

## Experimentelle Coxsackie-Virus-Myokarditis bei Babymäusen

### Morphologie und Problematik des Virusnachweises

H. Nemetschek-Gansler, W. Hofmann, W.-W. Höpker und K. Heilmann

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg  
Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie  
(Direktor: Prof. Dr. W. Doerr)

Eingegangen am 7. September 1973

### Experimental Myocarditis Induced with Coxsackie Virus in Baby Mice

#### Morphology and the Problems Involved in Detection of the Virus

*Summary.* Morphologic Changes in Baby-mice injected with Coxsackie-B<sub>1</sub>-Virus are described. By light microscopy a time related distribution pattern is shown, which is correlated to a significant increase of heart weight. Electronmicroscopic findings do not indicate direct damage of heart muscle cells by virus but suggest the importance of circulation disturbance in pathogenesis of virus infection. Probably this is triggered by aggregations of thrombocytes related to phagocytosis of virus by platelets.

*Zusammenfassung.* An Herzmuskeln von mit Coxsackie-B<sub>1</sub>-Viren infizierten Babymäusen konnte lichtmikroskopisch ein zeitlich definiertes Ausbreitungsmuster nachgewiesen werden, dem ein signifikanter Anstieg des Herzgewichts korreliert ist. Die elektronenmikroskopischen Befunde sprechen dafür, daß die Herzmuskelzellen nicht unmittelbar von Viren geschädigt werden, sondern daß primär Zirkulationsstörungen für die Pathogenese der Virusinfektion von Bedeutung sind. Wahrscheinlich werden diese durch die Phagozytose von Viren durch Thrombocyten und die damit verbundene Thrombocyten-Aggregation ausgelöst.

Seit der Entdeckung der Coxsackie-Viren durch Dalldorf u. Sickles (1948) und der grundlegenden histopathologischen Arbeit von Johnsson (1956) widmeten sich in zunehmendem Maße sowohl Morphologen als auch Kliniker diesem Gebiet (Stöber, 1952; Lukacs *et al.*, 1960; Seifert, 1961; Fechner *et al.*, 1963; Doerr, 1967, 1971; Hofmann, 1971). Abgesehen von der Möglichkeit, Virus-Antigen mit der direkten Fluoreszenz-Antikörper-Methode nachzuweisen (Coons u. Kaplan, 1950; Buckley, 1956; Rabin *et al.*, 1964), ist Zielsetzung dieser Untersuchungen, die Wechselwirkung zwischen Virus und Wirtszelle und deren Pathogenität besser zu verstehen. Während auf Grund der lichtmikroskopischen Befunde für eine erfolgte Infektion die Trias von Exsudat, Nekrose und Entzündungszellen angeführt wird, versucht man mit Hilfe des Elektronenmikroskops einen tieferen Einblick in die Biokinetik der Virusinfektion zu gewinnen. So haben Jezequel und Steiner (1966) die feinstrukturellen Veränderungen von Kulturen menschlicher embryonaler Lungenzellen nach Überimpfen mit Coxsackie-A-Viren und ihren wahrscheinlichen Replikationsmechanismus im Cytoplasma beschrieben.

Elektronenmikroskopische Arbeiten über das Herz von mit Coxsackie-Viren infizierten Babymäusen (Rabin, 1964; Sohal *et al.*, 1967, 1969) beschreiben neben

pathologischen Veränderungen des Herzmuskels virusähnliche Partikel in Myocyten. Der Beweis, daß es sich tatsächlich um Viren handelt, ist vor allem dadurch erschwert, daß die Coxsackie-Viren hinsichtlich Größe, Gestalt und Elektronendichte nur schwer gegen Ribosomen und Glykogen abzugrenzen sind. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich deshalb erneut die Frage nach der Aussagekraft eines elektronenmikroskopischen Nachweises und der pathischen Wertigkeit der Coxsackie-Viren im Herzmuskel. Dieser Fragestellung soll der nun folgende Bericht über Befunde an mit Coxsackie-B<sub>1</sub>-Viren infizierten Herzen von Babymäusen dienen.

### Material und Methode

**Versuchsaufbau.** 48 vier Tage alte Babymäuse vom Stamm NMRI Hannover erhielten intraperitoneal 0,1 ml vom Überstand einer mit Coxsackie-B<sub>1</sub>-Virusstamm infizierten Affennierenzellkultur (Titer  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub> pro ml). Als Kontrollen dienten zusätzlich je zwei Vergleichsgruppen mit je 48 Tieren. Die erste Kontrollgruppe erhielt eine entsprechende Leerinjektion des Überstandes einer nichtinfizierten Affennierenzellkultur, bei der zweiten Kontrollgruppe hingegen erfolgte keine Injektion. Alle Versuchstiere (insgesamt 176) wurden unter jeweils gleichen Bedingungen bei den Muttertieren belassen. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation in bestimmten Zeitintervallen zwischen dem 1. und 37. Tag post infectionem.

**Statistik.** Die statistische Auswertung wurde nach dem van der Waerden-Vorzeichentest (Sachs, 1970) bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,05$  vorgenommen. Bei den Regressionsrechnungen wurden lineare Verhältnisse angenommen. Die Gewichtsbestimmung erfolgte an feuchten, formolfixierten Herzen nach vollständiger Abpräparierung der Gefäße.

**Immunfluoreszenz.** 4  $\mu$  dicke Gefrierschnitte wurden zum direkten Antigen-Nachweis nach Coons und Kaplan (1950) mit einem FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) markierten Coxsackie-B<sub>1</sub>-Antiserum beschickt, 30 min bei 50° inkubiert, danach mit PBS-Puffer gewaschen und mit einem Leitz-UV-Aufflichtmikroskop (Orthoplan) (Lampe Hg 200 W, Filter BG 12, K 510) betrachtet.

**Histologie.** Für die Lichtmikroskopie wurden die restlichen Herzteile in 10%igem Formalin fixiert und horizontal in drei Stufen geschnitten. 4  $\mu$  dicke Schnitte wurden mit HE, van Gieson, HbFP nach Lie (1971) und PAS gefärbt.

**Elektronenmikroskopie.** Für die Elektronenmikroskopie wurde jeweils eine Gewebescheibe mit  $0,5 \times 2 \times 2$  mm Kantenlänge aus dem linken Ventrikel entnommen, in körperwarmem 2%-igem Glutardialdehyd in isosmotischem Phosphatpuffer pH 7,2 fixiert (Einstellung der Osmolarität auf 400 mosmol mit dem Halbmikro-Osmometer von Knauer) und in 2% OsO<sub>4</sub> Millonig nachfixiert.

**Einbettung in Epon.** *Nachweisreaktionen* auf Glykogen wurden entweder in Anlehnung an Hanker *et al.* (1964) mit Hilfe der Einführung des osmiophilen Liganden Thiocarbohydrazid (TCH) oder nach Thiery (1967) nach vorangegangener Perjodatoxidation des Gewebes und anschließender Osmierung oder Inkubation mit einer Silberproteinatlösung (Merck) durchgeführt. Die Einwirkung der Agenzien erfolgte an nicht nachkontrastierten Dünnschnitten, die auf Platinnetzen aufgefangen waren. Betrachtung der Dünnschnitte mit einem Siemens-Elmiskop I a bei 80 kV Beschleunigungsspannung und mit Objektraumkühlung. Die Testaufnahmen erfolgten bei 20- und 40000facher Primärvergrößerung auf Kodak E I-Platten.

### Befunde

**Statistische Auswertung.** Die Herzgewichte der Gruppe I und II sind in Abb. 1 dargestellt. Beide Gruppen zeigen eine etwa lineare Gewichtszunahme, wobei die Werte der infizierten Gruppe schneller ansteigen als jene der Kontrollgruppe (Leerinjektion). Dieser Unterschied ist (bei paarweisem Vergleich nach van der Waerden) bei  $p = 0,005$  signifikant.

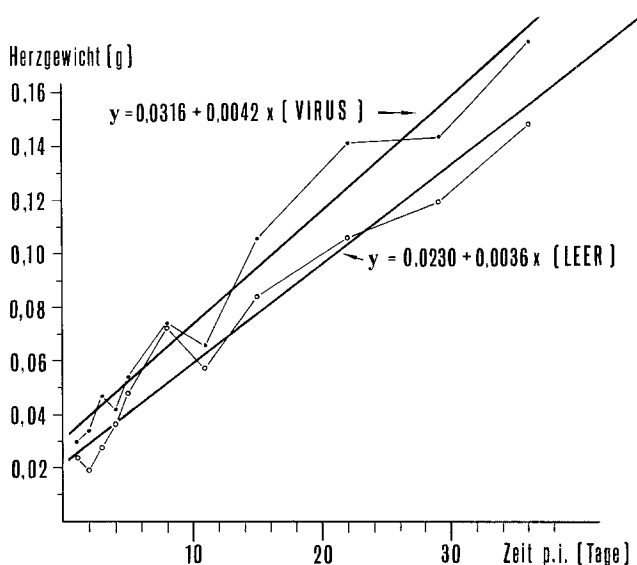


Abb. 1. Herzgewicht (g) in Abhängigkeit von der Zeit post infectionem (p.i.; Tage). Nach Coxsackie-B<sub>1</sub>-Virusinjektion zeigen die Versuchstiere bei den entsprechenden Tötungszeiten ein signifikant höheres Herzgewicht ( $p = 0,005$ ) gegenüber den Kontrolltieren (Leerinjektion); außerdem ist die Steigung der Regressionsgeraden mit 0,0042 deutlich größer als 0,0036 bei den Kontrolltieren: Nicht nur das Herzgewicht ist bei der Untersuchungsgruppe (Coxsackie-B<sub>1</sub>-Injektion) signifikant größer, sondern auch die Zunahme des Herzgewichts in der Zeiteinheit

**Immunofluoreszenz.** Eine spezifische Fluoreszenz zeigt sich nur am 4. Tag p.i. Wegen der geringen Auflösung und der diffusen Anordnung kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich dabei um perinucleäre oder pericapilläre Bezirke handelt. Die aus der II. Gruppe untersuchten Herzen zeigen zu keinem Zeitpunkt spezifische Fluoreszenz.

**Lichtmikroskopisch** ist zuerst ein interstitielles Oedem im linken Ventrikel zu sehen. Am 2. Tag p.i. treten im linken Ventrikel neben einigen Röhrenfasern vermehrt Histiocyten und Makrophagen auf, während in den Vorhöfen Lymphocyten vornehmlich am 4. und 5. Tag p.i. zu beobachten sind. Eine Vermehrung von lymphoiden Zellen und Histiocyten ist bis zum 15. Tag p.i. in den Henleschen Septen und perivascular deutlich zu erkennen. Disseminierte Einzel- und Gruppenfasern nekrosen treten zwischen dem 3. und 5. Tag p.i. vorwiegend in der Muskulatur des linken Ventrikels auf. Sie lassen sich mit der Färbung nach Lie (1971) als leuchtend-rote Bezirke darstellen.

**Elektronenmikroskopisch** fällt zunächst auf, daß der Herzmuskel in den ersten 10 Lebenstagen sich deutlich von dem adulter Tiere unterscheidet, und zwar sowohl bei den Kontrollen als auch bei den infizierten Tieren. So ist der Zellverband nur wenig geordnet, die Kerne der Myocyten sind groß, hell und polymorph, im Cytoplasma sieht man zahlreiche Lipidtropfen. Auch das Interstitium des Herzmuskels zeigt in den ersten 10 Lebenstagen mehr Histiocyten und kleine rundkernige Zellen als das der älteren Tiere.

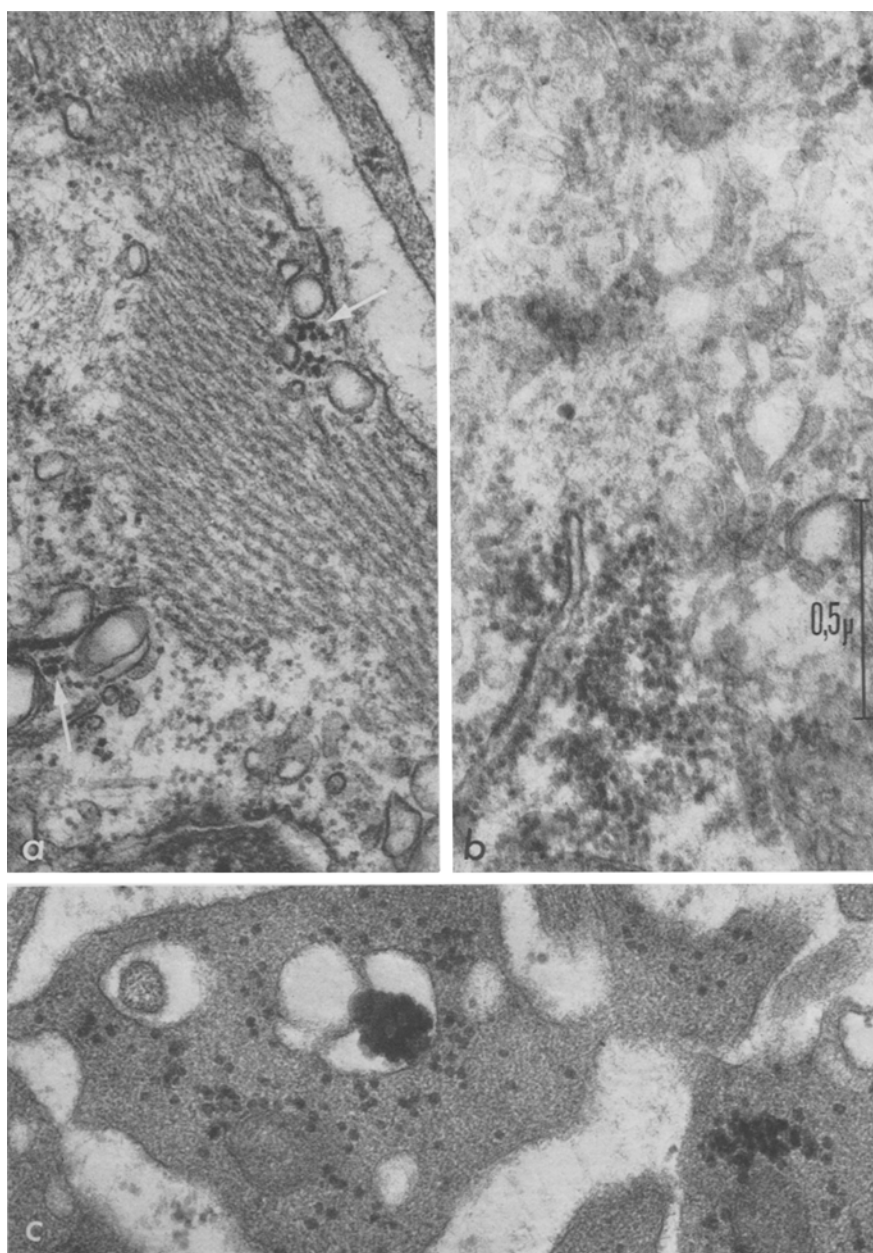


Abb. 2. Virusverdächtige Partikel: a Ausschnitt aus Myocyt 5. Tg. p.i.: An den mit Pfeilen markierten Stellen Gruppen elektronendichter 200 Å großer Partikel, in deren Umgebung vermehrt vesikuläre Membrankomplexe zu beobachten sind. Daneben im Cytoplasma kleinere und größere Partikel geringerer Massendicke, die Ribosomen und Glykogen darstellen. b Ausschnitt aus Histiocyt (gleiches Präp. wie in a), das Cytoplasma besteht vorwiegend aus tubulären und vesikulären Elementen, wie sie auch in der infiz. Zellkultur beschrieben wurden (Jézéquel *et al.*, 1967). In der Peripherie Aggregate von virusverdächtigen Partikeln. c Thrombocytenausschnitte aus einer Capillare eines Herzmuskels 2. Tag p.i. mit einzelnen oder in Gruppen angeordneten virusverdächtigen Partikeln, z. T. auch als Aggregate in Einschlußvacuolen. Arch. Nr.: 1415/72, 188/73 und 2112/72; el. opt. 20000:1

An degenerativen Veränderungen sieht man 24 Std p.i. außer einem interstiellen Oedem nur eine Erweiterung des longitudinalen und transversalen Reticulum der Myocyten.

Zwischen dem 3. und 5. Tag p.i. haben die Veränderungen ihren Höhepunkt erreicht. Die Myocyten zeigen die typischen Plasmablasen, ferner Vesikelkonglomerate, dehiszente Glanzstreifen und Lysosomen. Hydropisch geschwollene Zellen lassen eine weitgehende Desintegration und Lyse aller Zellorganellen erkennen. Die Zellkerne sehr vieler Myocyten sind durch bizarre Verformungen der Kernoberflächen sowie durch Zunahme des Heterochromatins charakterisiert; auch ein perinucleäres Oedem ist nicht selten. Am 5. Tag p.i. findet sich eine deutliche Aufhellung der Nucleolen.

Ribosomen, Glykogen und Golgimembranen sind in den ersten Lebenstagen sowohl bei den infizierten Tieren als auch bei den Kontrollen in abundanten Mengen vorhanden, um ab 16. Tag allmählich abzunehmen.

Virusverdächtige Partikel erscheinen intranucleär sowohl in Myocyten als auch in Endothelien, intracytoplasmatisch ebenfalls in diesen beiden Zellarten, außerdem in Histiozyten und Thrombocyten (Abb. 2). Aus den eingangs bereits erwähnten möglichen Verwechslungen insbesondere mit Glykogen schien es geboten, zur Absicherung dieser Befunde Nachweisreaktionen anzuwenden, die zumindest eine Abgrenzung gegen Glykogen ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Ultradünnschnitte in Anlehnung an Hanker (1964) mit Thiocarbonyldisäure (TCH) inkubiert und anschließend einer Osmiumsäure-Einwirkung unterworfen. Es war zu erwarten, daß alle Strukturen, die vor der Einbettung mit  $\text{OsO}_4$  reagierten über ihre Reaktionsprodukte TCH als Ligand aufnehmen und über diesen erneut mit  $\text{OsO}_4$  in Wechselwirkung treten; d. h. Zellkomponenten die, wie z. B. Glykogen, nicht mit  $\text{OsO}_4$  reagieren, bleiben nach dieser Methode unbeeinflusst, also mit geringem Kontrast. Aus der Gegenüberstellung in Abb. 3a und b ist nun zu ersehen, daß offenbar die 200—260 Å großen, runden Partikel in Thrombocyten einen relativ gleich hohen Kontrast zeigen wie nach einer Schnittnachkontrastierung (Abb. 2c und 4a) mit Blei- und Uranylionen. Die Partikel in Abb. 3b besitzen hingegen ähnlich wie im unbehandelten Kontrollschnitt nur einen relativ geringen Kontrast und stellen wie zu erwarten  $\beta$ -Glykogen dar. Eine Gegenprobe besteht weiterhin darin, die Ultradünnschnitte mit Perjodsäure zu behandeln, um z. B. oxydierbare Gruppen des Glykogens in Aldehydgruppen zu überführen, und nach Umsetzung mit TCH eine Markierung mit  $\text{OsO}_2$ - oder Ag-Körner anschließen zu können. Die in der überfokussierten Abb. 3c nach diesem Verfahren mit Silber markierten Partikel sind somit  $\beta$ -Glykogen. Unter gleichen Bedingungen waren die etwas größeren virusverdächtigen Partikel in den Thrombocyten nur selten mit Silberkörnern belegt. Mit Hilfe dieser Nachweisreaktionen ist es nicht gelungen, in Myocyten mit Sicherheit Viren nachzuweisen. Dagegen blieben die Partikel in den Thrombocyten nach der Perjodat oxydation ohne Ag-Markierung, was dafür zu sprechen scheint, daß es sich um Viren handelt. Allerdings ist eine Verfälschung dieses Befundes durch Glykogen-Eiweißkomplexe unbekannter Art (Rosati, 1967) nicht sicher auszuschließen. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß Thrombocyten in den Capillaren der Kontrolltiere nur ganz vereinzelt zu sehen sind, während man zwischen dem 2. und 5. Tag p.i. häufig kleinste Capillaran Schnitte findet, die mit Thrombocyten vollgestopft sind. Außer den virusverdächtigen Partikeln findet man in die-

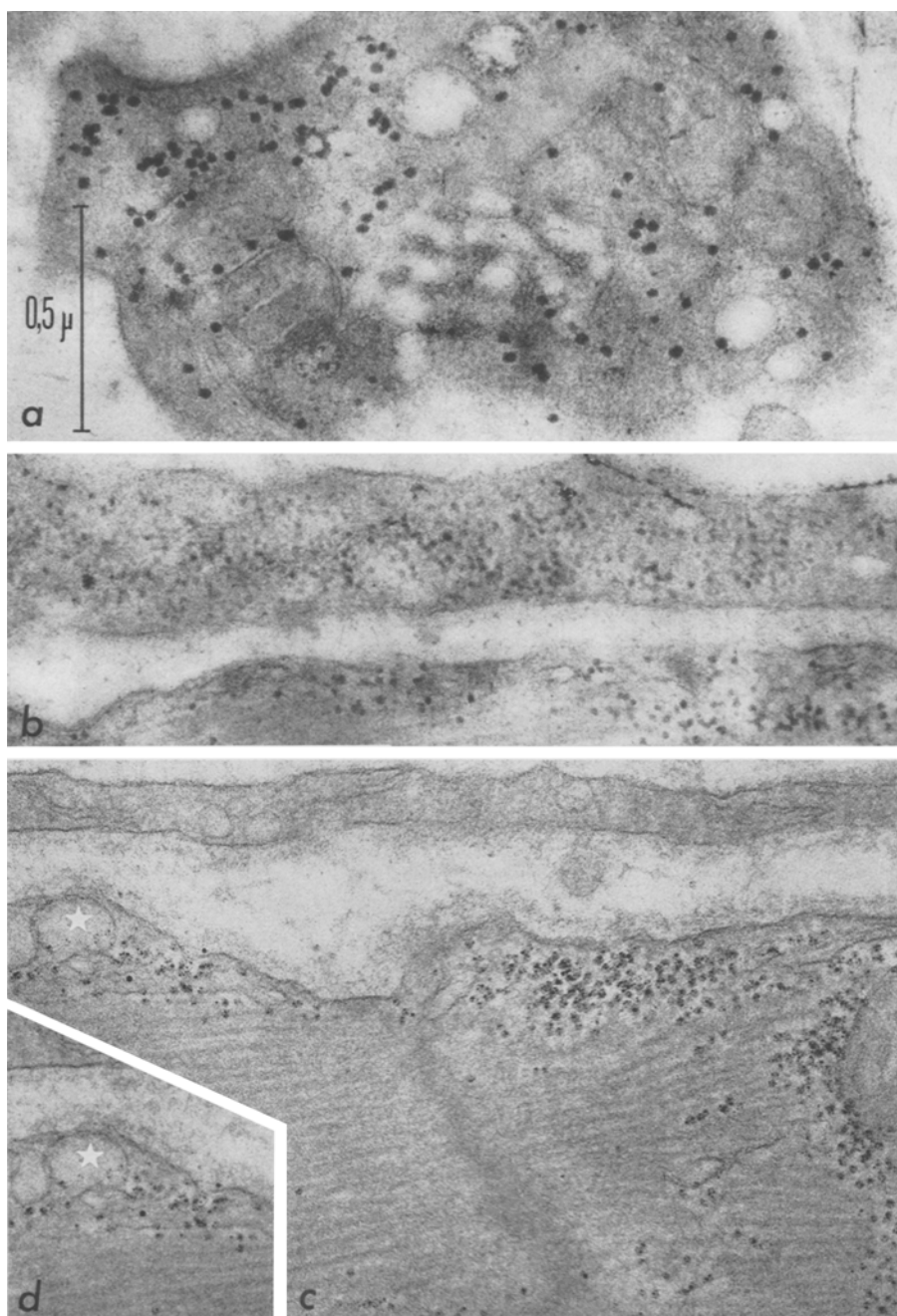


Abb. 3a—d. a u. b Thrombocyt und Ausschnitt aus einer Endothelzelle mit angrenzender Muskelzelle nach Umsetzung mit TCH am Ultradünnschnitt und anschließender  $\text{OsO}_4$ -Einwirkung bei ca.  $50^\circ\text{C}$ ; am unbehandelten Kontrollschnitt war der Kontrast der in (a) wiedergegebenen Partikel deutlich geringer, was somit gegen Glykogen spricht; die runden Anteile in (b) sind hingegen  $\beta$ -Glykogen. c und d Glykogendarstellung nach Perjodatoxidation, Umsetzung mit TCH und nachfolgender Markierung mit Ag; zur besseren Darstellung der Ag-Körner in (c) um  $2,4\ \mu$  defokussierte Aufnahme; in (d) am Fokus; keine Nachkontrastierung mit Pb- und Uranyl-Ionen. Arch. Nr.: 20/73, 21/73, 314/73, 313/73; el. opt.: 20000:1

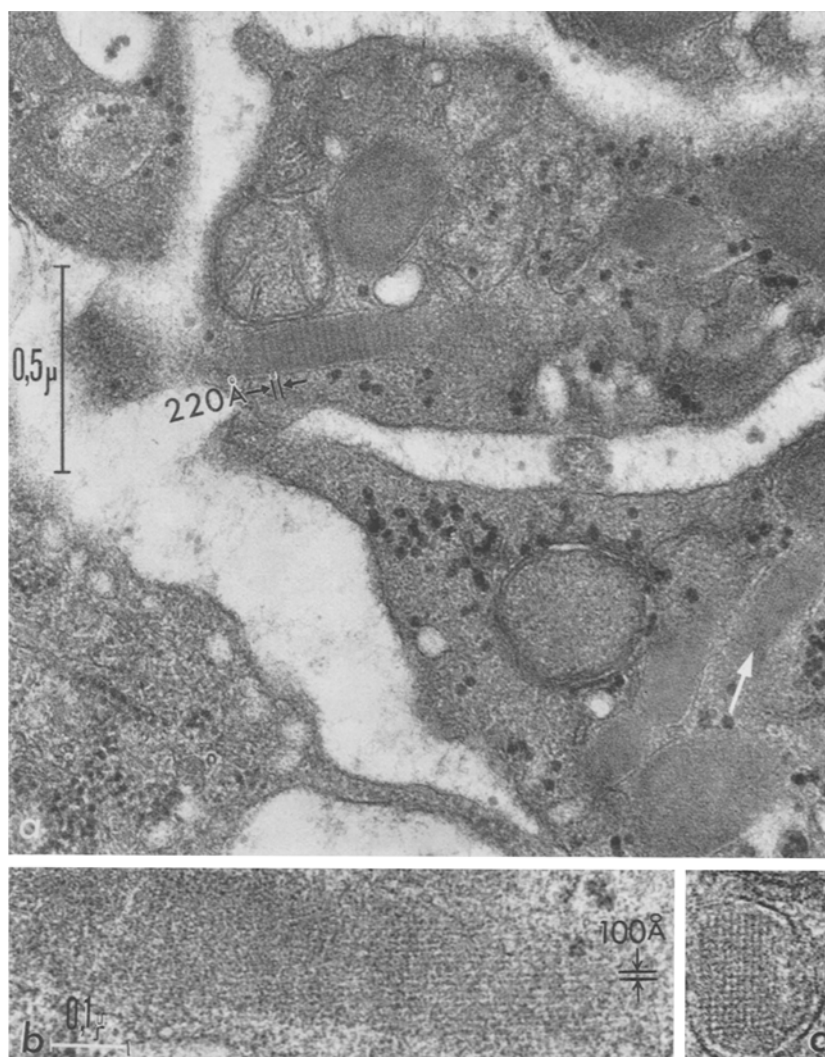


Abb. 4 a—c. Parakristalline Einschlüsse in Thromboeyten. a Länglicher Einschlusskörper mit Querperiode von ca. 220 Å, daneben (Pfeil) längsgestreifte Einheiten wie in (b) bei höherer Vergrößerung. c wie b jedoch als leicht verkippter Querschnitt. Nachkontrastierung Pb-Uranyl-Ionen. Arch. Nr.: 2085/72, 2119/72 und 2114/72; el. opt. 20000:1

sen oftmals membranumhüllte, längliche Einschlüsse (Abb. 4), die Längsstreifen oder auch Querstreifen, letztere mit einem Abstand von ca. 220 Å, aufweisen. Daneben findet man Streifenmuster wie in Abb. 4 b oder gelegentlich Gitterstrukturen (4c). Die Endothelien der Capillaren sind häufig stark geschwollen, wodurch die Lumina teilweise fast verlegt erscheinen; auch Endotheldefekte sind nicht selten. Histiocyten und Monocyten zeigen eine gesteigerte Pinocytose, vermehrt Lysosomen und Phagolysosomen, d. h. sie werden zu Makrophagen. Ferner findet man ab

5. Tag p.i. zahlreiche lymphoide Zellen mit breitem Cytoplasmasaum, der vor allem freie und membrangebundene Ribosomen enthält, weshalb diese Zellen den Lymphoplasmacyten zuzuordnen sind (Avrameas *et al.*, 1970).

### Diskussion

Die morphologischen Befunde sowie die signifikante Zunahme des Herzgewichtes sprechen dafür, daß die Virusinfektion mittelbar oder unmittelbar zu einer Schädigung des Herzmuskels geführt hat. In Übereinstimmung mit den Aussagen von Doerr (1967, 1971) und Hofmann (1971) ist das Ausbreitungsmuster der entzündlichen Herzmuskelveränderungen auch bei der Virusinfektion vorwiegend im linken Ventrikel und in den Vorhöfen lokalisiert. Ein Virus-Antigen-Nachweis gelang nur am 4. Tag p.i.

Was nun den direkten Virus-Nachweis betrifft, so gelang es elektronenmikroskopisch nicht, einwandfrei als Viren identifizierbare Partikel in Myozyten nachzuweisen. Das gleiche gilt auch für die von anderen Autoren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beschriebenen virusähnlichen Partikel in den Herzen infizierter Babymäuse, die u.E. nicht überzeugend gegen Glykogen und Ribosomen abgegrenzt werden konnten (Rabin *et al.*, 1964; Sohal *et al.*, 1969). Auch fanden diese Autoren keine Hinweise auf cytotoxische Schäden der mit virusähnlichen Partikeln beladenen Myocyten. Ebenso sind mit der Methode von Sohal (1967) elektronenmikroskopisch abgebildete angeblich mit Ferritin belegte Virus-Partikel nicht eindeutig von Glykogen zu unterscheiden.

Berücksichtigt man weiter, daß bislang überzeugende Bilder virusinfizierter Zellen elektronenmikroskopisch nur an Zellkulturen gewonnen wurden (Jézéquel *et al.*, 1967; Hinz *et al.*, 1962), erscheint es naheliegend, in vivo den Gefäßbefunden besondere Bedeutung beizumessen. Im Vordergrund scheint dabei zunächst eine Thrombocytenaggregation zu stehen, die wahrscheinlich auf ein erhöhtes Haftvermögen der Blutplättchen infolge einer gesteigerten Phagocytosetätigkeit zurückzuführen ist (Pfleiderer, 1967). Die von uns angewandten elektronenmikroskopischen Nachweisreaktionen machen die Anwesenheit von Viren in den Thrombocyten wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang ist eine Mitteilung von Weiss und Sterz (1973) von Interesse. Diese Autoren konnten am Modell der akuten Geflügelpest zeigen, daß Thrombocyten Viren in großer Zahl phagocytieren, die elektronenmikroskopisch einwandfrei zu identifizieren sind (die Thrombocyten werden anschließend vom RES phagocytiert, was zu einer Thrombopenie führt). Von Interesse sind u.E. auch die parakristallinen Einschlüsse in den Thrombocyten, bei denen es sich um Fibrin oder um ein modifiziertes polymeres Fibrinogen (Tooney u. Cohen, 1972) handeln dürfte. Berücksichtigt man weiter Endothelschwellung und Endotheldefekte, so ist zumindest die Annahme virusbedingter Mikrozirkulationsstörungen gerechtfertigt. Die elektronenmikroskopischen Befunde sind jedenfalls leichter mit der Annahme einer mittelbaren Schädigung der Muskelzellen infolge von Zirkulationsstörungen zu deuten. Daß Störungen dieser Art für die Entstehung vieler Formen von Myo- und Pankarditis eine entscheidende Rolle spielen, konnte von Hughes und Tonks (1972) tierexperimentell nachgewiesen werden.



Muskelzellnekrosen konnten in unserem Untersuchungsgut nur vereinzelt nachgewiesen werden, indes genügt bereits die beobachtete Dilatation der transversalen und longitudinalen Retikula der Myocyten, um Funktionsstörungen des Herzmuskels zu bewirken (Konradt u. Nemetschek, 1970).

Herrn Prof. Dr. Haas (Hygiene-Institut der Universität Freiburg) danken wir für die freundliche Überlassung der Virussuspension, Herrn Schiller und Fräulein Gündra für ihre Mitarbeit, Herrn Prof. Th. Nemetschek für Diskussion.

### Literatur

- Avrameas, S., Leduc, E.: Detection of simultaneous antibody synthesis in plasma cells and specialized lymphocytes in rabbit lymph nodes. *J. exp. Med.* **131**/II, 1121—1136 (1970)
- Buckley, S. M.: Visualization of poliomyelitis virus by fluorescent antibody. *Arch. ges. Virusforsch.* **6**, 388—400 (1956)
- Coons, A. H., Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.* **91**, 1—13 (1950)
- Dalldorf, G., Sickles, G. M.: An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* **108**, 61—63 (1948)
- Doerr, W.: Entzündliche Erkrankungen des Myokard. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **51**, 67—99 (1967)
- Doerr, W.: Morphologie der Myokarditis. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **77**, 301—335 (1971)
- Fechner, R., Smith, M. G., Middelkamp, J. N.: Coxsackie B virus infection of the newborn. *Amer. J. Path.* **42**, 493—503 (1963)
- Hanker, J. S., Seaman, A. R., Weiss, L. P., Ueno, H., Bergman, R. A., Seligman, A. M.: Osmiophilic reagents: New cytochemical principle for light- and electron microscopy. *Science* **146**, 1039—1043 (1964)
- Hinz, R. W., Barski, G., Bernhard, W.: An electron microscopic study of the development of the encephalomyocarditis (EMC) virus propagated in vitro. *Exp. Cell Res.* **26**, 571—586 (1962)
- Hofmann, W.: Entzündliche Erkrankungen des Myokard der Tiere. Stuttgart: F. Encke 1971
- Hughes, A., Tonks, R. S.: The influence of stress on the vascular-system. In: Thrombosis: Risk factors and diagnostic approaches. Stuttgart-New York: Schattauer 1972
- Jézéquel, A., Steiner, J. W.: Some ultrastructural and histochemical aspects of Coxsackie virus-cell interactions. *Lab. Invest.* **15**, 1055—1083 (1966)
- Johnsson, T., Lundmark, C.: A histopathologica study of Coxsackie-virus infections in mice. *Arch. ges. Virusforsch.* **6**, 262—281 (1956)
- Konradt, J., Nemetschek-Gansler, H.: Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Herzmuskel der Ratte nach chronischer Digitalis-Applikation. *Virchows Arch. Abt. A* **350**, 9—21 (1970)
- Lie, J. T., Holley, K. E., Kampa, W. R., Titus, J. L.: New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. *Mayo Clin. Proc.* **46**, 319—327 (1971)
- Lukacs, V. F., Romhanyi, J.: Über eine Meningo-Encephalo-Myokarditis-Epidemie bei Neugeborenen während der Epidemie von Bornholmscher Krankheit in Ungarn im Jahre 1958 I. Klinische und pathologische Befunde. *Ann. paediat. (Basel)* **194**, 89—102 (1960)
- Pfleiderer, Th., Morgenstern, E.: Zusammenhänge zwischen Phagocytose und Klebrigkeitsphänomen bei Thrombocyten. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **72**, 298—301 (1966)
- Rabin, E. R., Hassan, S. A., Jenson, A. B., Melnick, J. L.: Coxsackie virus B<sub>3</sub> myocarditis in mice. *Amer. J. Path.* **44**, 2, 775—797 (1964)
- Rosati, G.: Enzyme treatment of glycogen particles in rat liver and muscle. *J. Ultrastruct. Res.* **18**, 444—455 (1967)
- Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969
- Seifert, G.: Zur Pathologie der Virusmyokarditis (insbesondere durch Coxsackie-B-Viren) im Säuglings- und Kindesalter. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **102**, 274—289 (1961)

- Sohal, R. S., Burch, G. E., Chu, K. C., Leidermann, E., Cololough, H. L.: Ultrastructural changes in *cardiae capillaris* of Coxsackie virus B<sub>4</sub> infected mice. *Lab. Invest.* **19**, 399—405 (1968)
- Sohal, R. S., Sun, S. C., Burch, G. E., Cololough, H. L.: Ultrastructural localisation of Coxsackie B<sub>4</sub> virus in mouse myocardium. *Nature (Lond.)* **215**, 312—313 (1967)
- Stoeber, E.: Weitere Untersuchungen über epidemische Myocarditis (Schwielenherz) des Säuglings. 1. und 2. Mitteilung. *Kinderkeilh.* **71**, 319—356, 592—623 (1952)
- Thiery, J. P.: Mis en evidence des Polysaccharides sur coupes fines en Microscopie electronique. *J. Microscopie* **6**, 987—1018 (1967)
- Tooney, N. M.: Cohen, C.: Microcrystals of a modified fibrinogen. *Nature (Lond.)* **237**, 23—25 (1972)
- Weiss, E., Sterz, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathogenese der Thrombopenie bei akuter Geflügelpest. Vortrag: 22. Tg. Europ. Arbeitsgemeinschaft f. Veterinärpathologen, Karlsruhe 1973

Prof. Dr. H. Nemetschek-Gansler  
Arbeitsgruppe für Ultrastrukturforschung

Priv.-Doz. Dr. W. Hofmann  
Dr. W.-W. Höpker  
Institut für Allgemeine Pathologie  
und pathologische Anatomie  
D-6900 Heidelberg 1  
Postfach 1368

Dr. K. Heilmann  
Pathologisches Institut der  
Städtischen Krankenanstalten Pforzheim  
D-7530 Pforzheim  
Bundesrepublik Deutschland