

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Neuropathologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus

**Zerebraler Befall mit Parvovirus B19  
beim plötzlichen Säuglingstod?**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Christiane Wuttig

aus Waldshut

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. W. Paulus

Koreferent: Priv.- Doz. Dr. med. Chr. Rickert

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2007

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	1
1.2 Theoretischer Teil.....	4
1.2.1 SIDS - Definition und Begriffsbestimmung.....	4
1.2.2 SIDS -Epidemiologie.....	5
1.2.3 SIDS - Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren.....	6
1.2.4 Parvovirus B19.....	8
<b>2. Material und Methode.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b> Studienpopulation.....	12
2.2 Herstellung des Ausgangsmaterials.....	14
2.3 DNA-Gewinnung.....	14
2.4 Überprüfen der DNA-Qualität.....	16
2.5 Untersuchung auf Parvovirus B19-Infektion.....	17
2.6 Darstellung der Amplifikationsprodukte.....	19
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>20</b>
3.1 Beurteilung der DNA-Qualität.....	20
3.2 Resultate .....	22
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>25</b>
4.1 Genetische Disposition.....	25
4.2 Äußere Einflussfaktoren.....	26
4.3 Befunde an SIDS-Opfern.....	28
4.4 Folgerungen.....	29
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>31</b>
<b>6. Lebenslauf.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>Seite 1-4</b>

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Neuropathologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus-  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus  
Koreferent: Priv.- Doz. Dr. med. Christian Rickert

## **ZUSAMMENFASSUNG**

Zerebraler Befall mit Parvovirus B19  
beim plötzlichen Säuglingstod?

Christiane Wuttig

Obwohl der plötzliche Säuglingstod (SIDS) die Haupttodesursache für Kinder im ersten Lebensjahr darstellt, konnte trotz intensiver Forschung der zum Tode führende Pathomechanismus noch nicht geklärt werden. Es kristallisierten sich lediglich Risikofaktoren heraus, deren Vermeidung Statistiken zufolge zu einer Reduktion der SIDS-Inzidenz führt, ohne dass man hierdurch der Ätiologie näher gekommen wäre.

Ein wichtiger Zweig der SIDS-Forschung beschäftigt sich mit dem Einfluss von Infektionen, die sich durch Beteiligung verschiedener Organe negativ auf den Gesamtzustand des Kindes auswirken könnten, ohne dass bei der Obduktion eindeutige entzündliche Veränderungen nachgewiesen würden. Eine Hypothese geht von einer möglichen zerebralen Beteiligung aus, durch die die zentrale Atem-/Kreislaufregulation beeinträchtigt wird. In diesem Zusammenhang sollte die vorliegende Arbeit darüber Aufschluss geben, ob ein für den Menschen pathogener Vertreter aus der Familie der Parvoviridae, das Parvovirus B19, durch einen Befall verschiedener Hirnareale am Tod der Kinder beteiligt sein könnte.

Es wurden paraffinfixierte Hirnproben von 23 SIDS-Fällen und 7 Fällen mit anderer Todesursache untersucht, indem die pro Fall aus 4 Hirnarealen extrahierte DNA mittels PCR auf das Vorhandensein von Parvovirus B19-Genom getestet wurde. Als Positivkontrolle diente die DNA aus verschiedenen Geweben eines an Parvovirus B19-Myokarditis verstorbenen Jungen, an der ein Befall aller untersuchten Organe nachgewiesen werden konnte.

Dabei war außer in der Positivkontrolle in keiner der DNA-Proben eine Inokulation von Parvovirus B19-DNA festzustellen. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass ein cerebraler Befall mit diesem Virus regelhaft am akuten Todesgeschehen beteiligt ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2007

## **1. Einleitung**

### **1.1 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit**

Nachdem im Laufe des letzten Jahrhunderts in der westlichen Welt die Hauptursachen für die postneonatale Kindersterblichkeit wie Infektionen, Malformationen und Unterernährung bekämpft werden konnten, entwickelte sich der plötzliche Säuglingstod (plötzlicher Kindstod, Sudden Infant Death Syndrome, SIDS) zur häufigsten Todesursache im Säuglingsalter.

Um wirksame Präventionsmaßnahmen treffen zu können, intensivierte sich die Suche nach der Pathogenese. Dabei kristallisierten sich bei epidemiologischen Untersuchungen mögliche Risikofaktoren heraus, vor denen in den 1990er Jahren in den öffentlichen Medien aufgeklärt und gewarnt wurde.

Trotz des dramatischen Rückganges der Inzidenz für den plötzlichen Kindstod, der den weltweiten Edukationskampagnen folgte, die die Vermeidung von Überwärmung, von mütterlichem Rauchen und passiver Rauchexposition sowie vor allem das Einhalten der Rückenschlafposition favorisierten (Wigfield et al. 1992, L'Hoir et al. 1998, Adams et al. 1998, Jorch 2000, Rusen et al. 2004, Matthews et al. 2004), blieb das SIDS nach Ausschluß der Risikofaktoren noch immer die Hauptursache für den Tod von Kindern im Alter zwischen 1 Monat und 1 Jahr (Byard 1995, Dwyer und Ponsonby A-L 1996).

Die aktuellen Zahlen variieren je nach Land und Erhebungsjahr von 0,2 bis 0,8 Fälle pro tausend Lebendgeburten (Mc Garvey et al. 2003, Rusen et al. 2004) und das SIDS führt damit die Häufigkeitsverteilung der Todesursachen in Deutschland und anderen Industrieländern an. Der Anteil der SIDS-Todesfälle an der gesamten Säuglingssterblichkeit betrug 1996 38,2% (Studienzentrale der BMBF SIDS Studie, Münster). Der Forschungsbedarf bezüglich der SIDS-Pathogenese zeigte sich also weiterhin enorm hoch.

Unter Leitung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster wurde daher eine multizentrische Studie initiiert. Teil dieser Studie sind u.a. Untersuchungen in der

Neuropathologie, zu denen die vorliegende Arbeit zählt, in deren Rahmen mögliche pathogenetische Mechanismen für das SIDS erarbeitet werden sollten.

Für die multifaktoriellen Genese des SIDS sind unter anderem Entwicklungsstörungen durch intrauterinen Sauerstoffmangel (Bard et al. 2003, Sartiani et al. 2004) oder genetische Disposition sowie infektiöse Ursachen wie virale respiratorische Infektionen und bakterielle Toxine in der Diskussion (Blood-Siegfried 2000, Bohnel et al. 2001, Goldwater 2001, Goldwater 2003, Bartram und Singer 2004, Pearce et al. 2004). Bei Untersuchungen der nahe liegende Annahme einer Hirnstammdysfunktion mit Störung der Atemregulation konnten für Einzelfälle mögliche Noxen, jedoch kein gemeinsamer Nenner gefunden werden (Corbyn 2000, Russel und Vink 2001, Kato et al. 2003, Bergmann et al. 2004, Biondo et al. 2004). Arbeiten, die die Inzidenz des SIDS bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen untersuchten, zeigten, dass Kinder unterschiedlicher ethnischer Abstammung unterschiedlich häufig betroffen waren (Mathews et al. 2002, Mathews et al. 2003).

Unter diesen Gesichtspunkten erschien die Untersuchung eines Virus interessant, das erst in den 1970er Jahren als pathogen für den Menschen erkannt wurde und später in Zusammenhang mit einer meist harmlos verlaufenden Kinderkrankheit gebracht werden konnte. Das B19-Virus aus der Gruppe der sonst nur bei Tieren vorkommenden Parvoviridae verursacht bei Neuinfektion der meisten ansonsten gesunden Kinder das Erythema infectiosum, auch „Ringelröteln“ genannt, eine fieberhafte Erkrankung, die mit einem juckenden Exanthem einhergeht und nach Ausheilung meist eine lebenslange Immunität hinterlässt.

Hauptwirt ist die Erythrozytenvorläuferzelle (Weigel-Kelley et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass bei Neuinfektion die Erythropoese über einen Zeitraum von ca. einer Woche vollständig gehemmt wird und die Retikulozytenzahl bis auf Null abfallen kann (Anderson et al. 1985).

Während dies für ansonsten gesunde Neuinfizierte aufgrund der langen Lebensdauer erwachsener Erythrozyten nicht zum Hb-Abfall führt, besteht bei Menschen mit angeborener oder erworbener Störung der roten Blutbildung eine

erhebliche Gefährdung durch aplastische Krisen, da sie einen erhöhten Bedarf an roten Blutzellen besitzen (Smith-Whiley et al. 2004, Weir 2005). Eine verminderte Immunkompetenz kann zudem zur Persistenz des Virus und der Befall von Gelenken, Leber, Myocard, Nieren und Hirn zu erheblichen Komplikationen, auch mit Todesfolge, führen (Smith-Withley et al. 2004).

Bei erstinfizierten Schwangeren folgt einer transplazentaren Übertragung besonders im zweiten Schwangerschafts-Trimenon oft der Verlust des Ungeborenen.

Da trotz aller interessanten Entdeckungen der zum Tode führende Mechanismus beim SIDS im Dunkeln liegt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob in der SIDS-Ätiologie ein zerebraler Befall mit Parvovirus B19 eine Rolle spielen kann, sei es als Auslöser einer zentralen Atem-Kreislaufdysregulation oder als Hinweis auf ein virämiebedingtes Organversagen. Dies wurde anhand von Postmortemuntersuchungen an vier Hirnregionen von insgesamt 30 Säuglingen, von denen 23 SIDS-Fälle und 7 Kontrollen waren, unter Miteinbeziehung von demographischen Daten untersucht. Den Schwerpunkt stellte hierbei die Suche nach Virus-Genom in der extrahierten Hirnzell-DNA mittels PCR dar.

## **1.2 Theoretischer Teil**

### **1.2.1 SIDS - Definition und Begriffsbestimmung**

Die internationale Bezeichnung SIDS (sudden infant death syndrom) für den plötzlichen Säuglingstod wurde erstmals 1969 definiert als „der plötzliche Tod eines jeden Säuglings und Kleinkindes, welcher in der Anamnese unerwartet auftritt und für den auch durch eine gewissenhafte Post-mortem-Untersuchung keine adäquate Ursache gefunden werden kann“ (Bergmann und Beckwith 1970, McGarvey et al. 2003).

Weitere Untersuchungen führten zur Aufteilung in SIDS und den „unklassifizierten plötzlichen Kindstod“ für die Kinder, auf die die SIDS-Kriterien nicht zutreffen (Wigfield et al. 1992). Hier zeigte sich schon eine Schwierigkeit, mit der die Forschung zu kämpfen hatte: die Untersuchungen, die zur Diagnose des SIDS führten, waren zum Teil sehr unterschiedlich in Durchführung und Genauigkeit, so dass eine Homogenität in der Diagnosefindung bei den untersuchten SIDS-Fälle nur schwer zu erreichen war und teils heute noch ist. Schon fortgeschrittenere Diagnostik konnte den Anteil der SIDS-Fälle durch Feststellung der wahren Todesursache während einiger Studien senken (Mitchell et al. 2000).

In den 1990-iger Jahre wurde die obere Altersgrenze auf 1 Jahr festgelegt. Bis heute wurde keine weitere grundlegende Spezifizierung der Diagnose gefunden, und die klassische Definition ist immer noch die von 1969. Um dieser Definition jedoch gerecht zu werden, darf das SIDS keine bequeme Diagnose für unklare Fälle mehr sein (Takatsu et al. 2000, Sheehan et al. 2003, Byard und Krous 2004), weshalb als eine notwendige Voraussetzung für die weitere erfolgreiche Forschung die Einführung weltweiter Untersuchungsstandards gelten muß.

Die European Society for the Prevention of Infant Deaths (ESPID) spricht nur von einem SID (sudden infant death) und differenziert es diagnostisch weiter nach den pathologisch-anatomischen Befunden:

- A. SIDS im engeren Sinne
- B. Borderline-SIDS, bestehende Befunde erklären die Todesursache nicht hinreichend
- C. Non - SIDS, Todesursache ist durch die bestehenden Befunde hinreichend erklärt
- D. Verdacht auf SIDS ohne Obduktion

### 1.2.2 SIDS-Epidemiologie

Ein SIDS kann per Definition bei zwischen dem 29. und dem 365. Lebenstag verstorbenen Säuglingen auftreten. Ihm wird in der Statistik der ICD-Code 798.0 zugeteilt (plötzlicher Tod ungeklärter Ursache). Einflussfaktoren auf die statistisch erfasste SIDS-Mortalität in einem Land sind die ICD-Kodierung, also die willkürliche Zuordnung zur Diagnose SIDS, die risikogruppengerichtete Prävention, also die Vermeidung von Risikofaktoren, sowie die Häufigkeit der Durchführung einer Obduktion und Art der Totenscheinausstellung

In Neuseeland, der Schweiz und Deutschland machte das SIDS ca. 40 % der postneonatalen Säuglingssterblichkeit aus. Der Anteil in Kanada 1999 betrug 26% (Rusen et al. 2004). Andere Länder mit vergleichbarem Gesundheitsstandard zeigten deutlich niedrigere Mortalitätsraten, wie z.B. der SIDS-Anteil von nur 15% in Japan und den Niederlanden (Jorch 2000).

Die niedrigsten SIDS-Mortalitätsraten wiesen Japan und Ungarn mit 0,2 SIDS-Fällen auf 1000 Lebendgeborene auf, während die SIDS-Mortalität in Deutschland 1997 bei 0,8 auf 1000 Lebendgeborene lag (Jorch 2000).

Einen deutlichen Einfluß auf die SIDS-Mortalität schien die Bauchschlafage der Kinder zu haben. Nachdem 1987 erstmals in den Niederlanden öffentlich davor gewarnt wurde, ging schon im darauffolgenden Jahr die SIDS bedingte und auch die gesamte postneonatale Sterblichkeit zurück (Jorch 2000). Auch in vielen anderen Ländern waren auffällige Rückgänge der SIDS-Mortalität zu verzeichnen, wobei der größte Rückgang zeitlich oft mit der Warnung vor Bauchlage korrelierte (McKee und Fulop 1996)

In Deutschland wurde der stärkste Rückgang im Jahre 1992 verzeichnet (Jorch 2000), was sich durch eine zunächst vom Land Nordrhein-Westfalen ausgehende Warnung vor der Bauchlage 1991 erklären lässt.

Die Vermeidung dieses Risikofaktors hatte auch international von allen bekannten Risikofaktoren die größte Auswirkung auf die SIDS-Rate, die in vielen Ländern von 50% auf 10% absank. Die internationale Spannbreite der Inzidenz betrug 1987 für alle Länder 0,1-5,9 auf 1000 Lebendgeborene, dagegen in den späten 90-er Jahren 0,2-0,8 auf 1000 Lebendgeborene (Jorch 2000). Allerdings sank in den meisten Ländern außer Australien die Gesamtmortalität stärker als die SIDS-Rate und der Vergleich mit länger zurückliegenden epidemiologischen Daten einzelner Länder wie Schweden, Australien oder England wirft die Frage auf, ob der Einfluß der Risikovermeidung überschätzt wird, da sich große, bis zu 50% betragende Schwankungen der SIDS-Inzidenz auch unabhängig von öffentlichen Kampagnen zeigten und somit wohl Ausdruck einer natürlichen Varianz waren (Goldwater 2003).

In Deutschland nahm die SIDS-Rate seit 1995 nicht weiter ab und war 1997 im Vergleich zu anderen Ländern hoch (Jorch 2000), was an einer international gesunkenen Inzidenz nach der weltweiten „Back-to-sleep“-Kampagne 1996 liegen kann.

### **1.2.3 SIDS-Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren**

Nach Definition des SIDS als eigenständigem Syndrom entwickelten sich im Laufe der Zeit recht unterschiedliche Vorstellungen über dessen Ursache, welche von Erstickungstod, viralen Infekten der Atemwege, Thymusvergrößerung, Immundefekten, Vergiftungen und Unterfunktion der Nebenschilddrüse bis hin zu vielen Krankheitsbildern reichen, die aus der inneren Medizin bekannt sind.

In der Diskussion blieb, ob der das SIDS auslösende Faktor eine Folge intrauterinen Sauerstoffmangels oder einer genetischen Disposition in Form einer Fehl- oder

Mangelentwicklung lebenswichtiger Organe wie Herz (Church et al. 1967, Schwartz et al. 2001) oder Gehirn (Browne et al. 2000, Vaccari et al. 2001) sein und postpartem durch Herzrhythmusstörungen, broncho-pulmonaler Dysfunktion oder Veränderung in der zentralen Atem- oder Temperaturregulation zur Atem- oder Herz-Kreislauf-Insuffizienz führen könnte (Goldwater 2003, Rusen et al. 2004, Sartiani et al. 2004). Vor allem infektionsbedingte Beeinträchtigungen beschäftigten viele Forscherteams und scheinen den Kindstod zumindest mitzuverursachen. Die direkte Asphyxie durch externe oder interne Verlegung der Atemwege erscheint mittlerweile eher nicht wahrscheinlich, was Goldwater 2003 im Vergleich von regelhaft bei SIDS erhobenen Obduktionsbefunden mit Ergebnissen bei anderen Todesursachen postulierte. Auch die Kompression der Vertebralarterien durch eine ungünstige Kopfhaltung scheint eine allenfalls geringe Rolle zu spielen (Baasner et al. 2003).

Gerade das Rauchen der Mütter während oder nach der Schwangerschaft von bis zu 10 Zigaretten pro Tag scheint das kindliche SIDS Risiko stark zu erhöhen. So fanden sich in den Hirnen von SIDS-Opfern rauchender Mütter Veränderungen in den Kerngebieten des ZNS, die für die Weckbarkeit und kardiorespiratorische Kontrollmechanismen zuständig sind. Dies könnte auf eine veränderte pränatale Entwicklung der Nikotinrezeptoren in diesen Hirnstammregionen zurückgeführt werden (Shao und Feldman 2001), aber auch Ausdruck einer hypoxiebedingten Entwicklungsstörung sein. Im Zusammenhang mit mütterlichem Rauchen wurden Hypoplasien des kindlichen Nucleus arcuatus beschrieben (Lavezzi et al. 2004).

Was auch immer der auslösende Faktor ist, so wird er wohl in hohem Maße durch die Bauchschlafposition beeinflusst. Das SIDS Risiko bei Bauchlage im Schlaf wurde in Studien als um das 9- bis 14-fache erhöht beschrieben (Fleming und Blair 1996, Oyen und Markestad 1997). Die Mechanismen, die dabei als zum Tode führend angenommen werden, sind vagale Reaktionen im Sinne eines Tauchreflexes (Matturri et al. 2005), Kohlendioxidrückatmung bei weichen Unterlagen (Corbyn 2000), veränderte Gehirndurchblutung (Deeg et al. 1998) oder Überwärmung im Kopfbereich (Russell und Vink 2001), aber auch der Kontakt des

Respirationstraktes zu einer keimbesiedelten Unterlage (Sherburn und Jenkins 2004). Eine Studie an 119 SIDS-Opfern belegte, dass nur neun der Kinder in Schlafumständen verstorben waren, die die bekannten Risikofaktoren wie Bauchschlafelage, Schlafen im Bett mit weiteren Personen sowie Kissen- und Deckengebrauch ausschlossen (Kemp et al. 2000).

In den letzten Jahren fanden sich immer mehr Hinweise, dass neben den bekannten Einflussfaktoren Veränderungen durch virale oder bakterielle Infekte eine entscheidende Rolle spielen. Vor allem wurde der Wirkung bakterieller Infekte nachgegangen, die Veränderungen der inneren Organe bis zu deren Versagen auslösen oder, besonders im Zusammenwirken mit viralen Infekten, durch direkte Toxinwirkung den Tod verursachen können (Goldwater 2003).

#### **1.2.4 Parvovirus B19**

Dieses spezielle Virus ist Mitglied der großen Familie der Parvoviridae, welche pathogene Tierviren miteinschließt, die schon lange von Interesse für Virologen und Veterinäre sind (Young und Brown 2004). Die Entdeckung eines Parvovirus (PV) im menschlichem Blut Mitte der 1970er Jahre durch Cossart (Cossart et al. 1975) führte zu weiteren Studien, wobei jedoch die Verbindung zu dem 1899 erstmals von Sticker beschriebenen „Erythema infectiosum“ erst viel später gefunden wurde. Noch in der 1984er Ausgabe des Lehrbuches „Dermatologie und Venerologie“ von Braun-Falco wird ein Virus als Erreger lediglich als wahrscheinlich angenommen.

Das Erythema infectiosum, auch als „Ringelröteln“ bezeichnet (engl. „fifth disease“), ist eine fieberhafte Erkrankung, die nach einer Inkubationszeit von 6-8 Tagen zunächst grippeähnliche Symptome erzeugt, dann bis zu einer Woche symptomlos ist und in der Spätphase mit erneutem leichtem Fieber und einem roten juckenden maculopapulären Hautausschlag einhergeht, der über ein retikuläres Stadium nach ein bis drei Wochen abblasst. Zusätzlich oder als alleiniges Symptom tritt häufig, vor allem bei neuinfizierten Frauen, eine akute symmetrische Arthritis

der kleinen Gelenke und der Knie auf, die bei normaler Immunlage nach 2-4 Wochen abklingt (Baron 1991). Als möglicher Mechanismus wird eine Aktivierung der Synovialfibroblasten zu einem invasiven Typ beschrieben, der die Knorpelsubstanz angreift (Ray et al. 2001).

Man fand heraus, dass das PV B19 für seine Ausbreitung im Organismus auf seinen Hauptwirt, die Erythrozyten-Vorläuferzelle angewiesen ist (Weigel-Kelley et al. 2003, Weir 2005), wodurch die Erythropoese bei Neuinfektion vorübergehend unterdrückt wird. In Experimenten zeigte sich bei bisher seronegativen gesunden Probanden ca. eine Woche nach Inokulation ein Abfall der Retikulozytenzahlen auf Null, wobei die Hämoglobinwerte jedoch aufgrund der langen Lebensdauer erwachsener Erythrozyten konstant blieben (Weigel-Kelley et al. 2003).

Bei fast allen überprüften Patienten konnten nach Neuinfektion über 2-3 Monate IgM-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Das Erscheinen der Antikörper korreliert mit dem Verschwinden des Virus aus dem Blut, und eine IgG-Produktion scheint mit einer lebenslangen Immunität einherzugehen (Young und Brown 2004).

### **Komplikationen**

Das PV B19 ist das bisher einzige für den Menschen als pathogen bekannte Parvovirus und besitzt ein hochimmunogenes Kapsid (Poole et al. 2004, Kaufmann et al. 2004), was die hohe „Durchseuchung“ der Bevölkerung sowie sein klinisches Spektrum und die häufige Entwicklung von Komplikationen erklärt.

Bei Menschen mit zugrunde liegender hämolytischer Anämie wie Sichelzellanämie, hereditärer Sphärozytose, Beta-Thalassämie, Pyruvatkinasemangel und autoimmunhämolytischer Anämie folgt der B19-Infektion eine akute, selbstlimitierende aplastische Krise. Die Patienten entwickeln Symptome einer schweren Anämie mit kritisch erniedrigtem Hämoglobinwert, einer Reticulozytämie und vereinzelt auch Leuko- und Thrombozytopenien.

Knochenmarksuntersuchungen zeigen ein vollständiges Fehlen von Erythrozyten-Vorläuferzellen und damit ein Erliegen der roten Blutbildung. Bis zur Erholung des Knochenmarks und Nachweis von Retikulozyten im peripheren Blut sind oft

unterstützende Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten notwendig, aber auch die Infusion von Immunglobulinen konnte vor allem bei reinen Aplasien des roten Blutbildes Verbesserungen bewirken (Baron 1991).

Der Übertritt des Virus beschränkt sich jedoch im Weiteren nicht auf die roten Blutzellen. 1989 gelang es, bei einem Fall von intrauterinem Kindstod PV B19-Genom in der DNA aus paraffinierten Gewebeproben von Hirn-, Leber-, Herz-, Lunge- und Thymusgewebe nachzuweisen (Salimans et al. 1989), so dass sich schwere Organschäden nicht nur anämie- oder immunogenbedingt, sondern auch durch direkten Zellbefall erklären lassen. Im Jahr 2001 wurde erstmals eine durch PV B19 ausgelöste Enzephalitis bei einer immunkompetenten Erwachsenen beschrieben (Skaff und Labiner 2001), die zunächst ein Exanthem entwickelte und dann durch einen prolongierten Status epilepticus auffiel. Im Serum konnten spezifische IgG- und IgM-Antikörper nachgewiesen werden.

Bei immunsupprimierten Patienten können sich durch fehlende Möglichkeit der Virenbekämpfung Langzeit-Komplikationen wie persistierende aplastische Anämie, Polyarthritits und Hepatitis einstellen (Dembinski et al. 2003). Auch in diesen Fällen kann die Gabe von Immunglobulinen hilfreich sein.

Bei der durch Infektion ausgelösten erheblichen Virämie kann es bei schwangeren Frauen zum Übertritt der Viren in den kindlichen Blutkreislauf kommen. Das Risiko einer transplazentaren Infektion wird mit ca. 30 % beschrieben (Weir 2005). Da der Fetus nicht fähig ist, die Viren einzudämmen, kommt es über mehrere Wochen zu deren Replikation, was im ersten und zweiten Schwangerschafts-Trimenon zu einer viralen Herzschädigung und zum nicht immunogenen Hydrops fetalis (Enders et al. 2004, Kailasam et al. 2001) führen kann.

Erstmals konnte 1984 das B19-Virus mit einem Fall von Hydrops fetalis in Zusammenhang gebracht werden (Katz 1996). 1999 wurden in einem gleichartigen Fall bei der zerebralen Aufarbeitung vielkernige Riesenzellen der Makrophagen-/Mikroglia-Zelllinie nachgewiesen, deren Kerne PV B19-DNA enthielten. Zusätzlich waren perivasale Kalzifikationen vor allem in der weißen Substanz zu finden (Isumi et al. 1999).

Aber auch ohne direkte Organschädigung kann das Virus insbesondere bei Befall der kindlichen Leber, dem Hauptsitz der fetalen Blutbildung, bis zu 12 Wochen nach mütterlicher Infektion schwere fetale Anämien verursachen, ähnlich wie bei Patienten mit hämolytischen Anämien, wodurch hypoxiebedingte Entwicklungsstörungen denkbar sind (Weir 2005, Richardson et al. 2004).

Die Infektion des Fetus bedeutet meist den Verlust des Kindes. Die Inzidenz für einen fetalen Tod ist hoch und kann bei neuinfizierten Schwangeren 5 bis 9 % (Weir 2005, Baron), bei Infektion während der ersten 20 Schwangerschaftswochen sogar 11% betragen (Enders et al. 2004). Als eine mögliche Ursache fand sich bei Spontanabort in mehreren Fällen (und dabei zum Teil bei derselben Mutter) PV B19-DNA in den Herzmuskelzellen der Feten, ohne dass im peripheren Blut Antikörper nachweisbar gewesen wären (Xu et al. 2001).

Jedoch auch nach der Geburt ist der Säuglings durch eine B-19-Infektion nicht unerheblich gefährdet. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang eine gemeinsame Studie des rechtsmedizinischen Instituts Bonn und des virologischen Instituts Köln (Baasner et al. 2003), die bei den untersuchten Fällen von plötzlichem Kindstod in ca. 11 % der Opfer einen cardialen PV B19-Befall zeigte, während bei den Kindern ähnlichen Alters in der Kontrollgruppe keine B19-Myocarditis nachweisbar war.

Ob möglicherweise in der Pathogenese eines SIDS eine zerebrale Parvovirus-B19-Infektion eine Rolle spielen könnte, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

## 2. Material und Methode

Unter Leitung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster entstand die multizentrische BMBF-Studie „Plötzlicher Säuglingstod“ mit Förderung durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie. Die Studie beinhaltet eine interviewbasierte Hauptstudie und mehrere Teilprojekte, zu denen auch das Teilprojekt „Neuropathologie“ und die vorliegende Arbeit gehören.

Die Hauptphase dieser experimentellen Arbeit erstreckte sich über ca. 7 Monate vom 03.04.2004 bis zum 31.10.2004.

### 2.1 Studienpopulation

Das Patientengut der vorliegenden Arbeit entstammt den definierten Einzugsbereichen der an der Studie teilnehmenden rechtsmedizinischen Institute Hamburg, Hannover und Münster und umfaßt Säuglinge, die im Alter von 8-365 Tagen und bis zum Jahr 2000 verstorben sind. Die Patientendaten wurden in einer vorausgehenden Arbeit (Rickert et al. 2004) den Befundarchiven der Institute für Neuropathologie und Rechtsmedizin sowie der Studienzentrale entnommen und für diese Studie freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Es wurden die Gehirne von 30 obduzierten Kindern, davon 23 SIDS-Fälle (14 Jungen und 9 Mädchen) und 7 Kontrollen (2 Jungen und 5 Mädchen) untersucht, wobei die Geschlechterverteilung nicht signifikant unterschiedlich war ( $p=0.133$ ).

Die Kontrollen wurden aus der sogenannten Standardgruppe rekrutiert. In einem gemeinsamen Projekt von 23 rechtsmedizinischen Instituten, denen auch die Rechtsmedizin der Universität Münster angehörte, wurden 1993 COGRID-Kriterien (control group infant death) erarbeitet, die für die Aufnahme in diese Gruppe vorausgesetzt wurden. Wichtige Eintrittskriterien waren Tod aus nicht natürlicher Ursache und ein Alter zwischen 8 Tagen und vollendetem 1. Lebensjahr, wobei die Autopsie nach einem festgelegten Protokoll durchgeführt wurde.

Der Mittelwert des Alters bei Todeseintritt betrug für SIDS-Fälle 141 Tage (Standardabweichung: 87 Tage) und für die Kontrollen 152 Tage (Standardabweichung: 82 Tage). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Alter zum Todeszeitpunkt zwischen SIDS und Kontrollen ( $p=0.24$ ).

Folgende autoptische und anamnestische Daten wurden erfasst:

- Geschlecht der Säuglinge, Alter zum Zeitpunkt des Todes in Tagen und Hirngewicht
- Auffindelage
- nach durchgeführter Autopsie festgestellte Diagnosen und pathomorphologische Veränderungen
- Post-mortem-Intervall
- weitere Besonderheiten beim Kind wie auch in seinem Umfeld zu Lebzeiten

### **Post-mortem-Intervall**

Die Zeit nach dem Tod bis zur Obduktion wird als Post-mortem-Intervall bezeichnet und betrug bei den von uns gewählten Fällen maximal 72 Stunden. Da der genaue Todeszeitpunkt meist nicht bekannt ist, bezieht sich das Post-mortem-Intervall auf den Zeitpunkt, zu dem das Kind tot aufgefunden wurde.

Das durchschnittliche post-mortem Intervall lag bei den SIDS-Fällen bei 29,8 Stunden und bei den Kontrollen bei 23,6 Stunden. Das durchschnittliche post-mortem-Intervall für alle 30 Fälle betrug 28,3 Stunden.

Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### **Fälle für die Referenz-DNA**

Als GAPDH-Positiv-Referenz (GAP+) diente gesundes menschliches Hirn(-frisch)-gewebe, das direkt nach Exzision zur Konservierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden war. Dies garantierte intakte Zellkerne mit weitgehend unbeschädigter DNA.

Als PV-B19 Positiv-Referenz (B19+) wählten wir Hirngewebe eines Patienten, dessen Tod durch fulminantes Herzversagen bei PV-B19-Myokarditis verursacht wurde. Diese DNA wurde ebenso wie bei den Proben der SIDS-Fälle aus Paraffingewebe gewonnen.

## **2.2 Herstellung des Ausgangsmaterials**

Die Dauer der Formalinfixierung der zu untersuchenden Gehirne erwies sich als sehr unterschiedlich und reichte von wenigen Tagen bis zu fast 6 Monaten. Den fixierten Hirnen wurden Gewebeproben aus 20 verschiedenen Arealen entnommen, in Paraffin eingebettet und als Blöckchen archiviert.

Für die vorliegende Arbeit wurde zur DNA-Isolierung Probenmaterial in Form von Mikrotomschnitten aus vier Lokalisationen gewonnen:

- Gyrus frontalis superior/medialis, links (Areal 1)
- Gyrus occipitalis lateralis superior/inferior, rechts (Areal 4)
- Kleinhirnhemisphäre lateral, links (Areal 14)
- Pons, obere Hälfte (Areal 16)

## **2.3 DNA-Gewinnung**

Von dem in Blöckchenform paraffinfixierten Ausgangsmaterial wurden zunächst Gewebeschnitte mit einem Mikrotom (Lieferant E. Vieth, Wiesmoor) in einer Schnittdicke von ca. 15µm hergestellt. Die DNA-Isolierung wurde mit dem „DNeasy-Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt, wobei für die Entparaffinierung und die DNA-Gewinnung je nach Blöckchengröße 3-6 Schnitte entsprechend einem Materialgewicht von 20-40mg nicht überschritten werden durfte. Die vor der eigentlichen Extraktionsphase notwendige Entparaffinierung des Gewebes musste modifiziert werden, um aus dem zum Teil zellarmen Hirngewebe ausreichende Mengen an DNA zu erhalten.

1. 20-40 mg Paraffingewebe (entspricht ca. 3-6 15µm dicken Schnitten je nach Größe des Präparates) in 2ml-Eppendorff-Hütchen geben.
2. 1000µl Xylol zugeben und bei RT 15 min. inkubieren.
3. 5 min. bei 13000 U/m zentrifugieren, Überstand abpipettieren.
4. 1000µl Xylol zugeben (Tubes bei nicht sehr gut schließenden Deckeln mit Parafilm abdichten) und bei 52°C über Nacht inkubieren. Wieder abzentrifugieren und Überstand verwerfen.
5. 1000µl Xylol zugeben und bei 52°C ½ Stunde inkubieren, abzentrifugieren, Überstand verwerfen.
6. 1000µl Ethanol 99% unvergällt zugeben, vortexen, bei 13000 U/m zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen (Pellet bleibt dabei unversehrt als mit Pipette).
7. Schritt 6. noch zweimal wiederholen.
8. Anschließend restliches Ethanol bei 40°C verdampfen lassen, Gewebe trocknet.
9. Zugabe von 250 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (wird durch Alkohol irreversibel inhibiert!), über Nacht bei 56°C inkubieren (b.Bed. mit Parafilm abdichten).
10. Kontrolle, bei verbleibenden Geweberesten weitere Zugabe von 5-20µl Proteinase K, weiter inkubieren und Kontrolle (bis zu drei Nächten), bis alles Gewebe lysiert und die Lösung klar ist.
11. Zugabe von 200µl AL-Puffer, vortexen, 15 min. bei 70°C inkubieren.
12. Zugabe von 200µl Ethanol 99% unvergällt zur DNA-Fällung .
13. Auftrag der Lösung auf Mini-Spin-Säule und 1 min. bei 8000 U/m abzentrifugieren. Sollte Menge der Lösung Volumen über der Säulenmembran überschreiten, muß in zwei Portionen zentrifugiert werden. DNA wird von Membran ausgefiltert, Durchlauf verwerfen, neue Auffangtubes.
14. Waschen: 1. 500µl AW1-Puffer über Membran, zentrifugieren 1 min. bei 8000 U/m, Überstand verwerfen,  
2. 500µl AW2-Puffer über Membran, zentrifugieren 3 min. bei 13000U/m, Überstand verwerfen.

15. Säulen in neue beschriftete Eppendorfhütchen einsetzen, Auftrag von 100µl AE-Puffer auf die Membran zum Auslösen der DNA, 1 min. inkubieren, 1 min. bei 8000 U/m zentrifugieren. Auffangtube belassen, Wiederholung mit 50 µl AE-Puffer.
16. Die im Durchlauf nun in Lösung befindliche DNA wird spektrometrisch quantifiziert (Konzentrationsbestimmung) und ist dann zum Weiterverarbeiten oder Einfrieren bereit.

## 2.4 Überprüfen der DNA-Qualität

Die DNA-Lösung wurde anschließend mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) auf dem Peltier Thermal Cycler (PTC-200) der Fa. „MJ Research“ weiter untersucht.

Zunächst wurde jede Probe auf das Vorhandensein des Housekeeping-Genes Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) geprüft.

Als Housekeeping-Gene bezeichnet man diejenigen Gene, die nicht reguliert sind, das heißt unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden. In der Regel kodieren sie für Enzyme, die der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen. Das tetramere Protein GAPDH wirkt als Enzym bei der Glykolyse mit und sein Genom ist somit in fast allen menschlichen Geweben zu finden.

Ein fehlender Nachweis belegt bei ordnungsgemäßer Durchführung der PCR eine unzureichende Qualität der extrahierten DNA, und an der betreffenden Probe kann voraussichtlich kein aussagekräftiges Ergebnis für die Untersuchung auf PV-B19-DNA erzielt werden.

**PCR-Protokoll GAPDH:**

Nach spektroskopischer Messung des DNA-Gehaltes jeder fertigen Probe wurde für die PCR je 300 ng DNA eingesetzt.

Die errechnete Menge an DNA-Lösung wurde in ein PCR-Tube (250 µl Eppendorftube) pipettiert und mit hochreinem Wasser auf 38,7 µl ergänzt. Durch Zusatz von 11,3 µl sogenanntem Master-Mix erhielt man einen fertigen PCR-Ansatz von 50 µl.

Master-Mix:	5 Teile	10-fach PCR-Puffer (von Qiagen)
	4 Teile	dNTPs (Basengemisch)
	1 Teil	Primer 1 (forward)
	1 Teil	Primer 2 (reverse)
	¼ Teil	Polymerase (Hot Star Taq-P. von Qiagen)

(Bei den dNTPs handelt es sich um ein Gemisch aus Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zu gleichen Teilen von je 10 µmol in 100 µl (Promega Corporation, Madison, USA) auf 3800 µl ddH<sub>2</sub>O.)

Dann folgte die Vervielfältigung der gewählten DNA-Abschnitte per PCR in 35 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C.

**2.5 Untersuchung auf PV B19-Infektion:**

Da der Anteil von Viruserbgut an der Gesamt-DNA auch bei befallenen Zellen gering ist, wurde zum Nachweis eine „Nested PCR“ gewählt, wie in der Arbeit von Cassinotti beschrieben (Cassinotti et al. 1993). Dabei soll in einem ersten PCR-Schritt mit 35 Zyklen ein Fragment bestimmter Länge amplifiziert werden, wovon in einer zweiten PCR mit ebenfalls 35 Durchgängen ein kürzerer, im ersten Fragment enthaltener Basenpaarstrang vervielfältigt wird, wodurch sich Spezifität und Ausbeute erhöhen. Die Anfangs- und Endsequenz wird mittels sogenannter

„Primer-Paare“ festgelegt, von denen in der „Nested-PCR“ zwei Paare benötigt werden, ein „äußeres“ für das erste größere, ein „inneres“ für das zweite kleinere Fragment. Die Primer wurden ebenfalls der Arbeit von Cassinotti entnommen und von der Fa. MWG-Biotech AG bezogen.

### **Nachweis von PV B19-DNA mittels „Nested“-PCR**

Im Anschluß daran folgte die PCR mit den für PV B19-kodierenden Primern. Da sich im Verlauf der Durchführung zeigte, dass die Fragmentgrößen der meisten DNA-Proben dieser Studie eher gering waren, diente der im Paper (Cassinotti et al. 1993) angegebene innere Primer uns als äußereres Paar. Zu diesem wurde ein neuer innerer Primer gewählt, der für ein noch kürzeres Fragment kodiert.

### **Protokoll B19-PCR**

Der erste Schritt der B19-PCR war der GAPDH-PCR vergleichbar, wobei jedoch im Master-Mix I statt der GAPDH-Primer unser äußeres, für die längeren Stränge kodierendes PV-B19-Primerpaar verwendet wurde, welches ebenfalls eine Annealing-Temperatur von 60°C besitzt. Die eingesetzte DNA-Menge entsprach wie bei der GAPDH-PCR 300 ng.

Von der so behandelten Lösung wurden für den im nächsten PCR-Schritt verwendeten Ansatz 20µl entnommen und mit 18,7 µl hochreinem Wasser und 11,3 µl Master-Mix II, der die inneren Primer enthielt, zusammenpipettiert, was ebenfalls 50 µl ergab.

Dann folgte die Amplifikation des kürzeren B19-Stranges wiederum in 35 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 55°C.

Parallel dazu wurde bei jeder PCR in gleicher Weise und unter Einsatz der gleichen Reagenzien sowohl mit den Positiv- (GAP+, B19+) als auch mit den Negativ-Referenzen (GAP--, B19--) verfahren.

## 2.6 Darstellung der Amplifikationsprodukte

Um nachzuprüfen, ob die gesuchten DNA-Abschnitte in den jeweiligen Proben vorhanden sind und auch vervielfältigt wurden, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Nach Zugabe von 5µl Färbereagens (Xylencyanol), welches im Gel die Lauflänge der Moleküle anzeigt, wurden je 30µl der Lösung in eine Geltasche eines 2%igen Agarosegels gegeben. Beim Gießen des Geles wurde Ethidiumbromid zugefügt, welches sich an die amplifizierten DNA-Sequenzen anlagert.

Je nach Größe des Gels wurde über 35-50 min. eine Spannung von 90 Volt angelegt. Da Fragmente gleicher Größe im Gel die gleiche Strecke wandern, bilden sie Banden, die durch die Markierung mit Ethidiumbromid in UV-Licht sichtbar werden. Als Meßinstrument wurde in die erste Geltasche von links eine Lösung mit verschiedenen Fragmenten definierter Größe gegeben, als DNA-Leiter bezeichnet, um die Länge der Amplifikate beurteilen zu können. Daneben wurden jeweils die Positiv- und die Negativ-Referenz zur Dokumentation einer fehlerfreien Durchführung aufgetragen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Beurteilung der DNA-Qualität

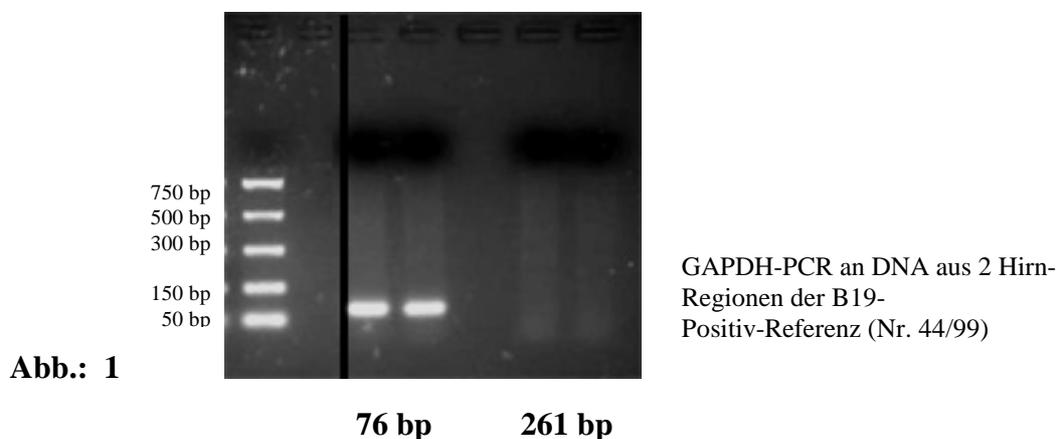
Die Prüfung der DNA mittels GAPDH-PCR zeigte unterschiedliche DNA-Qualitäten für die einzelnen Proben.

##### Referenz-DNA:

Aus der Probe des gesunden, durch Einfrieren konservierten Hirngewebes konnte wie erwartet eine DNA guter Qualität gewonnen werden. Bei allen GAPDH-PCRs bildeten sich deutlich sichtbare Banden, unabhängig von der Länge (von 76 bis 261 Basenpaaren) des replizierten Stranges. Somit war diese DNA als Positiv-Referenz (GAP+) für die folgenden GAPDH-PCRs der SIDS- und Kontrollfälle einsetzbar (siehe Abb.: 2 )

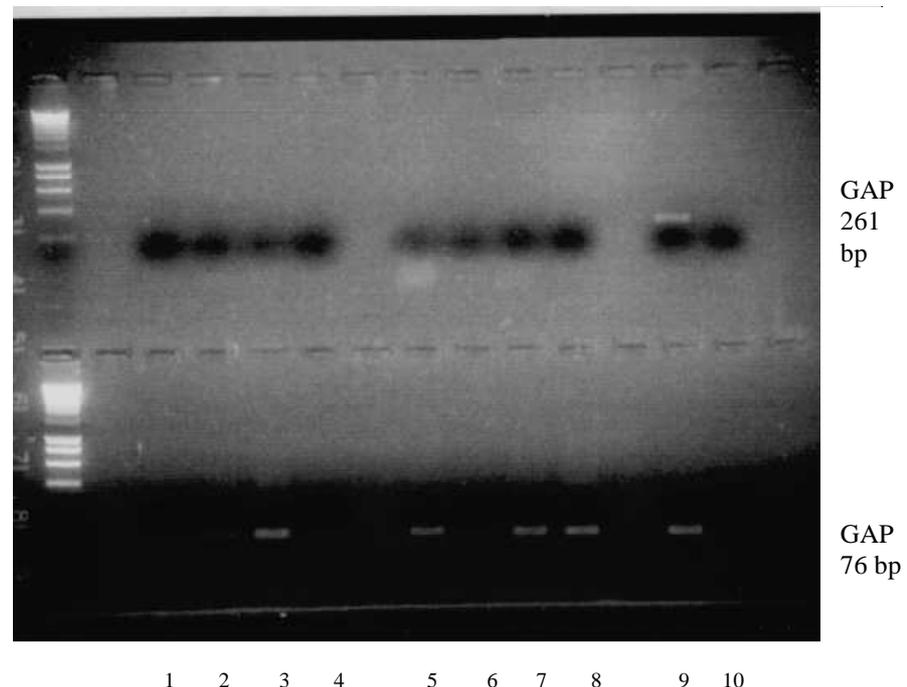
Die DNA des als B19-Positivreferenz geplanten Myokarditisfalles (Nr. 44/99) wurde aus paraffiniertem Gewebe gewonnen. Hier zeigte sich, dass das Virus in allen untersuchten Geweben des Patienten wie Herz, Lunge, Niere/Milz sowie im Hirngewebe nachweisbar war.

Allerdings schien die Länge der in Lösung befindlichen DNA-Fragmente für die ursprünglich geplanten Primer nicht ausreichend zu sein. Bei Amplifikation von GAPDH-Sequenzen unterschiedlicher Länge wurden desto bessere Banden gesehen, je kürzer sie waren, d.h. aus je weniger Basenpaaren (bp) die Sequenzen bestanden. Bei 261bp zeigte sich bei dem Paraffinpräparat keine Bande (Abb.1) .



Dies galt nicht nur für die DNA der Nr.44/99 sondern in besonderem Maße für die unterschiedlich denaturierte DNA der SIDS-Proben.

Alle Proben wurden sowohl auf GAPDH-76bp als auch -121bp getestet, wobei in einigen Proben nicht einmal mehr 76bp-Fragmente nachgewiesen werden konnten, was vermutlich Ausdruck einer DNA-Denaturierung bei längerer Dauer der Formalinfixierung des Ausgangsgewebes ist. In keiner aus Paraffingewebe isolierten DNA war 261bp- GAPDH nachzuweisen (Abb.2).



**Abb. 2:**

Spur 9: DNA aus Kryo-Gewebe der GAP+ (Nr.149/00)  
 Spur 10: GAP-- (hochreines Wasser)  
 übrige Spuren: SIDS- u. Kontrollfall-DNA aus Paraffingeweben

### **SIDS- und Kontrollfälle:**

Bei den ursprünglich ausgewählten Primern sollte zunächst für den Nachweis des B19-Genoms ein 201bp-Fragment und in einem zweiten Schritt zur Potenzierung ein 121-bp-Strang amplifiziert werden. Da durch den Einsatz unterschiedlicher GAPDH-Primer festgestellt wurde, dass aussagekräftige Ergebnisse nur mit

Fragmenten von unter 150 bp erreicht werden konnten, wurden die ehemals „inneren“ Primer für das 121bp-Fragment im ersten PCR-Schritt als äußeres Paar eingesetzt und aus dieser Sequenz ein neues inneres Primerpaar für den zweiten Schritt entworfen, das für 85 bp kodiert.

Alle SIDS- und Kontrollfälle wurden dann erneut mit einem 121bp-GAPDH Primerpaar untersucht, um die Voraussetzung für die B19-PCR zu prüfen.

### **3.2 Resultate**

#### **GAPDH-PCR:**

Bei den vorbereitenden PCRs auf GAPDH konnte bei 5 der 23 SIDS-Proben in keinem Hirnareal intakte DNA nachgewiesen werden, ebenso wie bei 2 der 7 Kontrollfälle, was bedeutet, dass die in Lösung befindlichen Fragmente kleiner als 76 bp sein müssen. In zwei der SIDS-Fälle zeigten sich nur schwache Banden und dies auch nicht für alle Hirnareale.

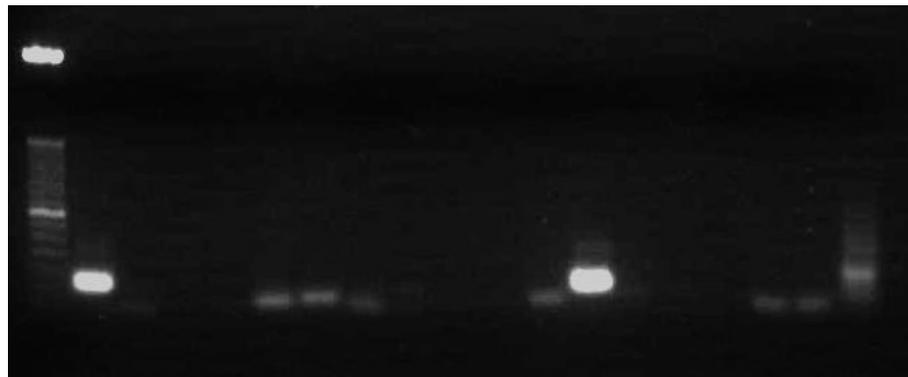
Bei 16 SIDS-Proben war ein deutlicher GAPDH-76bp-Nachweis möglich. 10 dieser 16 waren auch für GAPDH-121bp positiv, so dass in diesen Fällen zu erwarten war, dass ausreichende Fragmentlängen für ein aussagekräftiges Ergebnis der PV B19-PCR vorhanden waren. Dasselbe galt auch für die 5 positiven Kontrollfälle.

Gute Ergebnisse zeigten sich sowohl bei Kindern, die direkt nach dem Auffinden obduziert wurden, als auch bei solchen, deren Hirn erst maximal drei Tage nach Auffinden fixiert worden war, so dass hier kein Einfluß des Post-mortem-Intervalles auf die DNA-Qualität erkennbar ist.

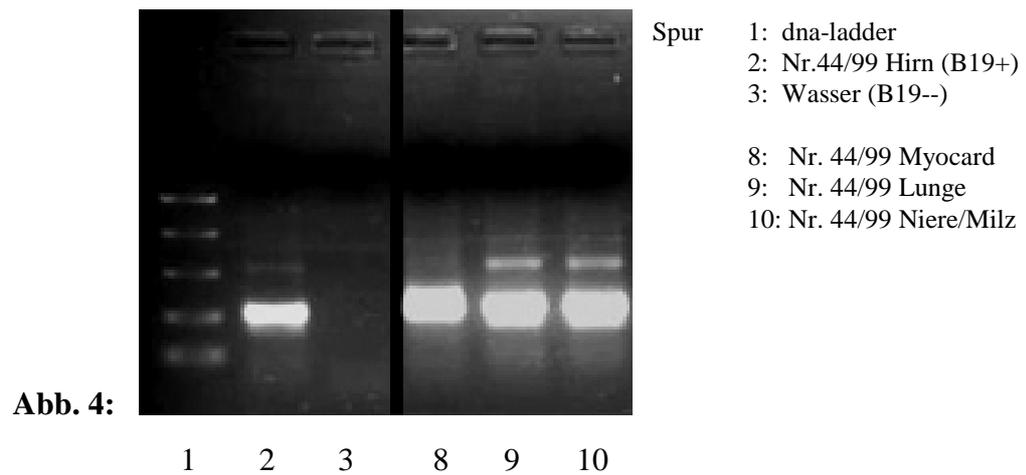
**PV B19-PCR:**

Die im Anschluß durchgeführte Nested-PCR auf Parvovirus B19-Genom erbrachte in keinem der Fälle einen positiven Nachweis von Virus-DNA, weder in der SIDS- noch in der Kontrollgruppe.

Allerdings kamen öfter bei einzelnen deutliche Banden kürzerer oder ähnlich langer Fragmente zur Darstellung (Abb. 3). Per Sequenzierung konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich hierbei in den meisten Fällen nicht um Virussequenzen handelte, sondern vermutlich um Primerdarstellung und Kreuzreaktionsprodukte. Vereinzelt Banden aus Virusgenom wurden bei mehrfachen Wiederholungs-PCRs, die mit neu isolierter DNA aus derselben Probe durchgeführt wurden, nicht reproduziert, so dass es sich hierbei um eine Kontamination handeln muss.

**Abb. 3**

Lediglich die B19+ erbrachte kontinuierlich sowohl bei mehrfacher DNA-Isolierung als auch bei mehreren PCRs von der gleichen Ausgangs-DNA gute positive Virusnachweise, ebenso wie die übrigen untersuchten Gewebe dieses Patienten (Abb. 4). Die dabei oft vorhandene schwächere Bande stellt ein Amplifikat dar, welches nicht auf seine Sequenz untersucht wurde, die aber deutlich länger ist als die gesuchte. Dabei handelt es sich vermutlich um ein bei positiven Proben regelhaft auftretendes Kreuzreaktionsprodukt.

**Bedeutung / Aussage:**

Anhand der Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass sich zum Zeitpunkt des Todeseintritts der Kinder keine Parvovirus B19-DNA in den Zellen der untersuchten Hirnregionen befand.

## 4. Diskussion

Der plötzliche Kindstod definiert sich noch immer dadurch, dass bei einer sorgfältigen postmortalen Untersuchung keine todesursächlichen Befunde erhoben werden können (Findeisen et al. 2004).

Da der zum Tode führende Mechanismus schon per Definition unklar ist, wurde und wird weiterhin versucht, durch Ausschlusskriterien der Ätiologie näher zu kommen, indem bisher bekannte Risikofaktoren möglichst vermieden und die dennoch aufgetretenen SIDS-Fälle eingehend untersucht werden. Die Varianz der untersuchten Faktoren ist groß und trotzdem wurden in vielen Bereichen Ergebnisse erzielt, ohne jedoch den Pathomechanismus aufzuklären. Ein möglicher Weg könnte das Zusammenfügen aller Resultate sein, um wie in einem Puzzle ein Gesamtbild zu erhalten.

### 4.1 Genetische Disposition

Bei der intrauterinen Entwicklung entscheiden zunächst die Erbanlagen über die Zukunft des Organismus.

Epidemiologische Studien zeigten, dass die SIDS-Inzidenz bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen recht unterschiedlich ist, wobei hier nicht entschieden werden kann, inwieweit eine möglicherweise unterschiedliche Diagnosefindung die Ergebnisse beeinflusst. Jedoch scheinen insbesondere Kinder afroamerikanischer Abstammung und Nachkommen der australischen Ureinwohner gefährdet zu sein, gefolgt von nicht-hispano-europäischer, spanischer und indischer Abstammung (Takatsu et al. 2000, Mathews et al. 2002, Moscovis et al. 2004). Welche genetischen Unterschiede dabei welche beeinträchtigenden oder protektiven Faktoren beeinflussen, ist noch nicht bekannt. Jedoch wäre es denkbar, dass rassespezifische Besonderheiten, die durch die Eigenheiten des ursprünglichen Lebensraumes selektiert wurden, sich an anderer Stelle, wie bei der Vulnerabilität für das SIDS, als nachteilig auswirken. Ein Beispiel könnte hier die Anlage für die Sichelzellanämie darstellen, die sich in Malariagebieten als protektiv erwiesen hat

und bei der dort lebenden Urbevölkerung im Vergleich zu anderen Populationen prozentual häufiger vertreten ist. Bei Parvovirus-B19-Neuinfektion führt diese hämatologische Variante zu Retikulozytämien und aplastischen Krisen, was beim Fetus möglicherweise eine konsekutive Hypoxie verursacht (Weir 2005).

An Untersuchungen einzelner Gene findet man in der Literatur als relevante Veränderungen im Hinblick auf das SIDS unter anderem eine Mutation des Genes KVLQT1, als C350T bezeichnet, welche in betroffenen Familien als verantwortlich für die Vererbung des „lange-QT-Zeit-Syndromes“ gilt und ebenso wie eine Gen-Mutation für Natrium-Kanäle für Herzrhythmusstörungen prädisponiert (Schwartz et al. 1998/2000/2001, Ackermann et al. 2001, Wedekind et al. 2001). Die Annahme, dass eine Mutation des Genes PHOX2B, welche zum „kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndrom“ führt, eine Rolle spielt, wurde nicht belegt (Kijima et al. 2004).

#### **4.2 Äußere Einflussfaktoren**

Neben der genetischen Disposition nehmen im weiteren Verlauf äußere Faktoren Einfluß auf die Entwicklung des Feten wie Ernährung, bakterielle oder virale Infekte sowie eine eventuelle Medikamentenzufuhr. Beispiele hierfür sind Missbildungen durch eine Congenitaleinfektion oder Rötelninfektion der Mutter.

Im Rahmen der SIDS-Forschung wurde als Risikofaktor vor allem das mütterliche Rauchen während der Schwangerschaft aufgezeigt (Pollack und Frohna 2001, Sartiani et al. 2004, Sundell 2004, Chong et al. 2004). Eine pränatale CO-Exposition durch Rauchen verursacht eine bis zu 4-fach erhöhte Carboxy-Häm-Konzentration im Nabelschnurblut (Aubard und Magne 2000) und bei Ratten zeigten sich Hypoxieschäden, welche sich unter anderem in einer gestörten Entwicklung der kardialen Ventrikelmyozyten in den vier ersten Lebenswochen und damit auf die AP-Dauer auswirkten, was ein erhöhtes Arrhythmierisiko darstellt (Sartiani et al. 2004). Bei Postmortem-Untersuchungen konnten Veränderungen im kardialen Reizleitungssystem nachgewiesen werden (Maturri et al. 2004). Wie schon ausgeführt zeigten einige Studien, dass das PV-B19 durch transplazentare Übertragung von der Mutter auf den Fetus zu Anämien führen

---

kann, was ebenfalls eine mangelnde Oxigenierung und damit hypoxiebedingte Entwicklungsstörungen zur Folge haben kann.

Weitere Ergebnisse des Sauerstoffmangels könnten ein verminderter HbA-Prozentsatz bei Neugeborenen (Richardson et al. 2004), Glia- und neuronale Veränderungen im Nucleus tractus solitarii (Biondo et al. 2004) und eine, ähnlich wie bei der Zerebralparalyse auftretende, periventrikuläre Leukomalazie (Takashima et al. 1978, Kinney et al. 1991) sein, welche laut Studien ebenfalls mit einem erhöhten SIDS-Risiko verbunden sind. Eine neuronale Schädigung anzeigende C-jun-Expression konnte in einigen SIDS-Fällen in den Colliculi inferiores, spinalen Trigeminskernen und Teilen des prämotorischen Kortex gefunden werden (Rickert et al. 2004).

Auch bei nicht direkt erfassbaren Entwicklungsstörungen wäre bei den geschädigten Kindern im Vergleich zu anderen eine weniger stabile Konstitution zu erwarten, was sich in einem geringen Geburtsgewicht (Aubard und Magne 2000, Matthews et al. 2004), vegetativer Dysregulation mit Blässe, Kälte, Schwitzen und leichter „Irritabilität“ (Browne et al. 2000, Wailoo et al. 2003, Matthews et al. 2004), einer erhöhten Infektanfälligkeit und insbesondere einer unkontrollierten Reaktion des Immunsystems (Moscovis et al. 2004, Gleeson und Cripps 2004, Gleeson et al. 2004) äußern könnte.

Die Kinder, die Opfer des SIDS werden, scheinen gemeinsam zu haben, dass sie insgesamt kränklicher und weniger aktiv sind als andere Kinder und mehr zu vegetativer Dysregulation neigen (Browne et al. 2000), was ebenfalls auf eine pränatal geprägte oder genetisch bedingte Morbidität hinweist. Sie bewegen sich weniger im Schlaf und sollen weniger Weckreaktionen (Arousals) zeigen (Hunt 1992, Kahn et al. 1992).

So wäre es auch nicht verwunderlich, dass Faktoren, die das Immunsystem weiter beeinträchtigen und die Wahrscheinlichkeit für Infektionen erhöhen, ebenfalls als Risikofaktoren benannt werden wie Luftverschmutzung (Dales et al. 2004),

Schlafen in Bauchlage mit Kontakt des Respirationstraktes zu einer keimbesiedelten Unterlage (Sherburn und Jenkins 2004) oder das Schlafen bei weiteren Personen, die als Erregerreservoir gelten müssen (McGarvey et al. 2003). So wäre auch der positive immunmodulatorische Einfluß des Stillens (Horn et al. 2004) oder des Impfens (Toro et al. 2004) auf die SIDS-Inzidenz zu erklären.

### **4.3 Befunde an SIDS-Opfern**

Die Vermutung, dass der plötzliche Kindstod durch eine innere oder äußere Verlegung der Atemwege und damit durch Erstickten des Säuglings verursacht wird, ist mit zunehmendem Erkenntnisstand immer weniger wahrscheinlich (Goldwater 2003). Zum einen können bei monitor-überwachten Kindern kurz vor dem Sterben keine Hinweise für einen hypoxiebedingten Todeskampf beobachtet werden (Kelly et al. 1991, Poets et al. 1999), zum anderen wären asphyxiebedingte Obduktionsbefunde zu eindeutig und bei genauer Betrachtung recht unterschiedlich im Vergleich zum SIDS. Bei SIDS-Opfern finden sich, wie ausführlich von Goldwater zusammengefaßt (Goldwater 2003 und 2004), oft ein deutlich erhöhtes Gewicht von Thymus, Lunge, Leber und Hirn durch ödematöse Veränderung (Siebert und Haas 1994), eine erhöhte Mastzellzahl im Lungengewebe (Holgate et al. 1994), flüssiges, nicht geronnenes Blut in den Herzhöhlen (Valdes-Dapena 1980) sowie entzündliche Veränderungen im respiratorischen Epithel (Hoffmann et al. 1988, Cutz und Jackson 2001). Die deutlich stärker ausgeprägten, dichteren petechialen Blutungen (Risse und Weiler 1989, Krous et al. 2001) finden sich lediglich im Intrathorakalraum (Krous und Jordan 1984, Byard und Krous 2001), während sie bei anderen Todesursachen auch subdiaphragmal und besonders bei Erstickungstod auch im Gesichts-, Kopf- und Nackenbereich zu finden sind (Hilton 1989). Dabei ist das Vorhandensein oder die Ausprägung der Petechien beim SIDS unabhängig von der Schlafposition, in der der Tod eingetreten ist (Krous und Nadeau 2001).

#### 4.4 Folgerungen

All diese Befunde scheinen großteils durch den Einfluß bakterieller Infektionen und Toxine auf verschiedene Systeme des Körpers, ggf. in Verbindung mit viralen Infekten, erklärt werden zu können und würden als Todesursache entweder eine inadäquate Immunreaktion (Aubard und Magne 2000, Blood-Siegfried 2000, Blood-Siegfried et al. 2004, Moscovis et al. 2004, Gleeson et al. 2004) oder eine direkte Bakterien- oder Toxinwirkung (Alexander et al. 1987, Bettelheim et al. 1993, Sayers und Drucker 1999, Blood-Siegfried et al. 2000, Goldwater 2003), die durch Koinfektion (Jakeman et al. 1991, Drucker et al. 1992, Mach und Lindsey 1994, Sarawar et al. 1994) oder Rauchexposition (Sayers et al. 1995, Sayers und Drucker 1999) noch verstärkt werden kann, wahrscheinlich machen.

Als mögliche beteiligte Keime wurden vor allem Staphylokokken- und E.coli-Stämme (Bettelheim et al. 1990, Murrell et al. 1993, Bettiol et al. 1994, Pearce et al. 1999, Blackwell et al. 2001, Goldwater 2003, Sherburn und Jenkins 2004, Harrison et al. 1999/2004)) nachgewiesen, jedoch wurden im Zusammenhang mit dem SIDS auch Parainfluenza-2-Virus (Kashiwagi et al. 2004), RS(respiratory-syncytial)-Virus (Gleeson et al. 2004), Enteroviren (Baasner et al. 2003, Dettmeyer et al. 2004), Clostridium botulinum (Bohnel et al. 2001, Bartram und Singer 2004), Pneumocystis jirovecii (Chabe et al. 2004), Bordetella pertussis (Heininger et al. 2004) und Parvovirus B19 (Baasner et al. 2003, Dettmeyer et al. 2004) untersucht, die zum Teil in makroskopisch völlig unauffälligem Gewebe nachgewiesen werden konnten (Baasner et al. 2003). Eine häufigere Beteiligung des PV B19 wäre nicht ausgeschlossen, da es sowohl einen direkten Organbefall von Leber (Pinho und Alves 2001, Toshihiro et al. 2003, Poole et al. 2004), Herz (Rohayem et al. 2001, Xu et al. 2002) und Hirn (Yoto und Kudoh 2004, Skaff und Labiner 2001), als auch Dysfunktionen durch Immunreaktionen wie Mikroangiopathien und immunkomplexvermittelte Glomerulonephritiden der Niere (Murer et al. 2000, Ohtomo et al. 2003) und damit auch unspezifische Obduktionsbefunde verursachen kann.

Als Endergebnis dieser breit gefächerten Einflüsse kommt es vermutlich entweder durch einen verminderten zentralen Atemantrieb, der durch kongenitale (Mereu et al. 2000, Vaccari et al. 2001, Kinney und Filiano 2001, Matturri et al 2004) oder akut auftretende (Russel und Vink 2001) Störungen im Hirnstamm zustande kommt, oder ein plötzliches, durch Arrhythmie, Toxinwirkung oder reflektorisch bedingtes Versagen der Herzfunktion zum Tod des Kindes.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen möglichen zerebralen Befall mit Parvovirus B19 bei SIDS zu untersuchen, um so gegebenenfalls pathophysiologisch bedeutsame und kritische Hirnregionen bei SIDS anhand der Lokalisation einer bestimmten Infektion aufzudecken.

Die Tatsache, dass das Virus in keinem der gewählten Hirnabschnitte nachgewiesen werden konnte, zeigt jedoch nur, dass zum Zeitpunkt des Todes wohl kein Parvovirus B19 mehr involviert war. Weder schließt dies aber eine gänzliche Beteiligung dieser Spezies am Geschehen noch die Überlegung aus, dass eine bestimmte Hirnregion für das Versagen der Atem-Kreislauffunktion verantwortlich sein könnte.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ackerman MJ, Siu BL, Sturner WQ, Tester DJ, Valdivia CR, Makielski JC, Towbin JA (2001) Postmortem Molecular Analysis of SCN5A Defects in Sudden Infant Death Syndrome. *JAMA* 286: 2264–2269
- Adams EJ, Chavez GF, Steen DS, Shah R, Iyasu S, Krous HF (1998) Changes in epidemiologic profile of sudden infant death syndrome as rates decline among California infants. *J Perinatol* 18:169–72
- Alexander R, Bettelheim KA, Cairney PC (1987) Microbiological investigations of suspected sudden infant death syndrome (SIDS) cases. *Aust Microbiol* 8: 156
- Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM (1985) Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 152:257-65
- Aubard Y, Magne I (2000) Carbon monoxide poisoning in pregnancy. *BJOG* 107:833–838
- Baasner A, Dettmeyer R, Graebe M, Rissland J, Madea B (2003) PCR-based diagnosis of Enterovirus and Parvovirus B19 in paraffin-embeddes heart tissue of children with suspected Sudden Infant Death Syndrome. *Lab Investigation* 83(10): 1451-5
- Baron S (1991) *Virology, Parvoviruses: Parvovirus B19*. Medical Microbiology, Third Edition © Churchill Livingstone New York: 1340
- Bard H, Côté A, Praud J-P, Infante-Rivard C, Gagnon C (2003) Fetal hemoglobin synthesis determined by gamma-mRNA/gamma mRNA+beta-mRNA Quantitation in infants at risk for Sudden Infant Death Syndrome being monitored at home for apnea. *Pediatrics* 12(4): 285-288

- Bartram U, Singer D (2004) Säuglingsbotulismus und plötzlicher Kindstod: Eine kritische Bestandsaufnahme. *Klin Pädiatr* 216(1):26-30
- Bergman AB, Beckwith JB (1970) Sudden infant death syndrome- Proceedings of the Second International Conference on Causes of Sudden Death in Infants. Seattle: University of Washington Press 1970
- Bergmann J, Bergmann R, Janetzky B, Singh S, Preddie E (2004) PrP Sc-like prion protein conformer in sudden infant death syndrome brain. *Acta Neuropathol* 107(1): 66-8
- Berke O (2004) Exploratory disease mapping: kriging the spatial risk function from regional count data. *Int J of Health Geographics* 3:18
- Bettelheim KA, Goldwater PN, Dwyer BW, Bourne AJ, Smith DL (1990) Toxigenic *Escherichia coli* associated with sudden infant death syndrome. *Scand J Infect Dis* 22: 467–76
- Bettelheim KA, Pearce JL, Evangelidis H (1993) A mouse model for sudden infant death syndrome. Proceedings of the 2nd SIDS Family International Conference, Sydney, 1992. Ithaca, NY: Perinatology Press :121–3.
- Bettiol SS, Radcliffe FJ, Hunt ALC, Goldsmid JM (1994) Bacterial flora of Tasmanian SIDS infants with special reference to pathogenic strains of *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect* 112: 275–84
- Biondo B, Magagnin S, Bruni B, Cazzullo A, Tosi D, Maturri L (2004) Glial and neuronal alterations in the nucleus tractus solitarii of sudden infant death syndrome victims. *Acta Neuropathol (Berl)* 108(4): 309-18

Blackwell CC, Weir DM, Busuttill A (2001) A microbiological perspective. In: Byard RW, Krouse HF, eds. Sudden infant death syndrome: problems, progress and possibilities. London: Arnold, 2001:182–208.

Blood-Siegfried J (2000) Sudden infant death syndrome: a toxic response. Clin Issues 11(2): 300-8

Blood-Siegfried J, Nyska A, Geisenhoffer K, Lieder H, Moomaw C, Cobb K, Shelton B, Coombs W, Germolec D (2004) Alteration in regulation of inflammatory response to influenza a virus and endotoxin in suckling rat pups: a potential relationship to sudden infant death syndrome. FEMS Immunol Med Microbiol 42(1):85-93

Bohnel H, Behrens S, Loch P, Lube K, Gessler F (2001) Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Bacteriological results obtained in central Germany. Eur J Pediatr 160(10): 623-8

Browne CA, Colditz PB, Dunster KR (2000) Infant autonomic function is altered by maternal smoking during pregnancy. Early Hum Dev. 59: 209–218

Byard RW (1995) Sudden infant death syndrome: a “diagnosis” in search of a disease. J Clin Forensic Med 2: 121–8

Byard RW, Krouse HF (2001) Specific pathologic problems and possible solutions. In: Byard RW, Krouse HF, eds. Sudden infant death syndrome: problems, progress and possibilities. London: Arnold, 2001: 230–1

Byard RW, Krouse HF (2004) Research and sudden infant death syndrome: definitions, diagnostic difficulties and discrepancies. J Paediatr Child Health 40(8): 419-21

- Cassinotti P, Weitz M, Siegl G (1993) Human Parvovirus B19 Infections: Routine Diagnosis by a New Nested Polymerase Chain Reaction Assay. *J Med Virol* 40: 228-34
- Chabe M, Vargas SL, Eyzaguirre I, Aliouat EM, Follet-Dumoulin A, Creusy C, Fleurisse L, Recourt C, Camus D, Dei-Cas E, Durand-Joly I (2004) Molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* found in formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue sections from sudden infant death victims. *Microbiology* 150(Pt 5): 1167-72
- Chong DS, Yip PS, Karlberg J (2004) Smoking: an increasing unique risk factor for sudden infant death syndrome in Sweden. *Acta Paediatr* 93(4): 471-8
- Church C, Morgan BC, Oliver TK (1967) Cardiac arrhythmia in premature infant: an indication of autonomic immaturity? *J Pediatr* 71: 542-546
- Corbyn JA (2000) Mechanisms of sudden infant death and the contamination of inspired air with exhaled air. *Med Hypotheses* 54(3): 345-52
- Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D (1975) Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1:72-3
- Cutz E, Jackson A (2001) Airway inflammation and peripheral chemoreceptors. In: Byard RW, Krouse HF, eds. *Sudden infant death syndrome: problems, progress and possibilities*. London: Arnold, 2001: 156-81
- Dales R, Burnett RT, Smith-Doiron M, Stieb DM, Brook JR (2004) Air pollution and sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 113(6): e628-31
- Deeg KH, Alderath W, Bettendorf U (1998) Basilar artery insufficiency - a possible cause of sudden infant death? Results of a Doppler ultrasound study of 39 children with apparent life-threatening events. *Ultraschall Med* 19:250-258

- Dembinski J, Eis-Hubinger AM, Maar J, Schild R, Bartmann P (2003) Long term follow up of serostatus after maternofetal parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child* 88(3): 219-21
- Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Padosch SA, Haag C, Kandolf R, Madea B (2004) Role of virus-induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postmortem study. *Pediatr Res* 55(6): 947-52
- Drucker DB, Aluyi HS, Morris JA, Telford DR, Gibbs A (1992) Lethal synergistic action of toxins of bacteria isolated from sudden infant death syndrome. *J Clin Pathol* 45: 799–801
- Dwyer T, Ponsonby A-L (1996) The decline in SIDS: a success story for epidemiology. *Epidemiology* 7: 323–5
- Enders M, Weidner A, Zoellner I, Searle K, Enders G (2004) Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat Diagn* 24(7): 513-8
- Findeisen M, Vennemann M, Brinkmann B, Ortmann C, Röse I, Köpcke W, Jorch G, Bajanowski T and the GeSID Group (2004) German study on Sudden Infant Death (GeSID): design, epidemiological and pathological profile. *Int J Legal Med* 118(3): 163-9
- Fleming PJ, Blair PS (1996) 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* 313: 191-195
- Gleeson M, Clancy RL, Cox AJ, Gulliver SA, Hall ST, Cooper DM (2004) Mucosal immune responses to infections in infants with acute life threatening events classified as 'near-miss' sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 105-18

- Gleeson M, Cripps AW (2004) Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 21-33
- Goldwater PN (2001) SIDS: more facts and controversies. *Med J Aust* 174(6): 302-4
- Goldwater PN (2003) Sudden infant death syndrome: a critical review of approaches to research. *Arch Dis Child* 88: 1095-1100
- Goldwater PN (2004) SIDS pathogenesis: pathological findings indicate infection and inflammatory responses are involved. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 11-20
- Harrison LM, Morris JA, Telford DR, Brown SM, Jones K (1999) The nasopharyngeal flora in infancy: effects of age, gender, season, viral upper respiratory tract infection and sleeping position. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 19–28
- Harrison LM, Morris JA, Bishop LA, Lauder RM, Taylor CA, Telford DR (2004) Detection of specific antibodies in cord blood, infant and maternal saliva and breast milk to staphylococcal toxins implicated in sudden infant death syndrome (SIDS). *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 94-104
- Heininger U, Kleemann WJ, Cherry JD (2004) A controlled study of the relationship between *Bordetella pertussis* infections and sudden unexpected deaths among German infants. *Pediatrics* 114(1): e9-15
- Hilton JMN (1989) The pathology of sudden infant death syndrome. In: Mason JK, ed. *Paediatric forensic medicine and pathology*. London: Chapman & Hall Medical, 1989: 156–64.

- Hoffman HJ, Damus K, Hillman L, Krongrad E (1988) Risk factors for SIDS: results of the National Institute of Child Health and Human Development SIDS Cooperative Epidemiological Study. *Ann N Y Acad Sci* 533: 13–30
- L’Hoir MP, Engelberts AC, Van Well GTJ, Mc Clelland S, Westers P, Dandachli T, Mellenbergh GJ, Wolters WH, Huber J (1998) Risk and preventive factors for cot death in Netherlands, a low-incidence country. *Eur J Pediatr* 157: 681–8
- Holdgate ST, Walters C, Walls AF, Lawrence S, Shell DJ, Variend S, Fleming PJ, Berry PJ, Gilbert RE, Robinson C (1994) The anaphylaxis hypothesis of sudden infant death syndrome (SIDS): mast cell degranulation in cot death revealed by elevated concentrations of tryptase in serum. *Clin Exp Allergy* 23: 115–23
- Horn ASC, Parslow PM, Ferens D, Watts AM, Adamson TM (2004) Comparison of evoked arousability in breast and formula fed infants. *Arch.Dis.Child* 89: 22-25
- Hunt C (1992) The cardiorespiratory control hypothesis for sudden infant death syndrome. *Clin Perinatol* 19: 757–71
- Isumi H, Nunoue T, Nishida A, Takashima S (1999) Fetal brain infection with human parvovirus B19. *Pediatr Neurol.* 21(3): 661-3
- Jakeman KJ, Rushton DI, Smith H, Sweet C (1991) Exacerbation of bacterial toxicity to infant ferrets by influenza virus: possible role in sudden infant death syndrome. *J Infect Dis* 163: 35–40
- Jorch G (2000) SIDS-Mortalität im deutschsprachigen Raum und weltweit. In: *Der plötzliche Säuglingstod. Ein Ratgeber für Ärzte und Betroffene.* Kurz R, Kenner T, Poets C (Hrsg.). SpringerWienNewYork

- Kahn A, Groswasser J, Rebuffat E, Sottiaux M, Blum D, Foerster M, Franco P, Bochner A, Alexander M, Bachy A (1992) Sleep and cardiovascular characteristics of infant victims of sudden death: a prospective case-control study. *Sleep* 15: 287–92
- Kailasam C, Brennand J, Cameron AD (2001) Congenital parvovirus B19 infection: experience of a recent epidemic. *Fetal Diagn Ther* 16(1): 18-22
- Kashiwagi Y, Kawashima H, Kanetaka Y, Ioi H, Takekuma K, Hoshika A, Matsubayashi J, Mukai K (2004) Sudden infant death syndrome due to parainfluenza virus 2 associated with hemophagocytic syndrome. *J Infect* 49(4): 329-32
- Kato I, Franco P, Groswasser J, Scaillet S, Kelmanson I, Togari H, Kahn A (2003) Incomplete arousal processes in infants who were victims of sudden death. *Am J Critical Care Med.* 168: 1298-1303
- Katz VL, McCoy MC, Kuller JA, Hansen WF (1996) An association between fetal parvovirus B19 infection and fetal anomalies: a report of two cases. *Am J Perinatol* 13(1): p43-5
- Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG (2004) The structure of human parvovirus B19. *PNAS* 101(32): 11628–11633
- Kelly DH, Pathak A, Meny R (1991) Sudden bradycardia in infancy. *Pediatr Pulmonol* 10: 199–204
- Kemp JS, Unger B, Wilkins D, Psara RM, Ledbetter TL, Graham MA, Case M, Thach BT (2000) Unsafe sleep practices and an analysis of bedsharing among infants dying suddenly and unexpectedly: results of a four-year, population-based, death-scene investigation study of sudden infant death syndrome and related deaths. *Pediatrics* 106(3): e41

- Kijima K, Sasaki A, Niki T, Umetsu K, Osawa M, Matoba R, Hayasaka K (2004) Sudden infant death syndrome is not associated with the mutation of PHOX 2B gene, a major causative gene of congenital central hypoventilation syndrome. *Tohoku J Exp Med* 203(1): 65-8
- Kinney HC, Brody BA, Finkelstein DM, Vawter GF, Mandell F, Gilles FH (1991) Delayed central nervous system myelination in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:29-48
- Kinney HC, Filiano JJ (2001) Brain research in sudden infant death syndrome. In: Byard RW, Krouse HF, eds. *Sudden infant death syndrome: problems, progress and possibilities*. London: Arnold, 2001: 118-37
- Krous HF, Jordan J (1984) A necropsy study of the distribution of petechiae in nonsudden infant death syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 108: 75-6
- Krous HF, Nadeau JM, Silva PD, Blackbourne BD (2001) Neck extension and rotation in SIDS and other natural infant deaths. *Pediatr Dev Pathol* 4(2): 154-9
- Krous HF, Nadeau JM, Silva P, Blackbourne BD (2001) Intrathoracic petechiae in sudden infant death syndrome: relationship to face position when found. *Pediatr Dev Pathol* 4(2): 160-6
- Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, Mitchell EA (2004) Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114(1): 234-8
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Mauri M, Maturri L (2004) Hypoplasia of the arcuate nucleus and maternal smoking during pregnancy in sudden unexplained perinatal and infant death. *Neuropathology* 24(4): 284-9

- Mach AM, Lindsay JA (1994) Activation of Clostridium perfringens cytotoxic enterotoxin(s) in vivo and in vitro: role of triggers for sudden infant death. *Curr Microbiol* 28: 261-7
- Mathews T J, Menacker F, MacDorman MF (2003) Infant Mortality Statist. from the 2001 period linked birth/infant death data set. *NVSS* 52(2): 1-27
- Mathews T J, Menacker F, MacDorman MF (2004) Infant Mortality Statist. from the 2002 period linked birth/infant death data set. *NVSS* 53(10): 1-27
- Matthews T, Mc Donnell M, McGarvey C, Loftus G, O'Regan M (2004) A multivariate "time based" analysis of SIDS risk factors. *Arch Dis Child* 89: 267-271
- Matturri L, Ottaviani G, Lavezzi A (2004) Autoptic examination in sudden infant death syndrome and sudden intrauterine unexpected death: proposal of a national law. *J Matern Fetal Neonatal Med* 16(2): 43-5
- Matturri L, Ottaviani G, Lavezzi AM (2005) Sudden infant death triggered by dive reflex. *J Clin Pathol* 58(1): 77-80
- McGarvey C, Mc Donnell M, Chong A, O'Regan M, Matthews T (2003) Factors relating to the infant's last sleep environment in sudden infant death syndrome in the Republic of Ireland. *Arch Dis Child* 88: 1058-1064
- McKee M, Fulop N, Bouvier P, Hort A, Brand H, Rasmussen F, Kohler L, Varasovszky Z, Rosdahl N (1996) Preventing sudden infant deaths - the slow diffusion of an idea. *Health Policy* 37: 117-135
- Mereu G, Cammalleri M, Fa M, Francesconi W, Saba P, Tattoli M, Trabace L, Vaccari A, Cuomo V (2000) Prenatal exposure to a low concentration of

carbon monoxide disrupts hippocampal long-term potentiation in rat offspring.  
J Pharmacol Exp Ther 294: 728–34

Mitchell E, Krous HF, Donald T, Byard RW (2000) Changing trends in the  
diagnosis of sudden infant death. Am J Forensic Med Pathol 21(4): 311-4

Moscovis SM, Gordon AE, Hall ST, Gleeson M, Scott RJ, Roberts-Thomson J,  
Weir DMA, Busuttill A, Blackwell CC (2004) Interleukin 1-beta responses to  
bacterial toxins and sudden infant death syndrome. FEMS Immunol Med  
Microbiol 42(1): 139-45

Moscovis SM, Gordon AE, Al Madani OM, Gleeson M, Scott RJ, Roberts-  
Thomson J, Hall ST, Weir DMA, Busuttill A, Blackwell CC (2004)  
Interleukin-10 and sudden infant death syndrome. FEMS Immunol Med  
Microbiol 42(1): 130-8

Murer L, Zacchello G, Bianchi D, Dall'Amico R, Montini G, Andreetta B, Perini  
M, Dossi EC, Zanon G, Zacchello F (2000) Thrombotic microangiopathy  
associated with parvovirus B 19 infection after renal transplantation. J Am Soc  
Nephrol 11(6): 1132-7

Murrell WG, Stewart BJ, O'Neill C, Siarakas S, Kariks S (1993) Enterotoxigenic  
bacteria in the sudden infant death syndrome. J Med Microbiol 39: 114–27

Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, Kiyokawa N, Taguchi T,  
Mimori K, Fujimoto J (2003) Nephrotic syndrome associated with human  
parvovirus B19 infection. Pediatr Nephrol 18(3): 280-2

Oyen N, Markestad T (1997) Combined effects of sleeping position and prenatal  
risk factors in sudden infant death syndrome: the Nordic Epidemiological  
SIDS Study. Pediatrics 100: 613-621

- Pearce J, Luke RK, Bettelheim KA (1999) Extraintestinal *Escherichia coli* isolations from SIDS cases and other cases of sudden death in Victoria, Australia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 137–44
- Pearce JL, Luke RK, Bettelheim KA (2004) Infection and food: a factor in sudden infant death syndrome? *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 66-75
- Pinho JR, Alves VA (2001) Detection of human parvovirus B19 in a patient with hepatitis. *Braz J Med Biol Res* 34(9): 1131-8
- Poets CF, Meny RG, Chobanian MR, Bonofiglio RE (1999) Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr Res* 45: 350–4
- Pollack HA, Frohna JG (2001) A competing risk model of sudden infant death syndrome incidence in two US birth cohorts. *J Pediatr* 138(5): 661-7
- Poole PD, Karetnyi YV, Naides SJ (2004) Parvovirus B19-Induced Apoptosis of Hepatocytes. *J of Virol* 78(14): 7775–7783
- Ray NB, Nieva DR, Seftor EA, Khalkhali-Ellis Z, Naides SJ (2001) Induction of an invasive phenotype by human parvovirus B19 in normal human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44(7): 1582-6
- Richardson DB, Wing S, Lorey F, Hertz-Picciotto I (2004) Adult hemoglobin levels at birth and risk of sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 158(4): 366-71
- Rickert CH, Zahiragic L, Nolte KW, Bajanowski T, Brinkmann B, Paulus W (2004) Cerebral c-jun expression mapping in sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 107(2): 119-26

- Risse M, Weiler G (1989) Differential diagnosis SIDS/non-SIDS on the basis of histological findings of petechial thymus hemorrhages. *Forensic Sci Int* 43: 1-7
- Rohayem J, Dinger J, Fischer R, Klingel K, Kandolf R, Rethwilm A (2001) Fatal myocarditis associated with acute parvovirus B19 and human herpesvirus 6 coinfection. *J Clin Microbiol* 39(12): 4585-7
- Rusen ID, Shiliang L, Sauve R, Joseph KS, Kramer MS (2004) Sudden infant death syndrome in Canada: Trends in rates and risk factors, 1985-1998. *J Chronic Disease* 25(1): 1-6
- Russell M J, Vink R (2001) Increased facial temperature as an early warning in Sudden Infant Death Syndrome. *Med Hypotheses* 57(1): 61-3
- Salimans MM, van de Rijke FM, Raap AK, van Elsacker-Niele AM (1989) Detection of parvovirus B19 DNA in fetal tissues by in situ hybridisation and polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.*42(5): 525-30
- Sarawar SR, Blackman MA, Doherty PC (1994) Superantigen shock in mice with an inapparent viral infection. *J Infect Dis* 170: 1189-94
- Sartiani L, Cerbai E, Lonardo G, DePaoli P, Tattoli M, Cagianò R, Carratù MR, Cuomo V, Mugelli A (2004) Prenatal Exposure to Carbon Monoxide Affects Postnatal Cellular Electrophysiological Maturation of the Rat Heart. *J Circulation* 1: 419-423
- Sayers NM, Drucker DB, Telford DR, Morris JA (1995) Effects of nicotine on bacterial toxins associated with cot death. *Arch Dis Child* 73: 549-51
- Sayers NM, Drucker DB (1999) Animal models used to test the interactions between infectious agents and products of cigarette smoked implicated in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 115-23

- Sayers NM, Drucker DB, Hutchinson IV, Barson AJ (1999) Preliminary investigation of lethally toxic sera of sudden infant death syndrome victims and neutralisation by commercially available immunoglobulins and adult sera. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 193–8
- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R (2000) A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 343: 262–267
- Schwartz PJ, Priori SG, Bloise R, Napolitano C, Ronchetti E, Piccinini A, Goj C, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Nastoli J (2001) Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* 358(9290): 1342-3
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi G, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, Salice P (1998) Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 338: 1709–1714
- Shao XM, Feldman JL (2001) Mechanisms underlying regulation of respiratory pattern by nicotine in preBotzinger complex. *J Neurophysiol* 85(6): 2461-7
- Sheehan KM, Mc Donnell M, Doyle EM, Matthews T, Devaney DM (2003) The quality and value of sudden infant death necropsy reporting in Ireland. *J Clin Pathol* 56: 753-757
- Sherburn RE, Jenkins RO (2004) Cot mattresses as reservoirs of potentially harmful bacteria and the sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 76-84
- Siebert JR, Haas JE (1994) Organ weights in sudden infant death syndrome. *Pediatr Pathol* 14: 973–85

- Skaff PT, Labiner DM (2001) Status epilepticus due to human parvovirus B19 encephalitis in an immunocompetent adult. *Neurology* 57(7): 1336-7
- Smith-Whitley K, Zhao H, Hodinka RL, Kwiatkowski J, Cecil R, Cecil T, Cnaan A, Ohene-Frempong K (2004) Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease. *Blood* 103(2): 422-7
- Sundell HW (2004) SIDS prevention-good progress, but now we need to focus on avoiding nicotine. *Acta Paediatr* 93(4):450-2
- Takashima S, Armstrong D, Becker LE, Huber J (1978) Cerebral white matter lesions in the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 62: 155-9
- Takatsu A, Misawa S, Yoshioka N, Nakasono I, Sato Y, Kurihara K, Nishi K, Maeda H, Kurata T (2000) A proposal of essentials for forensic pathological diagnosis of sudden infant death syndrome (SIDS). *Nippon Hoigaku Zasshi* 54(2): 247-55
- Toro K, Meszaros R, Meszaros A, Csukas Z (2004) Change in immunisation schedule and sudden infant death syndrome in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(1): 119-24
- Toshihiro M, Takikawa Y, Fukuda Y, Sato S, Endou R, Suzuki K (2003) A case of acute hepatitis associated with parvovirus B19. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 100(11): 1312-6
- Vaccari A, Ruiu S, Saba P (2001) Prenatal low-level exposure to CO alters postnatal development of hippocampal nitric oxide synthase and haem-oxygenase activities in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 4: 219-22
- Valdes-Dapena MA (1980) Sudden infant death syndrome: a review of the medical literature 1974-1979. *Pediatrics* 66: 597-614

- Wailoo M, Thompson JR, Waite AJ, Coombs RC and Jackson JA (2003) Signs and symptoms of illness in early infancy associated with sudden infant death. *Arch Dis Child* 88: 1001-1004
- Wedekind H, Smits JPP, Schulze-Bahr E, Arnold R, Veldkamp MW, Bajanowski T, Borggreffe M, Brinkmann B, Warnecke I, Funke H, Bhuiyan ZA, Wilde AA, Breithardt G, Haverkamp W (2001) De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation* 104: 1158–1164
- Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A (2003) Alpha5 beta1-integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1-integrin for viral entry. *Blood* 102(12):3927-33
- Weir E (2005) Parvovirus B19 infection: fifth disease and more; *CMAJ* 172(6): 743
- Wigfield RE, Fleming PJ, Berry PJ, Rudd PT, Golding J (1992) Can the fall in Avon's sudden infant death rate be explained by changes in sleeping position? *BMJ* 304: 282–3
- Xu D, Zhang G, Li B, Wang X, Sun X (2002) Relationship between human parvovirus B19 infection and spontaneous abortion and congenital heart disease in China. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 37(6): 324-6
- Yoto Y, Kudoh T (2001) Human parvovirus B19 and meningoencephalitis. *Lancet* 358(9299): 2168
- Young NS, Brown KE (2004) Parvovirus B19. *N Engl J Med* 350: 586-97

## 6. Lebenslauf

Geboren: am 18.05.1966 in Waldshut-Tiengen

Schulbildung: „Hans-Thoma“-Grundschule Laufenburg 1972-1976  
 Scheffel-Gymnasium Bad Säckingen 1976-1985  
 Abitur 25.06.1985

Studium: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 1988-1997  
 Abschluß d. ärztlichen Prüfung 29.04.1997

Praktisches Jahr: -Chirurgische Abteilung 22.04.-28.06.1996  
 General Hospital Castlebar/Irland  
 -Innere Abteilung 29.07.-17.11.1996  
 Regionalspital Laufenburg/Schweiz  
 -Neurologische Klinik 18.11.'96-09.03.'97  
 Universitätsklinikum Freiburg i. Br.

Berufliche Tätigkeit: -Ärztin im Praktikum 01.06.'97-30.11.'98  
 Neurologische Klinik Elzach  
 -Assistenzärztin Innere Abteilung 01.01. -31.01.1999  
 Epilepsiezentrum Kehl-Kork  
 -Betreuende Ärztin Opiatabhängiger 01.04. -31.10.2000  
 Psychiatrische Uniklinik Basel/CH  
 -Assistenzärztin Neurologie 01.11.'00-30.04.'03  
 Städtisches Klinikum Offenburg

Zur Zeit tätig: Assistenzärztin, Abteilung Sucht/ legale Drogen  
 Psychiatrie I, Klinikum Bremen Ost seit 13.09.2004

## 7. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Paulus, mir als Universitätsfremder das Dissertationsthema zu überlassen, mir weitgehend freie Hand bei der Ausarbeitung zu lassen und mit seinen wenigen kritischen Bemerkungen den Focus wieder auf wesentliche Punkte und den Gesamtzusammenhang zu lenken, wenn die Gefahr bestand, sich in Einzelheiten zu verlieren.

Ebenfalls Dank für das Angebot der Arbeit und die gemeinsame Überarbeitung gebührt Hr. Priv. Doz. Dr. Christian Rickert, der trotz seines hohen Arbeitsaufkommens immer ein freundliches offenes Ohr für meine Anliegen hatte und mich bei der Materialbeschaffung unterstützte.

Einen ganz besonderen Dank will ich an Hr. Dr. Volker Senner und Fr. Dr. Sylvia Püttmann richten, die mir vor allem in der Anfangszeit viele Stunden Aufmerksamkeit und Hilfe schenkten, mit mir gemeinsam immer wieder auftauchende Hürden überwandten, wertvolle Ratschläge gaben, wenn ich mich in einer Sackgasse wähnte und mir bei Rückschlägen Mut zusprachen, dass doch alles noch gut wird.

Nicht zuletzt muß ich auch meinen Mitstreitern im Institut für ihre freundliche Aufnahme danken und vor allem Fr. Susanne Peetz-Dienhart für ihre ermunternden Worte und so manchen verbalen und kulinarischen Trost.

Danke, ohne Sie und euch hätte ich es nicht geschafft.

## 8. Anhang

### 8.1 PCR-Ergebnisse der einzelnen Proben:

Herkunftsorte: Universitäten MS=Münster, HH=Hamburg, HN=Hannover, AA=Aachen, OL=Oldenburg

<b>SIDS</b> Sekt. Nr.	Post-mort.- Int. in Tagen	Nachweis GAPDH 121 bp	Nachweis Parvovir. B19	Entnahmeort / Bemerkungen	Herkunft Geschlecht Alter/Tage
128/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	-	-Gyrus frontalis links -Gyros occipitalis rechts -Cerebellum li. lateral -Pons oberer Teil	MS w 97
223/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	-		AA m 32
231/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	-		HH m 92
59/00 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	-		HN w 151
160/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	3	+	-		MS w 144
228/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	2	+	-	Kontamination? Kreuzreaktion?	AA m 24
125/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	0	+	-	Kontamination? KR?	MS w 241
126/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	0	+	-	Kontamination? KR?	MS w 124
222/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	3	+	(+)	Kontamination? KR?	HH w 41
233/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	3	(+)	(+)	Kontamination? KR?	MS m 73

63/00	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	1	- (+) + -	- - - (+)	Kontamination ? KR?	HN w 320
78/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	0	- - - -	- - + -	Kontamination ? KR?	HN m 149
79/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	0	- - - -	- - - (+)	Kontamination? KR?	HN m 77
226/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	0	- - - -	- - - -		HN m 270
127/00	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	1	(+) - (+) -	+ - - +	Kontamination? KR?  „	MS m 59
224/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	1	- - (+) -	- - - -		HN m 84
229/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	1	- - - -	++ - - ++	vermutl. Kontamination  „	HN m 262
62/00	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	1	(+) - - -	- ++ ++ -	vermutl. Kontamination  „	HN w 220
64/00	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	1	- - - -	- - - -		HN w 185
124/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	2	0 - - -	0 - - -	-zu wenig Gewebe vorhand.	MS w 283
225/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	2	(+) - + -	- - - -		HN m 77
230/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	2	- (+) (+) -	(+) - - -	Kontamination?	HN m 111
277/99	$\frac{1}{2}$ $\frac{2}{2}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{4}{4}$	3	- - - -	- - - -		MS m 126

<b>+Kontrolle</b> Sekt. Nr.	Post-mort.- Int. in Tagen	Nachweis GAPDH 121 bp	Nachweis Parvovir. B19	Entnahmeort / Bemerkungen	Herkunft	
44/99 <u>1H</u> <u>8H</u> <u>1</u> <u>2</u> <u>5</u>		+	+	-Cortex frontal -Hypothalam. -Lunge -Myocard -Niere + Milz	Tod durch virale(B19) Myocar- ditis !	MS m 13 Jahre
149/00		+	-	Pons, DNA aus Kryogewebe gewonnen	MS	
		(GAPDH 261 bp auch + )				

<b>Andere Dg.</b> (Referenz)	Post-mort.- Int. InTagen	Nachweis GAPDH 121 bp	Nachweis Parvovir. B19	Entnahmeort / Bemerkungen	Herkunft
342/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	-	Pertussis	HN w 65
111/00 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	0	+	-	Influenza	MS m 321
112/00 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	0	+	-	Asphyxie	MS m 229
232/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	(+)	Phlegmone, Aspiration Kontamination?	HN w 218
129/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	+	-	Ileus, Exsiccose	MS w 121
28/99 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	2	(+)	-	Pneumonie, Aspiration - wenig Material	? w 189
282/00 <u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u>	1	-	-	Di-George-Syndrom, Infekt Kontamination?	MS w 160
		-	+		
		-	-		

## 8.2 Verwendete Primersequenzen:

GAPDH 76bp : (f : 928-948, r: 979-1003 -> Platz der Nucleotide im Gesamt-Genom)

forward : 5'- ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC -3'

reverse : 3'- AAA CAG TTC GAG TAA AGG ACC ATA C -5'

GAPDH 123bp : (f : 881-899, r: 979-1003)

forward : 5'- TG GGC TAC ACT GAG CAC CAG -3'

reverse : 3'- AAA CAG TTC GAG TAA AGG ACC ATA C -5'

(= GAPDH 75bp rev.)

GAPDH 261bp : (f: 598-620, r: 838-858)

forward : 5'- GCC ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC -3'

reverse : 3'- CGA CGC CTG CTT CAC CAC CTT -5'

PV-B19 85bp: (f: 3839-3858, r:3905-3923)

forward: 5'- CCA GAA AAT TTA GAG GGC TG -3'

reverse: 3'- GA ATC CCC AAG GAC TGT GTA -5'

PV-B19 121bp: (f: 3818-3837, r:3920-3938)

forward: 5'- TAT AAG TTT CCT CCA GTG CC -3'

reverse : 3'- TGT AAT CCT CCA CTG GGT T -5'

PV-B19 201bp: (f: 3775-3792, r: 3956-3975)

forward: 5'- TTC TTT TCA GCT TTT AGG -3'

reverse : 3'- GTA CTT CTG GTA CGT TAA GT -3'