

CAT
Critically Appraised Topic

Oppuntstelling van de laboratoriumdiagnostiek van virale myocarditis

Author: Paul-Emile Claus

Supervisor: An Boel

Date: 11 december 2018

CLINICAL BOTTOM LINE

Myocarditis is een inflammatoire aantasting van het hartspierweefsel die kan leiden tot acuut hartfalen en plotse dood. Hoewel deze aandoening wereldwijd minder frequent is dan ischemische en valvulaire cardiopathieën, verdient ze belangrijke aandacht omdat ze met een heterogeen ziektebeeld kan gepaard gaan en vaker voorkomt bij jonge patiënten. Verschillende etiologieën kunnen aan de basis liggen, maar het zijn toch vooral virale infecties die myocarditis veroorzaken. Samen met de complexe pathofysiologie leidt dit ertoe dat de diagnostiek van deze aandoening moeilijk en uitdagend is, en dat het arsenaal aan verrichte onderzoeken sterk verschilt van centrum tot centrum. Door de snelle technische evolutie in de medische beeldvorming hebben de cardiale MRI en echocardiografie een vaste plaats in de diagnostische work-up. Wat betreft de optimale keuze van laboratoriumtesten bestaat er echter nog veel discussie, en zijn de voor- en nadelen onder heel wat klinici niet altijd gekend. In recente richtlijnen en volgens de expertise van enkele grote cardiologische centra is het afnemen van myocardbiopsies voor histopathologisch en moleculair onderzoek de gouden standaard in de diagnostiek van myocarditis. Er zijn maar weinig ziekenhuizen in België die hiermee ervaring hebben. Ook in het Onze-Lieve-Vrouweziekenhuis Aalst (OLVZ) ontbreekt een eenduidig diagnostisch protocol en wordt slechts zelden een PCR onderzoek voor virale verwekkers op een myocardbiopsie uitgevoerd. Met de huidige diagnostische workflow wordt in heel wat gevallen geen exacte etiologie gevonden. Daarom hebben we in het labo microbiologie van het OLVZ samen met de dienst cardiologie uitgezocht hoe we een breed diagnostisch algoritme voor deze aandoening kunnen oppuntstellen. In deze CAT wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste uitdagingen en bevindingen, vertrekkende van een uitgebreide literatuurstudie en een retrospectieve analyse van laboresultaten in een kleine populatie van myocarditispatiënten.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Afhankelijk van de oorzaak kan de pathogenese en daardoor ook de kliniek van myocarditis sterk verschillen. Zowel infectieuze als niet-infectieuze verwekkers, zoals virussen, bacteriën, protozoa, fungi, toxines, medicatie, auto-immun- en systeemziektes kunnen een erg variërend klinisch beeld van myocarditis geven. De verschillende etiologieën worden verderop in deze CAT meer in detail weergegeven (zie tabel 1). Voor Europa en Noord-Amerika zijn virale infecties hiervan de meest voorkomende. In de pathogenese van virale myocarditis kunnen grosso modo drie verschillende fases onderscheiden worden. In het acute stadium

(acute myocarditis) sterven myocyten af door hetzij cytokines die vrijkomen na activering van de humorale en cellulaire immuunrespons, hetzij door een direct cytolytisch effect van het agens op het myocard. In geval van een viraal agens zal in ongeveer 50% van de patiënten het immuunsysteem er in slagen om het infectieuze agens te elimineren en treedt er een spontaan herstel op met volledig behoud van de cardiale functie ('healed myocarditis'). Ruim een derde van de patiënten zal echter een chronische vorm van myocarditis ontwikkelen door het persisteren van de virale infectie met aanhoudende inflammatie en een voortdurend proces van destructie en remodeling van het myocard. Soms gaat dit proces gepaard met de vorming van cardiale autoantistoffen. Door toenemende destructie van het myocard zal na verloop van tijd het linker hartventrikel dilateren en de systolische functie afnemen. Myocarditis kan zo evolueren naar een gedilateerde cardiomyopathie (DCM) wat als een aparte klinische entiteit wordt beschouwd, en chronisch hartfalen. DCM kan naast een virale inflammatie van het myocard nog andere oorzaken hebben zoals toxisch-geïnduceerde myocarditis, en zou meer beïnvloed worden door een genetische voorbeschiktheid (1).

Naar behandeling van myocarditis toe werd de afgelopen decennia meer en meer geopperd dat er naast specifieke, supportieve hartfalen therapie ook een plaats is voor immunosuppressieve en antivirale behandelingen. Om gerichte therapie te kunnen opstarten, is het in de eerste plaats belangrijk na te gaan of, en welke virale infectie aan de oorzaak ligt van de myocarditis. Zeker bij patiënten waarbij de virale infectie persisteert en het continu verlopende proces van destructie/remodeling in negatieve richting verloopt, zouden immunosuppressieve of antivirale therapieën een meerwaarde kunnen bieden (2). Voor een correcte diagnostiek dient dan ook moleculair onderzoek te gebeuren naar de voornaamste cardiotrope virussen op een endomyocardiaal biopt (EMB): enterovirus, adenovirus, parvovirus B19 (PVB19), humaan herpesvirus type 6 (HHV6), cytomegalovirus (CMV) en Epstein-Barrvirus (EBV). Gerichte antivirale therapieën die in sommige studies worden gesuggereerd zijn: intraveneuze immuunglobulines (IVIG) bij acute enterovirus-, CMV-, EBV- en PVB19-infectie, oraal val-/ganciclovir bij HHV6 perimyocarditis en IFN- β voor enterovirale perimyocarditis. Het gaat hier echter om preklinische, fase I en II studies waarin potentiële therapeutische effecten worden gezien (3-5). Fase III randomized controlled trials of klinische studies die de resultaten op lange termijn en op grotere schaal bestuderen, zijn er echter tot op heden niet.

Naast moleculair onderzoek naar virussen worden ook histopathologisch onderzoek en immunohistochemische kleuringen op EMB aanbevolen. De in 1986 opgestelde Dallas criteria bieden een histopathologische classificering waarmee de diagnose van myocarditis kan worden gesteld: zo moet er een inflammatoir celfiltraat in het myocard aanwezig zijn, al dan niet in combinatie met myocarde necrose die niet typisch is voor een ischemisch event. Hoewel deze criteria meer en meer als 'verouderd' worden afgestempeld, blijft volgens recente richtlijnen het afnemen van myocardbiopsies voor histopathologisch, immunohistochemisch en moleculair onderzoek de gouden standaard (6). Er zijn maar weinig centra in België die hiermee een ruime ervaring hebben. Onder meer om deze reden lijkt het ons evident dat myocarditis niet altijd gediagnosticeerd wordt, en dat de prevalentie vermoedelijk hoger is dan in de medische literatuur beschreven wordt.

In het OLVZ Aalst worden de microbiologen dagelijks gecontacteerd voor adviezen in complexe infectiologische casussen. Hierbij geven ze meer dan enkel advies omtrent gebruik van antibiotica (dosissen, resistentieproblemen, enz.) maar worden ook bijkomende laboratoriumonderzoeken, beeldvorming en chirurgische interventies, wanneer deze geïndiceerd zijn, en/of multidisciplinair overleg aanbevolen. Alle consulten worden geregistreerd in een database. Ook over de aangewezen diagnostiek bij myocarditis wordt soms advies gevraagd. Dit was o.a. de aanleiding om na te gaan wat de aanbevelingen zijn, waarop deze gebaseerd zijn en welke laboratoriumtesten tot nu toe aangevraagd werden.

Inzake diagnostiek van myocarditis was er tot voor kort geen eenduidig beleid en wordt er nog te vaak virale serologie aangevraagd hoewel dit in internationale richtlijnen niet wordt ondersteund (7). Kruisreacties - bijvoorbeeld tussen CMV en EBV, of tussen niet-cardiotrope enterovirussen en het cardiotrope coxsackievirus B3 - , rest-titers voor IgM antistoffen die weken na een acute infectie kunnen aanhouden, de nood aan opvolgstalen, enzovoort, maken de interpretatie van serologische testen moeilijk. Een eenmalig, positief resultaat voor IgM antistoffen is niet voldoende om blindelings op te vertrouwen en impliceert niet dat het desbetreffende virus een infectie van het myocard veroorzaakt. In de algemene, gezonde populatie is de prevalentie van (polyclonale) IgG antistoffen gericht tegen enkele van de cardiotrope virussen hoog zonder dat er daarbij sprake is van een virale myocarditis.

In het OLVZ Aalst worden echter nog serologische testen aangevraagd bij patiënten met vermoeden van een myocarditis en is de drempel voor het nemen van EMB nog relatief hoog. Indien toch biopten worden genomen, wordt hierop niet systematisch PCR onderzoek voor de 6 belangrijke cardiotrope virussen aangevraagd. Het aantal biopten dat wordt afgenomen kan bovendien variëren van cardioloog tot cardioloog. Bij patiënten waarbij geen myocardbiopten worden genomen, wordt regelmatig virale PCR uitgevoerd op andere staaltypes zoals bloed en respiratoire stalen (sputa, broncho-alveolaire lavages en nasopharyngeale wissers). Ook hiervan wordt de meerwaarde in vraag gesteld. Grote studies die de correlatie tussen moleculair onderzoek op EMB en op andere staaltypes bestuderen, ontbreken echter.

QUESTION(S)

- 1) Waarom is de laboratoriumdiagnostiek voor virale myocarditis zo complex en de meerwaarde van serologie gering?
- 2) Hoe kunnen we in het labo microbiologie in het OLVZ Aalst onze adviezen over de best aan te vragen onderzoeken optimaliseren binnen een breder, klinisch-diagnostisch algoritme?

SEARCH TERMS

- 1) PubMed search using MeSH Database: MeSH terms: “Myocarditis” (Analysis, Diagnosis, Etiology, Microbiology, Physiopathology); “Cardiomyopathy, dilated” (Analysis, Diagnosis, Etiology, Microbiology, Physiopathology); “Serology”; “(Multiplex) Polymerase Chain Reaction”; “Enterovirus B, Human”; “Adenoviridae”; “Parvovirus B19, Human”; “Cytomegalovirus”; “Herpesvirus 4, Human”; “Herpesvirus 6, Human”
- 2) Other (non-MeSH) search terms: “Endomyocardial biopsy”; “Cardiotropic viruses”
- 3) UpToDate Online (2016)
- 4) European Society of Cardiology Guidelines and Webinars (E-learning)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*
 - 2) *Systematic Reviews and Meta-analyses*
 - 3) *Reviews*
 - 4) *Original Articles*
 - 5) *Reference Works, Handbooks and Databases*
 - 6) *Posters, “grey literature”, presentations*
 - 7) *Guidelines and Recommendations*
-
1. Heggermont W, Vanderheyden M. Myocarditis en gedilateerde cardiomyopathie. Nieuwe inzichten dankzij de moleculaire cardiologie. *Tijdschrift voor Cardiologie* 2016;28(3):149-153.
 2. Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur Heart J* 2011;32:2616-2625.
 3. Schultheiss H, Piper C, Sowade O et al. Betaferon in chronic viral cardiomyopathy (BICC) trial: effects of interferon- β treatment in patients with chronic viral cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2016;105:763-73.
 4. Kühl U, Lassner D, von Schlippenbach J et al. Interferon-beta improves survival in Enterovirus-associated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1295-1296.
 5. Krueger G, Ablashi D. Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirology* 2003;46:257-269.
 6. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2013;34:2636-2648.
 7. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation* 2007;116:2216-2233.
 8. Adler Y, Charron P, Imazio M et al. 2015 ESC Guidelines for the diagnosis and management of pericardial diseases: The Task Force for the Diagnosis and Management of Pericardial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: The European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* 2015;36(42):2921–2964.

9. Maisch B, Rupp H, Ristic A, Pankuweit S. Pericardioscopy and epi- and pericardial biopsy — a new window to the heart improving etiological diagnoses and permitting targeted intrapericardial therapy. *Heart Fail Rev* 2013;18:317–328.
10. Mahfoud F, Gärtner B, Kindermann M et al. Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility? *Eur Heart J* 2011;32:897-903.
11. Caforio AL, Marcolongo R, Basso C et al. Clinical presentation and diagnosis of myocarditis. *Heart* 2015;101:1332-1344.
12. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F et al. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003;107:857-863.
13. Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J* 2009;30:1995-2002.
14. Kühl U et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005;112:1965-1970.
15. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005;111:887-893.
16. Yuan JP, Zhao W, Wang HT et al. Coxsackievirus B3-induced apoptosis and caspase-3. *Cell Res* 2003;13:203-209.
17. Bock CT, Klingel K, Aberle S et al. Human parvovirus B19: a new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy. *J Vet Med* 2005;52:340-343.
18. Tschope C, Bock CT, Kasner M et al. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 2005;111:879-886.
19. Pankuweit S, Klingel K. Viral myocarditis: From experimental models to molecular diagnosis in patients. *Heart Failure Reviews* 2013;18(6):683-702.
20. Corsten M, Heggermont W, Papageorgiou AP et al. The microRNA-221/-222 cluster balances the antiviral and inflammatory response in viral myocarditis. *Eur Heart J* 2015;36:2909-19.
21. Heymans S, Eriksson U, Lehtonen J et al. The quest for new approaches in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2016;68(21):2348-64.
22. Lotze U, Egerer R, Glück B et al. Low level myocardial parvovirus B19 persistence is a frequent finding in patients with heart disease but unrelated to ongoing myocardial injury. *J Med Virol* 2010;82:1449-57.
23. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1914-1931.
24. Yilmaz A, Kindermann I, Kindermann M et al. Comparative evaluation of left and right ventricular endomyocardial biopsy: differences in complication rate and diagnostic performance *Circulation* 2010;122:900-909.

I) Waarom is de laboratoriumdiagnostiek voor virale myocarditis complex en de meerwaarde van serologie gering?

A. Oorzaken van myocarditis

Myocarditis kent talrijke etiologische factoren die elk met hun eigen pathofysiologische mechanismen kunnen gepaard gaan en een verschillende klinische presentatie en diagnostische moeilijkheden kunnen geven. Tabel I geeft enkele van deze oorzaken weer.

Tabel I: oorzaken van myocarditis. Exacte percentages of prevalentiecijfers hebben we niet teruggevonden in de literatuur. De verschillende oorzaken worden per categorie weergegeven van meer tot minder belangrijk (naar Caforio et al 2013).

Infectieuze oorzaken	
Virussen	RNA virussen: enterovirus (bijna uitsluitend coxsackievirus type B), echovirus, influenzavirus type A en B, RSV, HIV-1
	DNA virussen: PVB19 (meest voorkomend in Noordwest-Europa), adenovirus (vooral bij kinderen), CMV (vooral immunogecompromitteerden), HHV6 (vaak geassocieerd met PVB19), EBV
Bacteriën	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Mycobacterium (tuberculosis)</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>rickettsia</i> (zeldzaam)
Spirocheten	Borrelia (Lyme), Leptospira (Weil)
Parasieten	Zeldzaam (typisch eosinofiele myocarditis)
Protozoa	Trypanosoma cruzi (vooral in Zuid-Amerika)
Fungi	Zeldzaam; bij immunogecompromitteerde patiënten
Niet-infectieuze, immunogemedieerde oorzaken	
Auto-immuun	Auto-immuunaandoeningen: systeemlupus (SLE), reumatoïde artritis, Churg-Strauss syndroom, Kawasaki, inflammatoire darmziekten, sclerodermie, polymyositis, myasthenia gravis, diabetes mellitus type 2, thyrotoxicose, sarcoidose, Wegener's granulomatose.
	Idiopathisch: niet-infectieuze lymfocyttaire myocarditis, niet-infectieuze giant-cell myocarditis
Allo-antigeen	Afstoting harttransplant
Allergieën	Tetanus toxoïden, vaccins
	Medicamenteus: penicilline, colchicine, furosemide, isoniazide, lidocaine, tetracycline, sulfonamides, fenytoïne, fenylbutazon, methyldopa, thiazide diuretica, amitriptyline
Toxische myocarditis	
Medicamenteus	Amfetamines, anthracyclines, cocaïne, cyclofosfamide, ethanol, fluorouracil, lithium, catecholamines, hemetine, interleukine-2, trastuzumab, clozapine
Zware metalen	Koper, ijzer, lood
Hormonaal	Feochromocytoom, vitaminetekort: bijv. beriberi

Andere

Schorpioen-, slang- of spinnenbeet, wespenteek, CO-vergiftiging, arsenicum, bestraling, elektrische shock

Bovenvermelde etiologieën (met op kop virale infecties) kunnen naast een inflammatie van het myocard ook een acute pericarditis veroorzaken. Het pericard ligt als een vezelachtig dubbelvlies rond het myocard. De binnenste, dunne laag, het viscerale pericard, is vergroeid met de hartspier. Het buitenste, pariëtale blad beschermt het hart dankzij haar stevigheid en scheidt aan de binnenkant (in de pericardiale ruimte) een vloeistof af waardoor de twee lagen van het pericard gemakkelijk over elkaar kunnen glijden tijdens het pompen van het hart. Bij een inflammatie van het pericard door cardiotrope virussen is het niet ongebruikelijk dat ook het myocard aangetast wordt. De 2 termen "perimyocarditis" en "myopericarditis" worden gebruikt om de ziekte te beschrijven. Hoewel perimyocarditis vooral de betrokkenheid van het myocard impliceert, en myopericarditis duidt op een overheersend pericardiale aantasting, worden beide termen in de literatuur en klinische praktijk door elkaar gebruikt (8).

Acute virale pericarditis presenteert zich vaak als een zelf-limiterende ziekte die goed reageert op een korte kuur met NSAID's, met de toevoeging van colchicine voor de preventie van recidieven. De identificatie van virale etiologieën helpt bij het begrijpen van de pathogenetische mechanismen, en kan volgens sommige deskundigen net zoals bij virale myocarditis een geïndividualiseerde, specifieke behandeling mogelijk maken. Zij suggereren dezelfde antivirale therapieën als voor virale myocarditis (9).

B. Retrospectieve analyse voor OLVZ Aalst

We voerden een retrospectieve analyse uit van de serologie en PCR-resultaten bij 33 nieuwe myocarditispatiënten in het OLVZ Aalst in de periode van april 2008 tot en met september 2017. De selectie van deze groep patiënten gebeurde in samenspraak met de cardiologen: zij stelden de eindiagnose van een myocarditis op basis van kliniek, beeldvorming, biochemie en APO indien EMB waren afgenomen. Bij 2 patiënten was er tevens een duidelijke pericarditis-component. Bij 30/33 patiënten werden één of meerdere serologische testen uitgevoerd. Bij 26/33 patiënten werden EMB afgenomen voor APO.

- De volgende serologische testen werden uitgevoerd:
 - In 7% (2/30) enkel PVBI9
 - In 7% (2/30) enkel CMV en EBV
 - In 3% (1/30) PVBI9, CMV en EBV
 - In 57% (17/30) werd een uitgebreidere serologie aangevraagd met PVBI9, CMV en EBV met daarbij o.a. toxoplasma, borrelia, herpes simplex virus (HSV), varicella zostervirus (VZV), hepatitis C virus (HCV) en HIV. In 18% hiervan (3/17) werd ook complementfixatie voor coxsackievirus type B uitgevoerd. Serologie voor coxsackievirus type B werd in het totaal bij 8 patiënten aangevraagd, maar dit werd in de meeste gevallen niet uitgevoerd omdat er geen gepaarde sera waren afgenomen.

- In 20% (6/30) werd er naast serologie voor PVBI9, CMV en EBV ook getest voor antistoffen gericht tegen HSV en VZV.
- In 3% (1/30) werd naast serologie voor PVBI9 ook een indirecte immunofluorescentie voor HHV6 uitgevoerd.
- In 3% (1/30) werd CMV, HSV, VZV en toxoplasma serologie uitgevoerd.

Tabel 2: verdeling van de aangevraagde serologische testen.

* Coxsackievirus type B werd bij slechts 3 van deze patiënten uitgevoerd gezien bij de andere patiënten geen gepaarde sera waren afgenomen.

Infectieus agens	Aantal patiënten	%
PVB19	27/30	90
CMV	27/30	90
EBV	26/30	87
HSV	17/30	57
VZV	15/30	50
Toxoplasma	14/30	47
Borrelia	12/30	40
HCV	8/30	27
HIV	8/30	27
Coxsackie B virus	8/30*	27
HHV6	1/30	3

- Bij slechts 4 patiënten waren er positieve serologie-resultaten:
 - 2/30 patiënten hadden positieve IgM antistoffen voor CMV: 1 zwak positief (net boven cut-off) met sterk positieve IgG antistoffen, de andere patiënt had zwak positieve IgM én IgG antistoffen. PCR voor CMV op bloed was bij beide patiënten negatief. Bij slechts 1 van deze 2 patiënten waren EMB afgenomen met op anatomopathologie (APO) een beeld suggestief voor myocarditis. Op het biopt was er geen PCR aangevraagd. Bij beide patiënten vonden we helaas geen voorafgaande serologie om de CMV immuunstatus na te gaan.
 - 1 patiënt had positieve IgM en zwak positieve IgG antistoffen voor HHV6 (via indirecte immunofluorescentie).
 - 1 patiënt had positieve IgM antistoffen voor CMV en PVBI9 met zwak positieve en oplopende IgG antistoffen voor CMV. Bij deze patiënt werd een dubbele virale infectie (CMV en PVBI9) vermoed. PCR op bloed voor CMV was positief met weliswaar een lage titer (< 5000 kopieën/mL). Myocarditis door co-infecties met PVBI9 worden beschreven in de literatuur maar de klinische impact hiervan is vermoedelijk niet erg groot.
- Bij 26/33 patiënten werden EMB afgenomen waarbij APO positief was in slechts 10 gevallen (38%) ondanks toch een kliniek, echocor en/of MRI van het hart sterk suggestief voor myocarditis. Ook APO van myocardbiopten heeft belangrijke beperkingen in de diagnostiek van myocarditis door zogenaamde 'scattering' of spreiding van de inflammatiehaarden in het hartspierweefsel. Virale PCR op EMB werd bij slechts 5/26 patiënten uitgevoerd:

- Bij 1 patiënt enkel voor adeno- en enterovirus.
- Bij 1 patiënt voor adeno-, enterovirus en PVBI9.
- Bij 1 patiënt voor adenovirus, PVBI9, CMV, EBV en HHV6.
- Bij 2 patiënten werd naast adeno-, enterovirus en PVBI9 ook PCR voor CMV en EBV uitgevoerd.

Bij geen enkele patiënt werd er via PCR op EMB een viraal agens geïdentificeerd.

- Bij 13/33 patiënten werd PCR voor CMV en EBV uitgevoerd op bloed. Er was slechts 1 patiënt waarbij CMV DNA in het bloed werd gedetecteerd met een erg lage load (zie hoger).
- Bij 19/33 patiënten werd PCR voor 1 of meerdere virussen uitgevoerd op respiratoire stalen: voornamelijk sputa, broncho-alveolaire lavages en nasopharyngeale wissers. Bij 3/19 patiënten (16%) werd er in deze stalen viraal DNA/RNA gedetecteerd: 1 patiënt met een rhinovirus (hoge load), 1 patiënt met HSV (lage load) en 1 patiënt had een keelwisser positief voor parainfluenza virus type 3 (matige load) en rhinovirus (lage load). Deze virussen werden bij deze patiënten echter niet in bloed getest, noch door middel van serologie noch met PCR.

Uit deze korte retrospectieve analyse blijkt dat de opbrengst van bovenvermelde onderzoeken zeer laag is en het aanvraagpatroon heterogeen. Een positieve virale serologie impliceert niet dat het desbetreffende virus een infectie in het myocard veroorzaakt. Dit geldt ook voor de virussen die gedetecteerd worden door middel van moleculair onderzoek in respiratoire stalen. Onze bevindingen komen overeen met wat in grote klinische studies en tevens door de European Society of Cardiology (ESC) 2013 Task Force werd besloten: virale serologie is van weinig nut in de diagnose van virale myocarditis. Zo werd in een studie van Mahfoud et al uit 2011 aangetoond dat de virussen gedetecteerd in het bloed door serologische assays niet correleren met het viraal DNA gedetecteerd in EMB van patiënten met vermoeden van myocarditis (10). Volgens de ESC 2013 Task Force wordt virale serologie bij een vermoeden van myocarditis enkel nog aanbevolen voor HCV, rickettsia (fase I en 2), ziekte van Lyme in endemische gebieden en HIV bij hoog-risico patiënten.

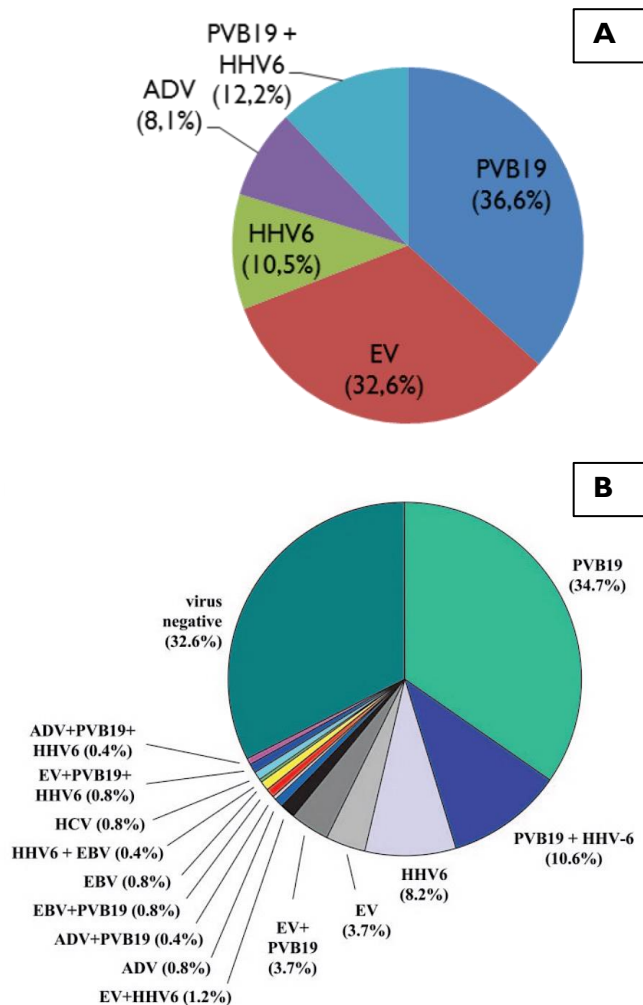
Volgens sommige experts is een gerichte antivirale therapie bij virale myocarditis aangewezen en moet daarom getracht worden om het oorzakelijke virus in EMB te identificeren (11). Dit zou vooral geïndiceerd zijn in een vroege fase of in bepaalde gevallen van een chronische virale myocarditis waarbij een lage virale load in het myocard persisteert zonder optreden van onomkeerbare schade. Zoals we reeds aanhaalden, is er hiervoor echter weinig evidentie omdat tot op heden grote gerandomiseerde trials ontbreken. Wel zijn er enkele klinische studies die de doeltreffendheid van immunosuppressieve therapie in virus-negatieve myocarditispatiënten aantonen. IVIG en immunosuppressiva zoals corticosteroiden, azathioprine en cyclosporine kunnen, bovenop de klassieke hartfalenmedicatie, verdere myocardschade ten gevolge van de ontspoorde immunologische reactie tegengaan en de pompfunctie van het hart zelfs verbeteren. Reeds begin jaren 2000 werd retrospectief aangetoond dat tot 90% van de myocarditispatiënten die goed reageerden op

immunosuppressiva, een negatieve EMB PCR had voor cardiotrope virussen. Zo werden in de studie van Frustaci et al uit 2003 41 myocarditispatiënten die progressie vertoonden naar hartfalen onder conventionele therapie opgestart onder prednison en azathioprine gedurende 6 maanden (12). Respons werd gedefinieerd als een significante verbetering van de linker ventrikel ejectiefractie, een vermindering van het hartvolume of een duidelijke histologische verbetering op EMB na 6 maanden. 20/41 patiënten toonden na 6 maanden geen verbetering; hiervan waren er 12 patiënten met een stagnerend persisterende myocarditis, 3 patiënten ondergingen een harttransplantatie en 5 patiënten waren overleden. Onder deze niet-responders had 85% (17/20) een PCR op EMB positief voor een virus: enterovirus (n=5), EBV (n=5), adenovirus (n=4), zowel adeno- als enterovirus (n=1), influenza A virus (n=1) en PVB19 (n=1).

Het voorbije decennium hebben ook enkele prospectieve gerandomiseerde studies aangetoond dat immunosuppressiva bij virus-negatieve myocarditispatiënten een doeltreffende en veilige therapeutische optie is. Zo werd in de TIMIC (Tailored Immunosuppression in Inflammatory Cardiomyopathy)-studie een aanzienlijke verbetering van de ejectiefractie en een significante reductie van het linker ventrikel eind-diastolisch volume vastgesteld bij 88% (38/43) van de virus-negatieve myocarditispatiënten die immunosuppressiva kregen gedurende 6 maanden (13). Volgens deze experts hebben virus-positieve myocarditispatiënten een betere outcome met IVIG. Het is in de literatuur voorlopig nog niet duidelijk of het toedienen van corticosteroiden in hoge dosissen aan virus-positieve myocarditispatiënten daarentegen meer kwaad dan goed zou doen.

Hoewel in Noord-Amerika en Europa enterovirussen klassiek beschouwd worden als de meest voorkomende verwekkers van virale myocarditis ("textbook virussen"), toont moleculair onderzoek op myocardbipten dat ook tal van andere virussen hierin een rol kunnen spelen. Zo werd door Kühl et al in een reeks van 172 virus-positieve patiënten door middel van nested PCR de volgende verdeling van virale verwekkers gevonden: 63/172 patiënten (36,6%) had een EMB positief voor PVB19, in 56/172 (32,6%) werd een enterovirus gedetecteerd, in 18/172 (10,5%) HHV6 en in 14/172 (8,1%) een adenovirus (14).

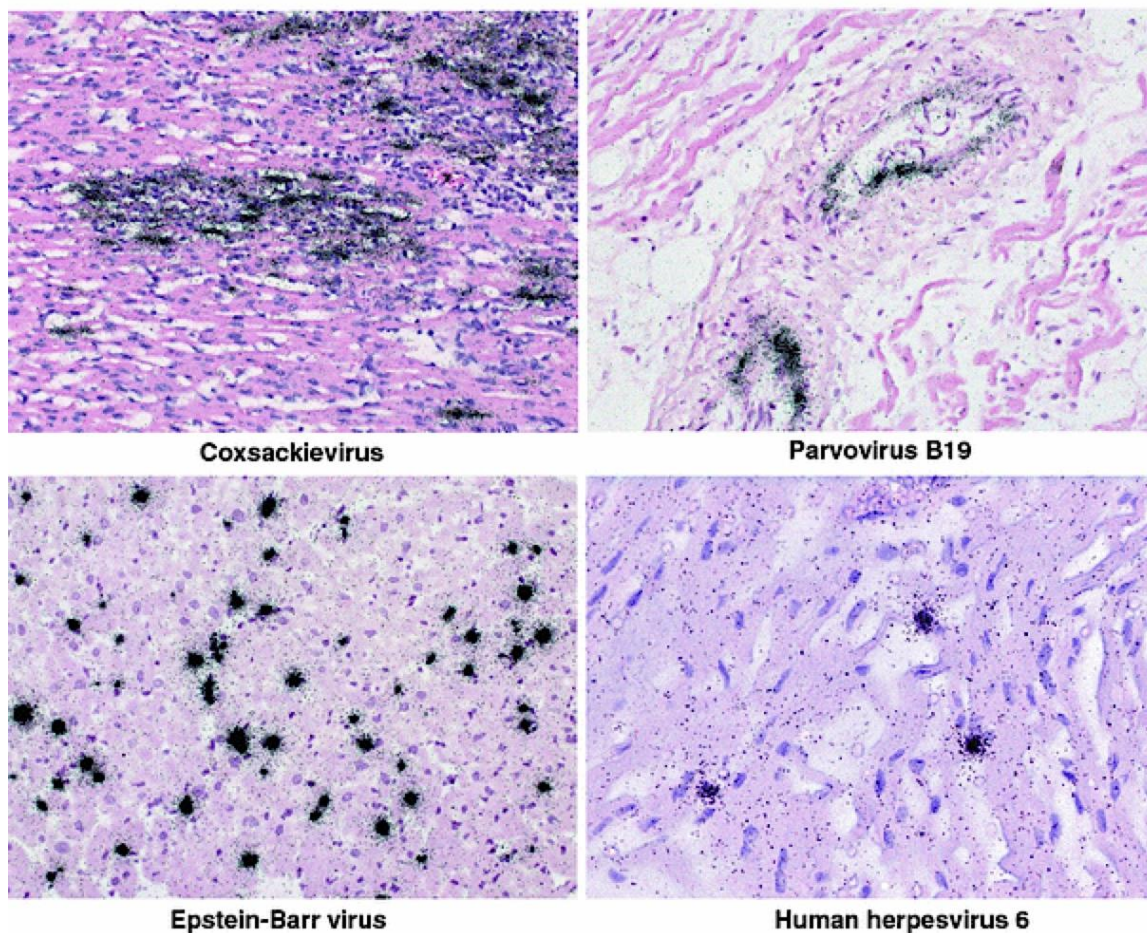
In 21/172 (12,2%) werd een dubbele infectie met PVB19 en HHV6 in het EMB gevonden. Het betreft in deze studie 172 op 841 (20,5%) patiënten met een klinisch vermoeden van myocarditis tussen juli 2001 en september 2004 en met een virus-positieve PCR op EMB. Bij de overige 669 patiënten was er eveneens een vermoeden van myocarditis maar kon er op het EMB geen virus geïdentificeerd worden. Als men breder gaat zoeken naar de mogelijke virale verwekkers bij patiënten met linker ventrikel dysfunctie en DCM merken we op dat er een verschuiving optreedt van oorzakelijke virussen met helemaal bovenaan PVB19 in 34,7%, gevolgd door co-infecties met PVB19 en HHV6 in 10,6%, HHV6 in 8,2% en enterovirussen slechts in 3,7% van de gevallen (zie figuur 1) (15).



Figuur 1: verdeling van de meest voorkomende virussen geïdentificeerd in myocardiobioten door middel van nested PCR: (A) Bij 172 patiënten met acute myocarditis. (B) Bij 245 patiënten met een klinisch vermoeden van DCM (naar Kühl U et al 2005).

Deze verdeling kan passen bij de hypothese van sommige onderzoekers dat enterovirussen, en voornamelijk coxsackievirus B3, een meer destructief effect in het myocard hebben waardoor ze een meer acute ziekte kunnen veroorzaken. Enterovirussen komen de gastheer binnen via het gastro-intestinaal of respiratoir stelsel, overleven in het reticulo-endotheliaal systeem (RES) en vallen van daaruit de hartspiercellen zelf aan (16). Andere cardiotrope virussen zoals PVB19 en HHV6 infecteren daarentegen eerder de vasculaire endotheelcellen in het myocard. De schade die optreedt in het vasculaire endotheel leidt tot een aantasting van de kleine capillairen in het myocard wat met een meer chronisch ziekteverloop en een evolutie naar hartfalen zou gepaard gaan (17-19).

HHV6 kan, net zoals EBV, daarnaast ook de lymfocyten en macrofagen infecteren die deel uitmaken van de immunologische respons die plaatsheeft in het interstitieel weefsel van het myocard (zie figuur 2). Van deze complexe, pathofysiologische mechanismen is er nog steeds veel ongekend. Wel kunnen we besluiten dat afhankelijk van het oorzakelijke virus de locatie van de infectie in het hartspierweefsel alsook de pathogenese, het klinisch verloop en de eventuele respons op behandeling verschilt.



Figuur 2: lokalisatie van cardiotrope virussen (zwarte korrels) in verschillende celtypen in het myocard door middel van in situ hybridisatie: coxsackievirussen infecteren de cardiomyocyten, PVB19 infecteert uitsluitend de endothelcellen in de capillairen, EBV en HHV6 nestelen zich in de interstitiële immuuncellen (naar Pankuweit S et al 2013).

We kunnen uit dit eerste deel van de CAT besluiten dat bij virale myocarditis het aanvragen van serologische onderzoeken niet zinvol is. Gezien het toenemend potentieel belang van het kennen van het oorzakelijk viraal agens, zowel voor de behandeling als voor het voorspellen van de prognose, is het terecht de vraag te stellen of PCR op EMB dit hiaat in de diagnostiek van virale myocarditis kan opvullen. In het tweede deel van de CAT gaan we dieper in op het nut van PCR op EMB om te weten of, en hoe, we dit in de toekomst op de dienst microbiologie kunnen meenemen in onze adviezen naar de cardiologen toe.

2) Hoe kunnen we in het labo microbiologie in het OLVZ Aalst onze adviezen over de best aan te vragen onderzoeken optimaliseren binnen een breder, klinisch-diagnostisch algoritme?

De cardiologen van het OLVZ Aalst kwamen met de vraag of we in het labo microbiologie een moleculair panel kunnen samenstellen met primers voor de voornaamste cardiotrope virussen: enterovirus, adenovirus, PVBI9, HHV6, CMV en EBV. In het griepseizoen zou men aan dit panel ook influenzavirus A en B willen toevoegen. Gezien het relatief laag aantal patiënten waarbij myocardbipten worden afgenomen in het OLVZ Aalst, werd besloten om niet halsoverkop met dit project te starten. Aan de hand van een literatuurstudie hebben we nagekeken welke evidence er is voor het systematisch uitvoeren van PCR op EMB. Bovendien hebben we samen met de cardiologen besproken hoe we de diagnostische workflow in zijn geheel kunnen optimaliseren, wat de precieze plaats van PCR op EMB hierin is, en aan welke pre-analytische vereisten de bipten moeten voldoen.

A. De rol van EMB

Een diagnostisch protocol werd door de cardiologen opgesteld waarbij zij zich baseerden op richtlijnen van de dienst cardiologie van het UMC+ Maastricht. In dit universitair ziekenhuis is de voorbije jaren een grote expertise opgebouwd omtrent niet-ischemische, post-inflammatoire cardiomyopathieën en virale myocarditis. Onderzoek en preklinische studies naar onder meer de expressie van Toll-like receptoren in macrofagen, de epigenetische genregulatie door micro-RNA's (miRNAs) en de expressie van osteoglycine-eiwitten in beschadigd hartspierweefsel hebben meer inzichten gegeven in het begrijpen van de pathogenetische mechanismen van myocarditis. Bovendien brengen deze studies perspectieven naar nieuwe, alternatieve therapieën zoals bijvoorbeeld de toepassing van anti-miRNAs die lokaal of systemisch kunnen toegediend worden. Deze moleculen inhiberen de kleine RNA-deeltjes die post-transcriptioneel de genexpressie reguleren van pro-inflammatoire eiwitten en de virulentie van cardiotrope virussen moduleren in het myocarditisproces (20).

Ook het belang van EMB voor histopathologie, immunohistochemie en moleculair onderzoek wordt door de cardiologen van het UMC+ Maastricht benadrukt, maar mag echter niet als een alles oplossende methode worden beschouwd. De sensitiviteit van histopathologisch onderzoek alleen op EMB voor de detectie van lymfocyttaire haarden bij virale myocarditis zou 20-30% bedragen door suboptimale sampling en door de focale distributie van de ontsteking in het myocard. Bijkomende immunohistochemische kleuringen en viraal moleculair onderzoek op deze bipten kunnen de sensitiviteit maar verhogen tot 40-70% (21). Exacte data hierover zijn niet beschikbaar maar het valt op dat dit geen schitterende performantie-cijfers zijn. Net zoals bij histologie lijkt ook virale PCR op EMB onderhevig te zijn aan de focale spreiding van de inflammatie in het myocard. Een negatief PCR resultaat kan dus een virale myocarditis niet uitsluiten. Bovendien beweren sommige onderzoekers dat een lage aanwezigheid van viraal DNA/RNA in myocardweefsel niet noodzakelijk gerelateerd is aan een ongoing myocarditis. Dit zou vooral het geval zijn voor de detectie van PVBI9 DNA/RNA aangezien het genoom van dit virus ook kan gedetecteerd worden in het myocard bij

ischemische en valvulaire hartziekten en zelfs, weliswaar met een lage load, in volledig normale harten (22). Volgens Heymans et al is er daarom nood aan een verdere ontwikkeling van moleculaire assays die eerder messenger-RNA's of replicatieve RNA intermediären detecteren en een betrouwbaarder beeld geven van actieve replicatie van de desbetreffende virussen. Zolang dergelijke assays nog geen deel uitmaken van de routine praktijk in de moleculaire biologie, blijven de 'klassieke' moleculaire onderzoeken op EMB – steeds in combinatie met histopathologie en immunohistochemie – voor deze onderzoekers primordiaal in centra waar de medisch-technische expertise voldoende hoog is. Zij volgen hierbij de richtlijnen van de American Heart Association (AHA), de American College of Cardiology Foundation (ACCF) en de ESC (23).

Deze stellen dat het - gezien de focale infiltratie van lymfocytair haarden in het hartspierweefsel - belangrijk is om minstens drie myocardbiopten te nemen, elk 1–2 mm in grootte, op verschillende plaatsen. Ook bij andere types van myocarditis zoals giant cell, eosinofiele myocarditis en myocarditis door sarcoïdose, gebeurt de aantasting van het myocard erg verspreid wat de grootste uitdaging vormt voor de diagnostische gevoeligheid van EMB. Afhankelijk van de kliniek en de resultaten van beeldvorming moet men beslissen om te bioteren in het linker of rechter ventrikel. De ingreep verloopt via een endovasculaire techniek waarbij een langwerpige, flexibel tangetje van 2–3 mm diameter via een sheath wordt opgeschoven ter hoogte van de rechter vena jugularis interna in de hals of de rechter vena of arteria femoralis in de lies (afhankelijk van respectievelijk het rechter of linker ventrikel dat men wilt bioteren). De procedure gebeurt onder fluoroscopische en/of echocardiografische begeleiding. Hoewel in gespecialiseerde hartcentra het risico op majeure complicaties relatief laag is (<1%), mogen deze niet onderschat worden gezien hun ernst (24).

Myocardbiopten zijn erg kostbare stalen. Het is dan ook van essentieel belang dat de bewaring en verzending naar de verschillende labo's (APO en moleculair labo) correct gebeuren. Bij voorkeur worden minstens twee biopten naar het APO labo gebracht alwaar deze onmiddellijk gefixeerd worden op kamertemperatuur en gekleurd worden met hematoxyline-eosine (HE-kleuring) en met monoklonale, immunofluorescerende antistoffen (incl. anti-CD3 ter detectie van T-lymfocyten en anti-CD68 voor macrofagen). Minstens 1 biopt moet naar het moleculair labo voor DNA-RNA extractie. Indien de moleculaire analyse niet eerstdaags kan gebeuren, moet het biopt ingevroren worden in vloeibaar stikstof en bewaard worden op -80°C.

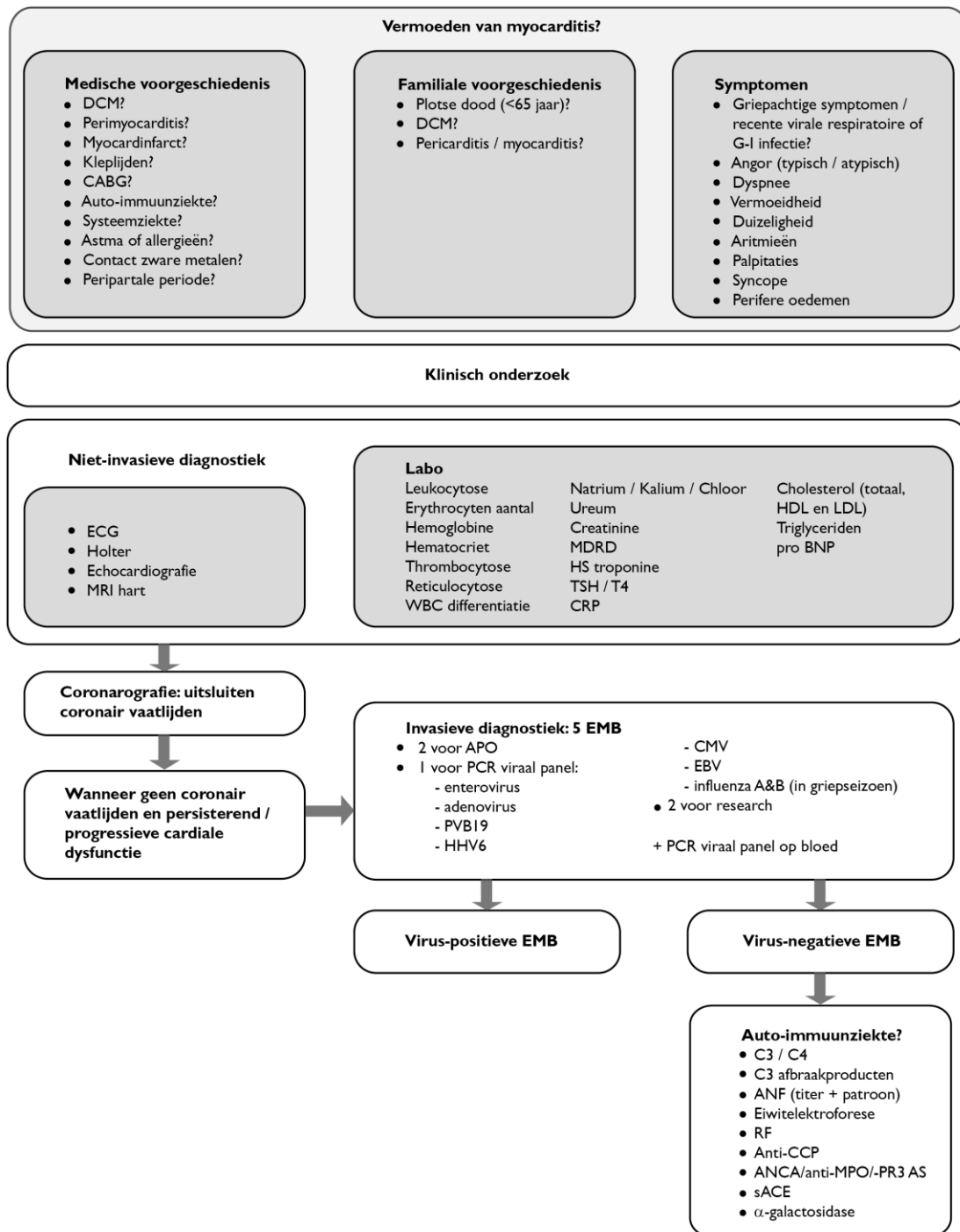
B. Voorstel voor een diagnostische workflow

Na een klinisch onderzoek en een vast arsenaal aan niet-invasieve onderzoeken (biochemische testen, ECG, holter, echocor en MRI hart) zal de clinicus voor elke patiënt afwegen of biopten moeten genomen worden. Hiervoor dient men af te gaan op de ernst, het ziekteverloop en de status van de patiënt. Als men, rekening houdend met de symptomen en met de leeftijd en levensstijl van de patiënt, een ischemisch hartlijden zou kunnen vermoeden, moet dit eerst uitgesloten worden door middel van een coronarografie. In eenzelfde tijd kunnen zo nodig ook myocardbiopten genomen worden. In hun diagnostische workflow stellen de cardiologen van het OLVZ Aalst voor om steeds 5 biopten te nemen: 2 voor APO, 1 voor moleculair onderzoek en 2 voor research doeleinden (zie figuur 3). Indien PCR op EMB geen virale etiologie kan aantonen, moet er verder gezocht worden naar auto-immune oorzaken.

Het resultaat van de virale PCR kan implicaties hebben op de behandeling: bij patiënten die niet beantwoorden aan conventionele supportieve therapieën zal in de toekomst meer en meer overwogen worden om IVIG of immunosuppressiva op te starten. Dit zijn weliswaar tot op heden geen standaardtherapieën op de dienst cardiologie in het OLVZ Aalst. Indien dit in de toekomst meer zou toegepast worden, is het belangrijk om een onderscheid te maken tussen de aan- en afwezigheid van viraal DNA in het myocard:

- Bij virus-negatieve patiënten kan immuunsuppressie onder de vorm van Imuran® (azathioprine 75mg tweemaal per dag) en prednison (in afbouwschema) gedurende 6 maanden de hartfunctie spectaculair verbeteren.
- Virus-positieve patiënten komen in aanmerking voor een behandeling met IVIG. Het is echter nog onduidelijk of deze therapie effectief is tegen alle verschillende cardiotrope virussen. Het gebruik van gerichte antivirale therapieën (zoals bijvoorbeeld IFN- β bij enterovirale myocarditis en val-/ganciclovir bij HHV6) is nog steeds in een experimentele fase.

Gezien de mogelijke therapeutische implicaties enerzijds en de moeilijkheid om gericht biopten te nemen en de focale distributie van de ontsteking anderzijds, stellen we voor om, in studieverband, naast virale PCR op EMB ook steeds PCR op bloed uit te voeren voor dezelfde cardiotrope virussen. Hiervoor vinden we in de literatuur geen evidence maar het is een voorstel om tijdelijk deze resultaten onderling te vergelijken om zo meer inzicht te krijgen in de performantie en therapeutische meerwaarde van moleculair onderzoek op myocardbiopten en in bloed. In een volgende stap willen we deze bevindingen terugkoppelen naar de cardiologen om samen deze complexe diagnostiek te verfijnen.



Figuur 3: voorstel voor een diagnostische workflow voor myocarditis.

CONCLUSION

De complexe, heterogene pathogenese van myocarditis maakt de diagnostiek van deze aandoening moeilijk en het is vaak nog onduidelijk voor cardiologen en klinisch biologen welke testen best aangevraagd worden. Virale infecties worden in de literatuur als meest frequente oorzaak aangeduid. In ongeveer 50% van de gevallen zou dit leiden tot een myocarditis die zelflimiterend is. Ruim een derde van de patiënten echter zal een chronische myocarditis ontwikkelen door het persisteren van de virale infectie met aanhoudende inflammatie en voortdurende destructie/remodeling in het myocard. Dankzij de snelle technische evolutie in de medische beeldvorming hebben de cardiale MRI en echocardiografie een vaste plaats in de diagnostische work-up. Serologische testen daarentegen hebben geen meerwaarde onder meer door hun lage sensitiviteit en voor sommige testen ook de lage specificiteit en de hoge prevalentie van antistoffen tegen cardiotrope virussen in de populatie. Meer en meer studies suggereren, net als de richtlijnen van de ESC, AHA en ACCF, dat het afnemen van myocardbiopsies voor histopathologisch, immunohistochemisch en moleculair onderzoek de gouden standaard is in de diagnostiek van myocarditis. Volgens sommige studies is het van therapeutisch belang om te weten of, en welk virus, aan de oorzaak van de infectie ligt. Er is namelijk een toenemende interesse voor het gebruik van IVIG, gerichte antivirale therapieën en/of immunosuppressiva bij myocarditis-patiënten die niet beantwoorden aan de klassieke, supportieve hartfalen therapie. Wij hebben in de literatuur echter geen klinische studies gevonden die op lange termijn en op grote schaal het nut van antivirale therapie onderzocht hebben. Bovendien is de sensitiviteit van histologisch onderzoek op EMB laag, en ook immunohistochemische kleuringen en virale PCR zijn onderhevig aan de focale spreiding van de inflammatie in het myocard waardoor hun diagnostisch nut beperkt lijkt. We kunnen dus stellen dat er nog veel onzekerheid is omtrent het nemen van myocardbiopten voor moleculair onderzoek. Goed opgezette studies zijn nodig vooraleer er gefundeerd advies over de aan te vragen testen kan gegeven worden.