischen Veränderungen im Sinne einer Myokarditis überein. Werden nur die immunhistochemischen Ergebnisse betrachtet, so weisen 14 Fälle durchschnittlich mehr als 14 Zellen/mm<sup>2</sup> (Summe aus T-Lymphozyten und Makrophagen) auf. Dies entspräche einer Myokarditis-Inzidenz bei Fällen von SIDS von 15,2 %. Nur vier dieser Fälle erfüllen auch das Kriterium einer moderaten HLA-Klasse-II-Expression. Fünf von ihnen waren zum Zeitpunkt des Todes erkältet gewesen. Foley und Edwards (1988) setzten anhand ihrer Ergebnisse einen oberen Wert von 5,0 Lymphozyten/HPF, ab dessen Überschreiten die Diagnose einer Myokarditis als gesichert angesehen werden kann. Liegen die Zählergebnisse jedoch darunter, so müssen zusätzlich lymphozytäre Zellnester mit angrenzender Myozytennekrose oder -schädigung vorliegen. Auch sie bezogen in ihren Untersuchungen hauptsächlich Erwachsene ein. In der vorliegenden Arbeit weisen nur zwei Fälle mehr als fünf Lymphozyten/HPF auf und die Myokarditis-Inzidenz bleibt bei 2,2 %. Es konnte in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Myokarditisinzidenz festgestellt werden (siehe Beckwith, 1973; DeSa, 1985, Krous et al., 2009; Noren et al., 1977, Weber et al.; 2008)

Ob die Grenzwerte der WHO in der Myokarditisdiagnostik auch auf Säuglinge übertragen werden können, konnte auch in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings macht das Festlegen von Grenzwerten bei Säuglingen und Kleinstkindern wie sie z. B. Dettmeyer (2004a) vorschlug wenig Sinn, insbesondere wenn sie anhand der Mittelwerte der ermittelten Zellzahlen des untersuchten Kollektivs entstanden sind. Zudem gibt es keine hinreichenden Untersuchungen mit ausreichend großem Studienkollektiv, die die Verteilung und Intensität inflammatorischer Zellen im Myokardgewebe von Säuglingen darstellen und auch keine Referenzwerte, ab denen eine Pathologie vorliegt.

Andererseits gilt als sicher, dass eine „milde Inflammation des Myokards, egal ob ein ursächliches Agens identifiziert wurde oder nicht, nicht zwangsweise letal sein muss.“ (Krous et al., 2009). Um genau einen solchen durchschnittlichen Wert einer nicht letalen myokardialen Inflammation zu erstellen, wurden in der vorliegenden Arbeit diejenigen Fälle des SIDS- sowie des Kontrollkollektives ausgewertet, die keine histologischen oder makroskopischen Auffälligkeiten sowie keine Erkältung in der Vorgeschichte aufwiesen. In diesem 63 Fälle umfassenden, bereinigten Kollektiv ergab sich eine durchschnittliche lymphozytäre Infiltration von 0,75 Zellen/HPF. Das reine Kontrollkollektiv (n=15) weist mit durchschnittlich 0,4 T-Lymphozyten/HPF eine vergleichbare zelluläre Infiltration auf. Im gesamten SIDS-Kollektiv (n=92) finden sich durchschnittlich 1,44 T-Lymphozyten pro HPF. Die Unterschiede sind somit gering und statistisch nicht signifikant. Krous et al. (2009) konnten ebenfalls keinen Unterschied in der Lymphozyteninfiltration zwischen der Gruppe von SIDS-Fällen und jener mit Erstickungsfällen nachweisen.

### **5.7 Interpretation HLA und E-selectin**

Eine vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und E-selectinen konnte in dem SIDS-Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich nur in zwei Fällen eine Korrelation der Stärke der Expression zur Höhe der Zellzahlen von T-Lymphozyten und Leukozyten (siehe Tab. 9). In den anderen 6 Fällen, die eine erhöhte Lymphozyteninfiltration aufweisen, ist die Expression gering. Devaux et al. (1997) konnten ebenfalls in ihrer Untersuchung keine Expression von E-selectinen im Myokard bei chronischen inflammatorischen Prozessen nachweisen. Ihre Begründung beruht auf den Untersuchungsergebnissen von Scholz et al. (1999), welche anhand von Interleukin-1-beta-stimulierten Zellen aus Umbilicalvenen zeigten, dass E-selectin seine höchste Aktivität nach 2-4 Stunden zeigt. Tritt der Tod erst später ein, kann der Nachweis einer vermehrten Expression bei autopsisch gewonnenen Myokardproben nicht mehr eindeutig erbracht werden. Auch Seko et al. (1990) konnten keine erhöhte MHC-Klasse-II-Expression bei virusassoziierten Myokarditiden nachweisen.

## 6. Zusammenfassung

Der plötzliche Kindstod ist weiterhin ein Phänomen, dessen Ursache bislang immer noch weitgehend ungeklärt ist und als Ausschlussdiagnose gestellt wird. Die vielen Theorien, die wiederum Anreiz für weitere Forschungen waren und somit neue Erklärungsansätze lieferten, zeigen, dass bislang keine übergreifende Akzeptanz in der Fachwelt für die eine oder andere These vorliegt. Dies treibt die Forschung auf diesem Gebiet weiter voran und erklärt, warum es immer noch interessant und lohnenswert ist, sich mit der Thematik zu befassen.

Im Laufe der Zeit hat jedoch die „triple risk hypothese“ als ein Erklärungsmodell an Bedeutung gewonnen. Dabei spielen Infektionen eine entscheidende Rolle, sodass auch eine Myokarditis als mögliche Ursache in Erwägung gezogen werden kann. Insbesondere, da sie die häufigste Ursache für einen plötzlichen Tod bei jungen Menschen darstellt (Kitulwate et al., 2010).

In dieser Arbeit sollten zum einen mittels immunhistochemischer Quantifizierung von interstitiellen inflammatorischen Zellen die Myokarditis-Inzidenz in einem SIDS-Kollektiv ermittelt und zum anderen zwei Auszählmethoden miteinander verglichen werden. Des Weiteren galt es zu prüfen, ob allein durch die Immunhistochemie oder die konventionelle Diagnostik mittels DALLAS-Kriterien die Diagnose einer Myokarditis gestellt werden kann. Ergänzend wurde dabei diskutiert, ob Grenzwerte der inflammatorischen Zellen als Entscheidungskriterium sinnvoll sind.

Es wurde ein Kollektiv von 92 SIDS Fällen sowie ein altersgleiches Kontrollkollektiv von 15 Säuglingstodesfällen untersucht. Die konventionell-histologische Untersuchung erfolgte mittels HE-Färbung und wurde nach den DALLAS-Kriterien ausgewertet. Für die Quantifizierung interstitieller Leukozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen wurden die Marker LCA, CD45R0 und CD68 verwendet. Darüber hinaus erfolgte eine semi-quantitative Auszählung einer HLA- und E-selectin-Expression. Es lag jeweils Myokardgewebe von acht definierten Stellen im Herzen (A-H) vor, welche jeweils in 20 HPFs quantifiziert wurden. Daneben wurden die Zählergebnisse von Grasmeyer (2014) mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit verwendeten Auszählmethode verglichen. Bei Grasmeyer (2014) erfolgte die quantitative Auszählung mit Hilfe eines 1 mm<sup>2</sup> großen Rechteckes bei 100facher Vergrößerung an zehn Loci pro Probeentnahmestelle.



In dem SIDS-Kollektiv konnte keine erhöhte Myokarditis-Inzidenz gefunden werden. Die durchschnittlichen Zellzahlen waren zwar für die Lymphozyten, Leukozyten und Makrophagen statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe, jedoch bestand der Unterschied in nur einer bis zweieinhalb Zellen/HPF und kann somit als klinisch irrelevant betrachtet werden. Ebenso zeigte sich keine erhöhte HLA- und E-selectinexpression, insbesondere kann keine einheitliche Korrelation der Expression zur Höhe der immunhistochemischen Zellen nachgewiesen werden. Der Vergleich mit den Zellzahlen einer möglichen „physiologischen“ Infiltration von inflammatorischen Zellen zeigt, dass das untersuchte SIDS-Kollektiv ohne die beiden gesicherten Myokarditisfälle fast identische Zellzahlen/HPF aufweist.

Die Verwendung des Mittelwertes als Maßstab für die Diagnosestellung wird als nicht sinnvoll erachtet, da gezeigt werden konnte, dass häufig fokale Entzündungsnester vorliegen, bei sonst eher unauffälligem Myokard, die in ihrer Pathogenität nicht berücksichtigt werden und somit und auch nicht geklärt werden können. Demzufolge ist die Bildung eines Grenzwertes für die immunhistochemischen Zellen als alleiniges Entscheidungskriterium gegen oder für das Vorliegen einer Myokarditis ebenfalls nicht sinnvoll. Die Immunhistochemie ist geeignet, aufgrund der geringeren Interobservervariabilität, zelluläre Infiltrate zu quantifizieren, jedoch sollte die Diagnose einer Myokarditis nicht durch sie allein gestellt werden. Hier ist die Kombination aus Höhe der zellulären Infiltration mit den histologischen Veränderungen sowie die Berücksichtigung der Anamnese, wie sie z. B. Casali et al. (2012) vorschlägt, eine praktikablere Lösung. Um repräsentative Grenzwerte für Säuglinge zu ermitteln, sollte ein vielfach größeres Studienkollektiv untersucht werden.

## 7. Anhang, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 7.1 Anhang

**Tab. 22:** SIDS-Kollektiv mit Darstellung einiger Merkmale

SIDS Fall	Alter in Tagen	Geschlecht	Nationalität	Besonderheiten
1.	221	weiblich	deutsch	keine
2.	82	männlich	deutsch	Erkältung
3.	125	männlich	türkisch	keine
4.	233	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett, von Decke bedeckt, Erkältung
5.	216	männlich	deutsch	am Vortag erbrochen, von Decke bedeckt
6.	275	männlich	deutsch	von Decke bedeckt, Erkältung, nach Geburt Infektion
7.	226	männlich	syrisch	Speichel vor dem Mund, Erkältung
8.	209	männlich	deutsch	Frühgeburt
9.	140	weiblich	deutsch	Erkältung, Rotavirus gehabt
10.	100	männlich	deutsch	keine
11.	272	männlich	deutsch	von Decke bedeckt, Erbrochenes im Mund, Erkältung, Bronchialasthma
12.	177	männlich	deutsch	von Decke bedeckt
13.	58	weiblich	deutsch	Mund im Kopfkissen, Nasenbluten
14.	146	weiblich	deutsch	Magen-Darm-Grippe gehabt, vor 2 Wochen 5-fach-Impfung erhalten
15.	30	weiblich	deutsch	keine
16.	43	weiblich	deutsch	Gesicht im Kissen, Erkältung, Mutter während Schwangerschaft geraucht
17.	221	männlich	deutsch	ausgeheilte Bindehautentzündung, spastische Bronchitis
18.	211	männlich	deutsch	von Decke bedeckt
19.	36	männlich	deutsch	Gesicht im Kissen, Frühgeborenes, Erkältung

20.	142	weiblich	deutsch	vor 4 Wochen 6-fach-Impfung, Frühgeborenes
21.	67	männlich	deutsch	Mutter in der Vergangenheit drogenabhängig gewesen
22.	125	weiblich	deutsch	plötzliche Zyanose, Mutter drogenabhängig und Hep. A,B,C positiv
23.	325	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett, fiebrige Erkältung
24.	91	männlich	deutsch	vor 2 Wochen Impfung, Erkältung
25.	305	weiblich	deutsch	bräunlich-schwarze Antragungen im Gesicht, Mutter Nikotinabusus
26.	131	männlich	albanisch	wässrig-schwärzlich erbrochen, wenige Tage zuvor stationäre Behandlung aufgrund eines Infekts der oberen Atemwege
27.	371	männlich	türkisch	wässrig-schwärzlich erbrochen, fibrigen Virusinfekt durchgemacht
28.	292	männlich	deutsch	von Decke bedeckt, verschleimte Bronchien
29.	162	männlich	deutsch	von Decke bedeckt, Zwillingengeborenes, Frühgeburt mit Atemnotsyndrom, Zustand nach Schädel-Hirn-Trauma
30.	68	weiblich	deutsch	vor 4 Tagen 6-fach-Impfung
31.	77	weiblich	deutsch	SIDS in der Familie (Kind der Schwester der Mutter), vor 2 Wochen Impfung erhalten
32.	43	männlich	deutsch-togo	intensivmedizinische Behandlung, nach 17 Tagen Hirntod festgestellt
33.	58	männlich	deutsch	Fieber gehabt
34.	250	männlich	deutsch	Kopf teilweise von Decke bedeckt, feuchte Kleidung, Erkältung
35.	80	männlich	deutsch	vor 14 Tagen Erkältung gehabt
36.	112	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett
37.	203	männlich	deutsch	röchelnde Atmung, blau-graue Gesichtsfarbe, Bakteriennachweis im Liquor und Blut
38.	52	weiblich	deutsch	bläuliche Gesichtsfarbe, Nasenbluten, Mutter hat während der Schwangerschaft geraucht

39.	42	männlich	deutsch	nicht behandlungsdürftige Herzgeräusche
40.	76	männlich	deutsch	adipöser Säugling, Erkältung
41.	7	weiblich	deutsch	Mutter in der Vergangenheit drogenabhängig gewesen
42.	181	weiblich	persisch-deutsch	Kopf unter Decke, Spucktuchzipfel im Mund, Mutter stattgebater BTM-Abusus
43.	138	weiblich	deutsch	near missed SIDS
44.	63	weiblich	asiatisch	Sekretpfütze neben dem Gesicht, gelegentlich Luftnot
45.	43	männlich	deutsch	keine
46.	82	männlich	deutsch	schaumiges Sekret vor der Nase
47.	60	weiblich	deutsch	im Erbrochenen gelegen, vor 3 Wochen fiebriger Infekt, immer noch Husten
48.	79	männlich	deutsch	Blut im Erbrochen, bereits einmal Atemstillstand gehabt
49.	177	weiblich	deutsch	reichlich Erbrochenes, Decke über dem Kopf
50.	108	männlich	deutsch	Gedeihstörung, plötzlich Husten, Dyspnoe, Erbrechen und sofortige Leblosigkeit
51.	93	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett
52.	53	männlich	deutsch	Herzgeräusch
53.	244	männlich	deutsch	von Bettdecke bedeckt, Reanimation durchgeführt
54.	156	männlich	türkisch	Bronchitis
55.	78	weiblich	deutsch	Vorstellung am Todestag im Krankenhaus wegen Unruhe und starkem Schreien, keine Auffälligkeiten gefunden
56.	69	weiblich	deutsch	von Decke bedeckt
57.	154	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett, Frühgeborenes, Nikotinabusus der Eltern
58.	341	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett, Amnioninfektionssyndrom
59.	41	weiblich	deutsch	leichte Erkältung

60.	69	weiblich	deutsch	durchgeschwitzt, Geschwisterkind erkältet gewesen
61.	59	weiblich	türkisch	bläuliche Gesichtsfärbung, leichte Erkältung, am Vortag 6-fach-Impfung
62.	123	männlich	deutsch	6-fach-Impfung erhalten
63.	55	weiblich	deutsch	keine
64.	116	männlich	deutsch	Vor einer Woche 6-fach-Impfung, SIDS-Fall bei Cousine
65.	26	männlich	türkisch	keine
66.	56	männlich	deutsch	Mutter Asthmatikerin u. Epileptikerin, Raucherin, Kind leichte Erkältung
67.	365	weiblich	deutsch	durchgeschwitzt
68.	39	weiblich	deutsch	keine
69.	226	weiblich	deutsch	keine
70.	64	männlich	türkisch	durchgeschwitzt, leichtes Atemröcheln in den letzten Tagen, Frühgeborenes
71.	258	männlich	deutsch	Dauenendecke über Kopf
72.	127	männlich	deutsch	blassbläulich, Seit 3-4 Wochen Erkältung, Frühgeborenes, immer wieder Schweißausbrüche
73.	95	männlich	deutsch	Frühgeborenes
74.	202	männlich	deutsch	Kind wurde erfolgreich reanimiert, nach 7 Tagen Feststellung des Hirntodes
75.	111	männlich	deutsch	keine
76.	13	männlich	deutsch	beim Stillen in den Armen der Mutter verstorben
77.	287	männlich	deutsch	keine
78.	16	weiblich	deutsch	Erkältung gehabt
79.	105	weiblich	deutsch	von Decke bedeckt
80.	32	männlich	deutsch	Blut im Mund, stark verschwitzt
81.	255	männlich	deutsch	lange Schlafdauer
82.	165	männlich	türkisch	von Decke bedeckt, vor 2 Monaten Pneumonie, vor kurzer Zeit Impfung erhalten

83.	41	männlich	deutsch	Erbrochenes im Bett, starker Nikotinkonsum in der Wohnung
84.	56	männlich	deutsch	keine
85.	28	weiblich	deutsch	SIDS-Fall in Familie, Frühgeburt
86.	78	männlich	deutsch	Kind habe in den letzten Wochen stark geschwitzt, Zyanoseanfälle beim Schreien klinisch bestätigt, Mutter drogenabhängig gewesen
87.	54	weiblich	deutsch	Kopf von Kissen bedeckt
88.	323	weiblich	türkisch	Erbrochenes im Bett
89.	114	männlich	deutsch	weißliche Flüssigkeit in der Nase
90.	24	männlich	deutsch	schaumig rötliche Flüssigkeit aus Nase ausgetreten
91.	14	männlich	deutsch	rötlich schaumiges Blut an Nase und Mund
92.	92	männlich	deutsch	am Vortag die U4 mit zwei Impfungen, hatte etwas Schnupfen

**Tab. 23:** Altersgleiche Kontrollfälle (n= 15), Todesursachen

SIDS Fall	Alter in Tagen	Geschlecht	Nationalität	Besonderheiten
1.	347	weiblich	deutsch	Hirnblutung
2.	267	männlich	deutsch	Hirnblutung
3.	294	weiblich	deutsch	Meningitis
4.	64	weiblich	ecuadoria.	Sepsis
5.	158	männlich	deutsch	Hirntod
6.	271	weiblich	deutsch	Rauchgasintoxikation
7.	294	männlich	deutsch	Rauchgasintoxikation
8.	181	weiblich	deutsch	Hirntod
9.	195	weiblich	deutsch	Medikamentenintoxikation
10.	230	weiblich	russisch	Sepsis
11.	391	weiblich	deutsch	Ertrinken
12.	342	männlich	deutsch	atypisches Erhängen

13.	50	männlich	deutsch	Hirnblutung
14.	66	weiblich	italienisch	Schädelhirntrauma
15.	255	männlich	deutsch	Strangulation

**Tab. 24:** Signifikanzprüfung der verschiedenen Kollektive (SIDS gesamt, SIDS ohne Myokarditisfälle, SIDS ohne alle in HE auffälligen Fälle, SIDS Methode 2) mit dem bereinigten Kollektiv (n=56)

	LCA	CD45R0	CD68	HLA	E-selectin
SIDS gesamt vs. bereinigtes Kollektiv (n=56)	p= 0,045	p=0,33	p=0,58	p=0,58	p=0,09
SIDS ohne Myokarditis (n=90) vs. bereinigtes Kollektiv (n=56)	p= 0,06	p= 0,44	p= 0,73	p=0,73	0,08
SIDS ohne auffällige Fälle (n=83) vs. bereinigtes Kollektiv (n=56)	P= 0,14	p=0,43	p=0,87	p= 0,50	p= 0,11
SIDS gesamt Methode 2 (n=92) vs. bereinigtes Kollektiv (n=56)	p= 0,05	p= 0,33	p= 0,58	p= 0,58	p= 0,10

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Als Myokarditis verschlüsselte Anzahl Todesfälle 2012 in Deutschland.....	15
<b>Tab. 2:</b> Myokadprobeentnahmestellen Säuglingsherz .....	26
<b>Tab. 3:</b> Graduierung von HLA und E-selectin .....	29
<b>Tab. 4:</b> Semiquantitative Auszählung .....	40
<b>Tab. 5:</b> Histologische Besonderheiten der neun auffälligen SIDS-Fälle.....	44
<b>Tab. 6:</b> Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv mittels Mann-Whitney-U-Test für nicht parametrische, unverbundene Stichproben.....	56
<b>Tab. 7:</b> Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv .....	65
<b>Tab. 8:</b> Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv .....	73
<b>Tab. 9:</b> Darstellung der Fälle gefiltert nach HLA-Expression und Leukozyteninfiltration: Fall 4 und 10: Myokarditis in HE, Korrelation einer erhöhten zellulären Infiltration in HE sowie immunhistochemisch mit der HLA-Expression; Fall 8: Ödem und erhöhte zelluläre Infiltration in HE aber keine erhöhte zelluläre Infiltration in der Immunhistochemie sowie sehr geringe HLA-Expression .....	78
<b>Tab. 10:</b> Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive mit dem Kontrollkollektiv .....	83
<b>Tab. 11:</b> SIDS-Fälle mit mäßiger E-selectinexpression .....	87
<b>Tab. 12:</b> Ergebnis der semiquantitativen Auswertung für E-selectin bereinigt um die Myokarditisfälle sowie die übrigen in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47).....	89
<b>Tab. 13:</b> Signifikanzprüfung getrennt für die jeweiligen SIDS-Kollektive.....	91
<b>Tab. 14:</b> Mittelwerte für die Färbungen LCA, CD45-R0 und CD68 je Kollektiv und Methode .....	93



<b>Tab. 15:</b> U-Test für nicht parametrische unverbundene Stichproben jeweils für LCA, CD45-R0, CD68 an den Methoden 1 und 2 für das gesamte SIDS-Kollektiv: der Unterschied ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).....	95
<b>Tab. 16:</b> Darstellung der SIDS-Fälle je Färbung, deren Mittelwerte um mehr als drei Zellen/HPF bei LCA und CD45R0 bzw. mehr als zwei Zellen/HPF bei CD68 zwischen den beiden Auszählmethoden differieren; Differenz mit positivem Vorzeichen: Mittelwert bei Methode 1 höher; Differenz mit negativem Vorzeichen: Mittelwert bei Methode 2 höher; grau unterlegt: Fall in HE auffällig (Ödem, erhöhte zelluläre Infiltration, eindeutige Myokarditis).....	96
<b>Tab. 17:</b> Auflistung der SIDS-Fälle, die beim Vergleich der Mittelwerte der beiden Auszählmethoden einen statistisch signifikanten Unterschied in einer der drei immunhistochemischen Färbungen aufweisen .....	98
<b>Tab. 18:</b> Mittelwert, Standardabweichung und Median aller immunhistochemischen Marker für das bereinigte Kollektiv (n=56).....	99
<b>Tab. 19:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Kollektive .....	102
<b>Tab. 20:</b> Vergleich von vier Untersuchungen zum Thema Myokarditis beim plötzlichen Kindstod .....	103
<b>Tab. 21:</b> Punktesystem von Casali et al. (2012) .....	109
<b>Tab. 22:</b> SIDS-Kollektiv mit Darstellung einiger Merkmale .....	114
<b>Tab. 23:</b> Altersgleiche Kontrollfälle (n= 15), Todesursachen .....	118
<b>Tab. 24:</b> Signifikanzprüfung der verschiedenen Kollektive (SIDS gesamt, SIDS ohne Myokarditisfälle, SIDS ohne alle in HE auffälligen Fälle, SIDS Methode 2) mit dem bereinigten Kollektiv (n=56).....	119

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Statistisches Bundesamt: Inzidenz des Plötzlichen Kindstodes von 1991-2009 und Anteil an Lebendgeburten .....	11
<b>Abb. 2:</b> Leukozytenrolling (aus Siegenthaler und Blum, 2006 nach Butcher und Picker, 1996).....	22
<b>Abb. 3:</b> Überführung des Herzgewebes der acht PES in die Uni-Kassetten .....	26
<b>Abb. 4:</b> Heraustrennen des Herzgewebes für die jeweilige PES.....	27
<b>Abb. 5:</b> LCA in 1000facher Vergrößerung .....	31
<b>Abb. 6:</b> LCA in 400facher Vergrößerung .....	32
<b>Abb. 7:</b> CD45-R0 in 1000facher Vergrößerung .....	33
<b>Abb. 8:</b> CD45-R0 in 400facher Vergrößerung .....	33
<b>Abb. 9:</b> CD68 in 1000facher Vergrößerung.....	34
<b>Abb. 10:</b> CD68 in 400facher Vergrößerung.....	35
<b>Abb. 11:</b> HLA in 400facher Vergrößerung, schwache Färbung + .....	36
<b>Abb. 12:</b> HLA in 400facher Vergrößerung, moderate Färbung ++.....	36
<b>Abb. 13:</b> HLA in 400facher Vergrößerung, starke Färbung +++ .....	37
<b>Abb. 14:</b> E-selectin in 400facher Vergrößerung, schwache Färbung + .....	37
<b>Abb. 15:</b> E-selectin in 400facher Vergrößerung, moderate Färbung ++ .....	38
<b>Abb. 16:</b> E-selectin in 100facher Vergrößerung, starke Färbung +++ .....	38
<b>Abb. 17:</b> HE in 400facher Vergrößerung .....	39
<b>Abb. 18:</b> Anzahl von SIDS-Fällen der Bonner Rechtsmedizin von 1997-2009.....	41
<b>Abb. 19:</b> links: Monatliche absolute Verteilung; rechts: Jahreszeitliche relative Verteilung der SIDS-Fälle.....	42
<b>Abb. 20:</b> Verteilung des Todesalters in Tagen .....	42

<b>Abb. 21:</b> Angaben zur relativen Lageverteilung: A: gesamtes SIDS-Kollektiv, B: nur diejenigen Fälle, bei denen eine Angabe zur Lage vorlag.....	43
<b>Abb. 22:</b> Fall 4, HE, G, 100fache Vergrößerung: Nachweis eines interstitiellen Ödems, lymphomonozytärer Infiltrate sowie Myozytolysen und Nekrosen .....	44
<b>Abb. 23:</b> Fall 10, HE, G, 400fache Vergrößerung: ödematöses Interstitium mit dichtem, überwiegend lymphomonozytärem Infiltrat.....	45
<b>Abb. 24:</b> Fall 10, HE, A, 400fache Vergrößerung: nekrotische Myokardfasern .....	45
<b>Abb. 25:</b> Fall 8, HE, H, 400fache Vergrößerung: zelluläre Infiltration, Ödem .....	46
<b>Abb. 26:</b> Fall 8, HE, C, 100fache Vergrößerung: starke zelluläre Infiltration .....	46
<b>Abb. 27:</b> Fall 39, HE, E, 400fache Vergrößerung: geringe zelluläre Infiltration .....	47
<b>Abb. 28:</b> Beispiel LCA, 1000fache Vergrößerung.....	48
<b>Abb. 29:</b> Ergebnisdarstellung LCA für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=92) .....	48
<b>Abb. 30:</b> Anzahl der Fälle bezogen auf die durchschnittliche Zellzahl pro HPF für LCA im gesamten SIDS-Kollektiv (n=92) .....	49
<b>Abb. 31:</b> Durchschnittliche Zellzahl/HPF (Mittelwert) für LCA für jede Probeentnahmestelle für SIDS gesamt (n=92) .....	50
<b>Abb. 32:</b> Durchschnittliche Zellzahl/HPF (Mittelwert) für LCA für jede Probeentnahmestelle bereinigt um die Myokarditisfälle (n=90) .....	50
<b>Abb. 33:</b> Durchschnittliche Zellzahl/HPF (Mittelwert) für LCA für jede Probeentnahmestelle bereinigt um alle in HE auffälligen Fälle (n=83) .....	51
<b>Abb. 34:</b> Fall 88 durchschnittliche Zellzahl/HPF für LCA, Schwankungen unter den Probe-entnahmestellen .....	52
<b>Abb. 35:</b> Fall 88, PES E: Darstellung der durchschnittlichen Zellzahl/HPF bei Auswertung von 20 HPFs: Schwankungen innerhalb der PES E: Minimum 0 Zellen/HPF, Maximum 18 Zellen/HPF.....	52
<b>Abb. 36:</b> Fall 88, LCA, E, HPF.....	53
<b>Abb. 37:</b> Fall 88, LCA, E, andere Stelle, HPF.....	53

<b>Abb. 38:</b> Darstellung der durchschnittlichen Leukozytenzahl bereinigt um die Myokarditisfälle 4 und 10 sowie um die weiteren in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47).....	54
<b>Abb. 39:</b> Darstellung der durchschnittlichen Leukozytenzahl des Kontrollkollektivs (n=15) und Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl für SIDS und Kontrollgruppe .....	55
<b>Abb. 40:</b> Beispiel CD45-R0, 1000fache Vergrößerung.....	57
<b>Abb. 41:</b> Ergebnis der durchschnittlichen T-Lymphozyteninfiltration im SIDS-Kollektiv (n=92).....	57
<b>Abb. 42:</b> Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte für das gesamte Kollektiv (n=92) .....	58
<b>Abb. 43:</b> Durchschnittliche Mittelwerte der Lymphozyten bezogen auf die acht PES für das gesamte Kollektiv (n=92).....	59
<b>Abb. 44:</b> Durchschnittliche Mittelwerte der Lymphozyten bezogen auf die acht PES für das um die Myokarditisfälle bereinigte Kollektiv (n=90) .....	59
<b>Abb. 45:</b> Durchschnittliche Mittelwerte der Lymphozyten bezogen auf die acht PES für das um alle in HE auffälligen Fälle bereinigte Kollektiv (n=83).....	60
<b>Abb. 46:</b> Fall 66: Zellzahl/HPF für die acht PES A-H: deutliche Schwankung von PES zu PES und innerhalb einer PES .....	60
<b>Abb. 47:</b> Fall 66: durchschnittliche Zellzahl/HPF: Schwankungen innerhalb der PES E mit einem Minimum von 4 Zellen/HPF und einem Maximum von 21 Zellen.....	61
<b>Abb. 48:</b> Fall 66, CD45-R0, D, 100fache Vergrößerung .....	61
<b>Abb. 49:</b> Fall 66, CD45-R0, D, 400fache Vergrößerung .....	62
<b>Abb. 50:</b> Darstellung der durchschnittlichen T-Lymphozytenzahl bereinigt um die Myokarditisfälle 4 und 10 sowie die weiteren in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47).....	63
<b>Abb. 51:</b> Darstellung der durchschnittlichen Lymphozytenzahl des Kontrollkollektivs (n=15) und Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl für SIDS und Kontrollgruppe .....	64
<b>Abb. 52:</b> Beispiel CD68, 1000fache Vergrößerung.....	66

<b>Abb. 53:</b> Darstellung der durchschnittlichen Makrophageninfiltration im SIDS-Kollektiv (n=92).....	67
<b>Abb. 54:</b> Häufigkeitsverteilung CD68 des gesamten SIDS-Kollektives: 77,2 % weisen eine oder weniger Zellen/HPF auf.....	67
<b>Abb. 55:</b> Durchschnittliche Zellzahl/HPF des gesamten Kollektivs für CD68 über die acht PES (n=92).....	68
<b>Abb. 56:</b> Durchschnittliche Zellzahl/HPF des um die Myokarditisfälle bereinigte Kollektiv für CD68 über die acht PES (n=90) .....	68
<b>Abb. 57:</b> Durchschnittliche Zellzahl/HPF des um alle in HE auffälligen Fälle bereinigte Kollektiv für CD68 über die acht PES (n=83) .....	69
<b>Abb. 58:</b> Fall 39, CD68, A, 100fache Vergrößerung .....	69
<b>Abb. 59:</b> Fall 39, CD68, A, 400fache Vergrößerung .....	70
<b>Abb. 60:</b> Darstellung der durchschnittlichen Makrophageninfiltration bereinigt um die Myokarditisfälle 4 und 10 sowie die weiteren in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47).....	71
<b>Abb. 61:</b> Darstellung der durchschnittlichen Makrophageninfiltration des Kontrollkollektivs (n=15) und Vergleich der durchschnittlichen Zellzahl für SIDS und Kontrollgruppe.....	72
<b>Abb. 62:</b> Beispiel HLA, 400fache Vergrößerung.....	74
<b>Abb. 63:</b> Darstellung der ermittelten durchschnittlichen Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im SIDS-Kollektiv (n=91).....	75
<b>Abb. 64:</b> Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte gemessen an den SIDS-Fällen: 68,1 % der SIDS-Fälle weisen keine bis eine geringe HLA-Expression auf .....	75
<b>Abb. 65:</b> HLA-Expression im gesamten SIDS-Kollektiv (n=92) über die PES, insgesamt relativ homogene Verteilung .....	76
<b>Abb. 66:</b> HLA-Expression im um die Myokarditisfälle bereinigte SIDS-Kollektiv (n=90) über die PES, insgesamt relativ homogene Verteilung .....	76

<b>Abb. 67:</b> HLA-Expression im um alle auffälligen Fälle bereinigte SIDS-Kollektiv (n=83) über die PES, insgesamt relativ homogene Verteilung .....	77
<b>Abb. 68:</b> Fall 82, HLA, PES C, 400fache Vergrößerung .....	79
<b>Abb. 69:</b> Fall 88, HLA, PES A, 100fache Vergrößerung, mäßige Expression .....	79
<b>Abb. 70:</b> Fall 72, HLA, PES A, 100fache Vergrößerung, starke Expression.....	80
<b>Abb. 71:</b> Ergebnis der semiquantitativen Auswertung für HLA bereinigt um die Myokarditisfälle sowie die übrigen in HE auffälligen Fälle (8, 9, 10, 36, 39, 45, 47) .....	81
<b>Abb. 72:</b> Durchschnittliche Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im Kontrollkollektiv und Vergleich der durchschnittlichen Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im Kontrollkollektiv und gesamten SIDS-Kollektiv.....	82
<b>Abb. 73:</b> Beispiel E-selectin, 400fach .....	84
<b>Abb. 74:</b> Ergebnisdarstellung der durchschnittlichen Expression von E-selectin im SIDS-Kollektiv (n=91) .....	85
<b>Abb. 75:</b> Häufigkeitsverteilung von E-Selectin im gesamten SIDS-Kollektiv (n=91) .....	85
<b>Abb. 76:</b> Mittelwerte für E-selectin über die acht PES für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=91).....	86
<b>Abb. 77:</b> Mittelwerte für E-selectin über die acht PES für das um alle Myokarditisfälle bereinigte Kollektiv (n=89).....	86
<b>Abb. 78:</b> Mittelwerte für E-selectin über die acht PES für das um alle auffälligen Fälle bereinigte Kollektiv (n=82).....	87
<b>Abb. 79:</b> Fall 79 E-selectin: Mittelwerte pro PES, schwankende Expressionsintensität von PES zu PES und innerhalb einer PES, zum Teil auch starke Expression .....	88
<b>Abb. 80:</b> Fall 29 E-selectin: Mittelwerte pro PES, schwankende Expressionsintensität von PES zu PES und innerhalb einer PES, zum Teil auch starke Expression (PES F) .	88
<b>Abb. 81:</b> Fall 50, E-selectin, PES A, 400fache Vergrößerung, moderate Expression....	89
<b>Abb. 82:</b> Durchschnittliche Expression von E-selectin im Kontrollkollektiv und Vergleich der durchschnittlichen Expression von E-selctin im Kontrollkollektiv und im gesamten SIDS-Kollektiv .....	90

- Abb. 83:** Vergleich der ausgezählten Flächen der Methode 1, der von Grasmeyer (2014) sowie der von Dettmeyer (2004) mit der Fläche der einzelnen Probeentnahmestelle (Obduktionsbild Fall 90, PES D) und einer Myokardbiopsie im Maßstab 10:1 ..... 92
- Abb. 84:** Vergleich der Mittelwerte beider Auszählmethoden für die Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen für das gesamte SIDS-Kollektiv (n=92) (zur besseren Darstellbarkeit wurde die y-Achse auf einen Maximalwert von 7 Zellen/HPF skaliert, der größte Wert findet sich für LCA der Methode 1 (HPF) mit durchschnittlich 40,2 Zellen/HPF)..... 94
- Abb. 85:** Vergleich der Ergebnisse der Auswertung des bereinigten Kollektives (n=56) mit dem gesamten SIDS-Kollektiv (n=92): Mittelwerte der einzelnen immunhistochemischen Marker..... 100
- Abb. 86:** Vergleich der Ergebnisse der Auszählung von Makrophagen, Lymphozyten und Leukozyten des gesamten SIDS-Kollektives nach Methode 1 (n=92) und Methode 2 (n=92) mit dem bereinigten Kollektiv (n=56) ..... 100
- Abb. 87:** Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse für Makrophagen, Lymphozyten und Leukozyten des SIDS-Kollektives und des Kontrollkollektives ..... 101
- Abb. 88:** Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse für HLA und E-Selectin des SIDS-Kollektives und des Kontrollkollektives ..... 101

## 8. Literaturverzeichnis

Adelson L, Kinney ER. Sudden and unexpected death in infancy and childhood. *Pediatrics* 1956; 17: 663-699

Adler CP. Morphologische Grundlagen der Herzhypertrophie und des Herzwachstums. *Med Welt* 1972; 23: 477-482

Ali N, Ferrans VJ, Roberts WC, Massuni RA. Clinical evaluation of transvenous catheter technique for endomyocardial biopsy. *Chest* 1973; 63: 399-402

Anderson HR, Cook DR. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 1997; 52: 1003-1009

Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathological definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14

AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften). S2 Leitlinie „Myokarditis“. AWMF-Leitlinien-Register Nr. 023/025. Letzte Überprüfung August 2013

Baandrup U, Olsen EGJ. Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. *Br Heart J* 1981; 45: 475-486

Bajanowski T, Wiegand P, Cecchi R, Prink-Akerblom P, Adrian T, Jorch G, Brinkmann B. Detection and significance of adenoviruses in cases of sudden infant death. *Virchows Arch* 1996; 428: 113-118

Bajanowski T, Kleemann WJ. Der Plötzliche Kindstod. *Rechtsmedizin* 2002, 12: 233–248

Bajanowski T, Vege A, Byard RW, Krous HF, Arnestad M, Bachs L, Banner J, Blair PS, Borthne A, Dettmeyer R, Fleming P, Gaustad P, Gregersen M, Groggaard J, Holter E, Isaksen CV, Jorgensen JV, de Lange C, Madea B, Moore I, Morland J, Opdal SH, Rasten-Almqvist P, Schlaud M, Sidebotham P, Skullerud K, Stoltenburg-Didinger G, Stray-Pedersen A, Sveum L, Rognum TO. Sudden infant death syndrome (SIDS)-Standardised investigations and classification: Recommendations. *Forensic Sci Int* 2007, 165: 129-143



Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of dallas criteria. *Circulation* 2006; 113: 593-595

Beckwith JB. Discussion of terminology and definition of sudden infant death syndrome. In: Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG, eds., *Sudden Infant Death Syndrome: Proceedings of the Second International Conference on Causes of Sudden Death in Infants*. Seattle: University of Washington Press, 1970: 14-22

Beckwith JB. The sudden infant death syndrome. *Curr Probl Pediatr* 1973; 3: 1-36

Beckwith JB. Defining the Sudden Infant Death Syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157: 286-290

Billingham ME. The diagnostic criteria of myocarditis by endomyocardial biopsy. *Heart Vessels Suppl* 1985; 1: 133-137

Blair PS, Fleming PJ, Bensley D, Smith I, Bacon C, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J, Confidential Enquiry into Stillbirths and Deaths Regional Coordinators and Researchers. Smoking and the sudden infant death syndrome: results from 1993-5 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. *BMJ* 1996; 313: 195-198

Blair PS, Fleming PJ, Smith IJ, Platt MW, Young J, Pam N, Berry PJ, Golding J, and the CESDI SUDI research group. Babies sleeping with parents: case-control study of factors influencing the risk of sudden infant death syndrome. *BMJ* 1999; 319: 1457-1462

Bowles NE, Olsen EGJ, Richardson PJ, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986; 327: 1120-1123

Bowles NE, Ni J, Kearney D, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 466-472

Bulterys MG, Greenland S, Kraus JF. Chronic fetal hypoxia and sudden infant death syndrome: interaction between maternal smoking and low hematocrit during pregnancy. *Pediatrics* 1990; 86: 535-540

Burch GE, Sun SC, Chu KC, Sohal RS, Colcolough HL. Interstitial and Coxsackievirus B myocarditis in infants and children. A comparative histologic and immunofluorescent study of 50 autopsied hearts. *JAMA* 1968; 203: 1–8

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-6

Byard RW, Krous HF. Sudden Infant Death Syndrome: Overview and Update. *Pediatr Dev Pathol* 2003; 6: 112-127

Carpenter RG, Gardner A. Variations in unexpected infant death rates relating to age, sex and season. *Studies on Medical and Population Subjects* 1982; 45: 23-31

Casali MB, Lazzaro A, Gentile G, Blandino A, Ronchi E, Zoja R. Forensic grading of myocarditis: an experimental contribution to the distinction between lethal myocarditis and incidental myocarditis. *Forensic Sci Int* 2012; 223: 78-86

Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH. The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 7182-7186

Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, MD, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The Role of Endomyocardial Biopsy in the Management of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 19: 1914–1931

Cooper LT. Myocarditis. *N Engl J Med* 2009; 360: 1526-1538

Cunningham KS, Veinot JP, Butany J. An approach to endomyocardial biopsy interpretation. *J Clin Pathol* 2006; 59: 121-129

De Jonge GA, Engelberts AC, Koomen-Liefting AJ, Kostense PJ. Cot death and prone sleeping position in The Netherlands. *BMJ* 1989; 298: 722

De Jonge GA, Burgmeijer RJ, Engelberts AC, Hoogenboezem J, Kostense PJ, Spruij AJ. Sleeping position for infants and cot death in the Netherlands 1985-91. *Arch Dis Child* 1993; 69: 660-663

DeSa DJ. Isolated myocarditis in the first year. *Arch Dis Child* 1985; 60: 484-485

Dettmeyer R, Schlamann M, Madea B. Immunohistochemical techniques improve the diagnosis of myocarditis in cases of suspected sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 1999; 105: 83-94

Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Haag C, Madea B. Coxsackie B3 myocarditis in 4 cases of suspected sudden infant death syndrome: diagnosis by immunohistochemical and molecular-pathologic investigations. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 689-696

Dettmeyer R. Plötzlicher Kindstod. Neue Aspekte zur Bedeutung der virusbedingten Herzmuskelentzündung. Aachen: Shaker Verlag, 2004a

Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Padosch SA, Haag C, Kandolf R, Madea B. Role of viurs-induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postmortem study. *Pediatr Res* 2004b; 55: 947-952

Dettmeyer R, Müller J, Poster S, Madea B. PCR-based diagnosis of cytomegaloviruses in paraffin-embedded heart tissue in cases of suspected sudden infant death syndrome (SIDS). *International Congress Series* 2006a; 1288: 771-773

Dettmeyer R, Strehler M, Winkelmann S, Madea B. Myokarditis. *Rechtsmedizin* 2006b; 16: 138-142

Dettmeyer R, Baasner A, Haag C, Bruch S, Schlamann M. Immunohistochemical and molecular-pathological diagnosis of myocarditis in cases of suspected sudden infant death syndrome (SIDS) - a multicenter study. *Leg Med* 2009; 11: 124-127

Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klövekorn W P , Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997; 18, 470-479

Doerr, Sefert, Uehlinger, Hort W, *Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen II: Pathologie des Endokard, der Kranzarterien und des Myokard.* Band 22, Berlin; Heidelberg; New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Pariws, Singapur, Tokio. Springer 1999

Douglas AS, Allan TM, Helms PJ. Seasonality and the sudden infant death during 1987-9 and 1991-3 in Australia and Britain. *BMJ* 1996; 312: 1381-1383

Douglas AS, Helms PJ, Jolliffe IT. Seasonality of sudden infant death syndrome in mainland Britain and Ireland 1985-95. *Arch Dis Child* 1998; 79: 269-270

Drexler JF, Baumgarte S, Eschbach-Bludau M, Simon A, Kemen C, Bode U, Eis-Hübinger AM, Madea B, Drosten C. Human cardioviruses, meningitis, and sudden infant death syndrome in children. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 2313–2315

Drexler JF, Marmagen S, Oswald S, Eschbach M, Rimpel L, Blömker D, Guddat S, Doberentz E, Drosten C, Madea B. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndrom? Vortrag, 21. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin – Region Nord, Bonn 01.-02 Juni 2012 (a)

Drexler JF, Marmagen S, Oswald S, Eschbach M, Rimpel L, Blömker D, Guddat S, Doberentz E, Drosten C, Madea B. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndrom? Poster, 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Freiburg 18.-22. September 2012 (b)

Dwyer T, Ponsonby A, Blizzard L, Newman NM, Cochrane JA. The contribution of changes in the prevalence of prone sleeping position to decline in sudden infant death syndrome in Tasmania. *JAMA* 1995; 273: 783-789

Edwards WD, Holmes DR Jr, Reeder GS. Diagnosis of active lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy: quantitative criteria for light microscopy. *Mayo Clin Proc* 1982; 57: 419-425

Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 127-155

Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thile J, Pacini R, Cavaliere A, Martelli M, Carderelli N, Sabbatini E, Poggi S, Stein H. PG-M1: A New Monoclonal Antibody Directed against a Fixative-Resistant Epitope on the Macrophage-Restricted Form of the CD68 Molecule. *American Journal of Pathology* 1993; Vol. 142, No 5:1359-1372

Fairley CK, Ryan M, Wall PG, Weinberg J. The organisms reported to cause infective myocarditis and pericarditis in England and Wales. *J Infect* 1996; 32: 223-225

Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 1994; 65:194-197

Fleming PJ, Blair PS, Bacon C, Bensley D, Smith I, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J, Confidential Enquiry into Stillbirths and Deaths Regional Coordinators and Researchers. Environment of infants during sleep and risk of the sudden infant death syndrome: results of 1993-5 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. *BMJ* 1996; 313: 191-195

Fleming PJ, Blair PS, Pollard K, Platt MW, Leach C, Smith I, Berry PJ, Golding J, the CESDI SUDI Research Team. Pacifier use and sudden infant death syndrome: results from the CESDI/SUDI case control study. *Arch Dis Child* 1999, 81: 112-116

Foley DA, Edwards WD. Quantitation of leukocytes in endomyocardial tissue from 100 normal human hearts at autopsy. Implications for diagnosis of myocarditis from biopsy specimens of living patients. *Am J Cardiovasc Pathol* 1988; 2: 145-149

Forcada P, Beigelman R, Milei J. Inapparent myocarditis and sudden death in pediatrics. Diagnosis by immunohistochemical staining. *Int J Cardiol* 1966; 56: 93-97

Ford RPK, Taylor BJ, Mitchel EA, Enright SA, Stewart AW, Becroft DM, Scragg R, Hasall IB, Barry DM, Allen EM, Roberts AP. Breastfeeding and the Risk of Sudden Infant Death Syndrome. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 885-890

Gilbert R, Rudd P, Berry PJ, Fleming PJ, Hall E, White DG, Oreffo VOC, James P, Evans JA. Combined effect of infection and heavy wrapping on the risk of sudden unexpected infant death. *Arch Dis Child* 1992; 67: 171-177

Goldberg J, Hornung R, Yamashita T, Wehrmacher W. Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. *Aust Paediatr J* 1986; 22: 21-28

Golias CH, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing in Inflammatory Heart Disease. *In Vivo* 2007; 21: 757-770

Grasmeyer S. Myokardiale Apoptose und zelluläre Infiltration beim Plötzlichen Kindstod. 2014

Guntheroth WG, Lohmann R, Spiers PS. A seasonal association between SIDS deaths and kindergarten absences. *Public Health Rep* 1992; 107: 319-323

Guntheroth WG, Spiers PS. The Triple Risk Hypotheses in Sudden Infant Death Syndrome. *Pediatrics* 2002; 110: e64

Haglund B, Cnattingius S. Cigarette smoking as a risk factor for sudden infant death syndrome: a population-based study. *Am J Public Health* 1990; 80:29-32

Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 1235-1245

Hauck FR, Herman SM, Donovan M, Iyasu S, Moore CM, Donoghue E, Kirschner RH, Willinger M. Sleep environment and the risk of sudden infant death syndrome in an urban population: the Chicago Infant Mortality Study. *Pediatrics* 2003; 111: 1207-1214

Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herold, 2011

Heusch A, Kühl U, Rammos S, Krogmann ON, Schlutheiss HP, Bourgeois M. Complete AV-block in two children with immunohistological proven myocarditis. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 633-636

Hoffman HJ, Damus K, Hillman L, Krongrad E. Risk Factors for SIDS. Results of the National Institute of Child Health and Human Development SIDS Cooperative Epidemiological Study. *Ann NY Acad Sci* 1988; 533: 13-30

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81:1607-1613

Jorch G, Fischer D, Beyer U. Prävention des plötzlichen Säuglingstodes. *Monatsschr Kinderheilkd* 2003; 151: 514-519

Kandolf R. Myokarditis Diagnostik. *Dtsch med Wochenschr* 2011; 136: 829-835

Kandolf R, Klingel K, Zell R, Canu A, Fortmüller U, Hohenadl, C, Albrecht M, Reimann BY, Franz WM, Heim A, Raab U, McPhee F. Molecular mechanisms in the pathogenesis of enteroviral heart disease: acute and persistent infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 153-158

Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 2001; 11: 355-368

Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118: 639-648

Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm M. Update on Myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2012, 59: 779-92

Kitulwate ID, Kim PJ, Pollanen MS. Sudden death related myocarditis: a study of 56 cases. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6: 13-19

Kleemann WJ, Schlaud M, Poets CF, Rothämel T, Tröger HD. Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* 1996; 109: 139-142

Klein RM, Vester EG, Brehm MU, Dees H, Picard F, Niederacher D, Beckmann MW, Strauer BE. Entzündung des Myokards als Arrhythmietrigger. *Z Kardiol* 2000; 89: III24-III35

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 314-318

Klingel K, Selinka HC, Huber M, Sauter M, Leube M, Kandolf R. Molecular pathology and structural features of enteroviral replication. Toward understanding of the pathogenesis of viral heart disease. *Herz* 2000; 25: 216-220

Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193: 101-107

Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG., Mitchell EA. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004; 114: 234-238

Krous HF, Ferandos C, Masoumi H, Arnold J, Haas EA, Stanley C, Grossfeld PD. Myocardial inflammation, cellular death, and viral detection in sudden infant death caused by SIDS, suffocation or myocarditis. *Pediatr Res* 2009; 66: 17-21

Kühl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. Neue Konzepte zur Diagnostik der entzündlichen Herzmuskelentzündung. *Dtsch med Wschr* 1997; 122: 690-698

Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 945-950

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005a; 111: 887-893

Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005b; 112: 1965-1970

Madea B, Käferstein H, Hermann N, Sticht G. Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid - a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. *Forensic Science International* 1994; 65: 19-31

Madea B. Sudden death, especially in infancy – improvement of diagnoses by biochemistry, immunohistochemistry and molecular pathology. *Leg Med* 2009; 11: 36-42

Madea B, Drexler JF. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndrome. In: Darai G, Handermann M, Sonntag HG, Zöller H, Hrsg., *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Berlin – Heidelberg: Springer, 2012: 931-962

Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006; 114: 1581-1590

Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz* 2000; 25: 200-209



Malloy MH, Kleinman JC, Land GH, Schramm WF. The association of maternal smoking with age and cause of infant death. *Am J Epidemiol* 1988; 128: 46-55

Micklem K, Rigney E, Cordell J, Simmons D, Stross P, Turley H, Seed B, Mason D. A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1989; 73: 6-11

Mitchell EA, Scragg L, Clements M. Soft cot mattresses and the sudden infant death syndrome. *NZ Med J* 1996; 109: 206-207

Mitchell EA, Tuohy PG, Brunt JM, Thompson JMD, Clements MS; Stewart AW, Ford RPK, Taylor BJ. Risk factors for sudden infant death syndrome following the prevention campaign in New Zealand: a prospective study. *Pediatrics* 1997; 100: 835-840

Mitchell EA, Thach BT, Thompson JMD, Williams S. Changing infants' sleep position increases risk of sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153: 1136-1141

Mitchell EA, Thompson JM, Becroft DM, Bajanowski T, Brinkmann MD, Happe A, Jorch G, Blair PS, Sauerland C, Vennemann MM. Head covering and the risk for SIDS: findings from the New Zealand and German SIDS Case-Control studies. *Pediatrics* 2008; 121: 478-483

Nelson EAS, Taylor BJ, Weatherall IL. Sleeping position and infant bedding may predispose to hyperthermia and the sudden infant death syndrome. *Lancet* 1989, 333: 199-201

Nielsen TS, Nyengaard JR, Møller J, Banner J, Nielsen LP, Baandrup UT. Quantitative diagnosis of lymphocytic myocarditis in forensic medicine. *Forensic Sci Int* 2014, 238:9-15

Noren GR, Staley NA, Bandt CM, Kaplan EL. Occurrence of myocarditis in sudden death in children. *J Forensic Sci* 1977; 22: 188-196

Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kühl U. Expression of Cell Adhesion Molecules in Dilated Cardiomyopathy: Evidence for Endothelial Activation in Inflammatory Cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99: 2124-2131

Oyen N, Haglund B, Skjaerven R, Irgens LM. Maternal smoking, birthweight and gestational age in sudden infant death syndrome (SIDS) babies and their surviving siblings. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1997; 11: 84-95

Pankuweit S, Maisch B. Das Herz bei viralen Infektionen. *Internist* 2010; 51: 836-843

Peterson DR, van Belle G, Chinn NM. Sudden infant death syndrome and maternal age: etiologic implications. *JAMA* 1982; 247: 2250-2252

Pulido R, Schlossman SF, Saito H, Streuli M. Identification of amino acids at the junction of exons 3 and 7 that are used for the generation of glycosylation-related human CD45RO and CD45RO-like antigen specificities. *J Exp Med* 1994; 179: 1035-1040

Rasten-Almquist P, Eksborg S, Rajs J. Myocarditis and sudden infant death syndrome. *APMIS* 2002; 110: 469-480

Raza MW, Essery SD, Elton RA, Weir DM, Busuttill A, Blackwell C. Exposure to cigarette smoke, a major risk factor for sudden infant death syndrome: effects of cigarette smoke on inflammatory responses to viral infection and bacterial toxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 145-154

Rintahaka PJ, Hirvonen J. The epidemiology of sudden infant death syndrome in Finland in 1969-1980. *Forensic Sci Int* 1986; 30: 219-233

Rognum TO, Arnestad M, Bajanowski T, Banner J, Blair P, Borthne A, Byard RW, Gaustad P, Gregersen M, Grogaaud J, Holter E, Isaksen CV, Jorgensen JV, Krouse HF, de Lange C, Moore I, Morland J, Opdal SH, Rasten-Almquist P, Schlaud M, Sidebotham P, Skullerud K, Stoltenberg-Didinger G, Pedersen-Stray A, Sveum L, Vege A. State of the art conference on the stratification of SUDI. Consensus on diagnostic criteria for the exclusion of SIDS. *Nordisk Rettsmedisin* 2003; 3/4: 49-88

Scheers NJ, Dayton M, Kem JS. Sudden infant death with external airways covered. Case-comparison study of 206 deaths in the united states. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998; 152: 540-547

Schlaud M, Kleemann WJ, Poets CF, Sens B. Smoking during pregnancy and poor antenatal care: two major preventable risk factors for sudden infant death syndrome. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 959-965

Schoendorf KC; Kiely JL. Relationship of sudden infant death syndrome to maternal smoking during and after pregnancy. *Pediatrics* 1992; 90: 905-908

Scragg R, Mitchell EA, Taylor BJ, Stewart AW, Ford RPK, Thompson JMD, Allen EM, Becroft DMO, on behalf of the New Zealand Cot Death Study Group. Bed sharing, smoking, and alcohol in the sudden infant death syndrome. *BMJ*, 1993; 307: 1312-1318

Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, Okumura K, Naito S, Imataka K, Fujii J, Takaku F, Yazaki Y. Expression of major histocompatibility complex class 1 antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circulation Research* 1990; 67: 360-367

Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, Tsai CC, Saffitz JE, Isner J, Furner S. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987; 75: 401-405

Shanafelt MC, Yssel H, Soderberg C, Steinman L, Adelman DC, Peltz G, Lahesmaa R. CD45 isoforms on human CD4+ T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98: 433-440

Siegenthaler W, Blum HE. *Klinische Pathophysiologie*. Thieme, 2006

Smith SH, Brown MH, Rowe D, Callard RE, Beverley PC. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 1986; 58: 63-70

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-433

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2012: Lebendgeburten 1991-2009. [https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;jsessionid=567F622B6F3D28ED9D8DD2F55C062E91.tomcat\\_GO\\_1\\_1?operation=abrufabelleAbrufen&selectionname=12612-0001&levelindex=1&levelid=1401649777055&index=1](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;jsessionid=567F622B6F3D28ED9D8DD2F55C062E91.tomcat_GO_1_1?operation=abrufabelleAbrufen&selectionname=12612-0001&levelindex=1&levelid=1401649777055&index=1) (Zugriffsdatum: 15.04.2012)

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2013: Todesursachen 2012. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (Zugriffsdatum: 05.09.2013)

Statistisches Bundesamt Deutschland 2012: Todesursachen 1991-2009. [https://www-genesis.destatis.de/genesis/online;jsessionid=9D2E318B968743AC5A3CD97C2BC88F46.tomcat\\_GO\\_1\\_1?operation=previous&levelindex=2&levelid=1401649292991&step=2](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online;jsessionid=9D2E318B968743AC5A3CD97C2BC88F46.tomcat_GO_1_1?operation=previous&levelindex=2&levelid=1401649292991&step=2) (Zugriffsdatum 15.04.2012)

Steele R, Langworth JT. The relationship of antenatal and postnatal factors to sudden unexpected death in infancy. *Canad Med Ass J* 1966; 94: 1165-1171

Stocker JT, Dehner LP. *Pediatric Pathology, Volume two*. Lippincott, 1992

Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla HR, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss HP. Update 2001. Myokarditis-Kardiomyopathie. *Med Klin* 2001; 96: 608-625

Tappin D, Ecob R, Brooke H. Bedsharing, roomsharing, and sudden infant death syndrome in Scotland: a case control study. *J Pediatr* 2005; 147: 32-37

Vege A, Rognum TO. Sudden infant death syndrome, infection and inflammatory responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 42: 3-10

Vennemann MM, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Yücesan K, Sauerland C, Mitchell EA and the GESID Study group. Does breastfeeding reduce the risk of sudden infant death syndrome?. *Pediatrics* 2009; 123: 406-410

Weber MA, Ashworth MT, Risdon RA, Malone M, Burch M, Sebire NJ. Clinicopathological features of paediatric deaths due to myocarditis: an autopsy series. *Arch Dis Child* 2008; 93: 594-598

Williams AL, Uren EC, Bretherton L. Respiratory viruses and sudden infant death. *BMJ* 1984; 288: 1491-1493

Wilson CA, Taylor BJ, Laing RM, Williams SM, Mitchell EA. Clothing and bedding and its relevance to sudden infant death syndrome: Further results from the New Zealand Cot Death Study. *J Paediatr Child Health* 1994; 30: 506-512

Wisborg K, Kesmodel U, Henriksen TB. A prospective study of smoking during pregnancy and SIDS. *Arch Dis Child* 2000; 83: 203-206

Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J, Szczurek-Katański K, Nożyński J, Zembala M, Rozek MM. Immunohistological diagnosis of myocarditis: Potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury. *European Heart Journal* 1998; 19, 1564-1572

Woodruff JF. Viral Myocarditis. A review. *Am J Pathol* 1980; 101: 425-484

Zotter H, Kerbl R, Kurz R, Müller W. Pacifier use and sudden infant death syndrome: should health professionals recommend pacifier use based on present knowledge?. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 30: 791–794

## 9. Danksagung

Ich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Madea für die Überlassung des Themas. Er hat mir zu jeder Zeit seine wichtige Unterstützung entgegengebracht und durch konstruktive Kritik und wertvolle Anregungen die vorliegende Arbeit möglich gemacht hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Sarah Grasmeyer für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung sowie für die Bereitstellung ihrer Ergebnisse.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Dr. med. Lars Hagemeyer für die Einarbeitung in die immunhistochemische Mikroskopiertechnik.

Im Besonderen danke ich Lars Heinen für seine große Geduld und sein Interesse bei der Verwirklichung dieser Arbeit. Zudem danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht das Studium und letztlich diese Arbeit ermöglicht haben und sie mit Anteilnahme verfolgten.