

Cardiomiopatia dilatativa: quando è indicata e cosa chiedere alla biopsia endomiocardica

Andrea Perkan, Andrea Di Lenarda, Gianfranco Sinagra

Dipartimento di Cardiologia, Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti", Trieste

Key words:

Dilated cardiomyopathy;
Endomyocardial biopsy;
Heart failure.

In the last years, endomyocardial biopsy has become a useful diagnostic tool for the investigation and treatment of myocardial diseases. Mainly, its role is irreplaceable for the diagnosis of acute myocarditis. However, its routine use is criticized by some authors for the lack of therapeutic usefulness.

Actual techniques enable to perform multiple drawings of tissue samples from both ventricles with low incidence of procedural complications. However, in consideration of the invasivity of the procedure, it is fundamental a correct selection of patients to undergo endomyocardial biopsy. In addition to some particular clinical contexts (after heart transplantation, specific myocardial disease), the more frequent indication to endomyocardial biopsy is suspected myocarditis in patients with "major" symptoms (recent-onset heart failure with relevant left ventricular dysfunction, sustained ventricular arrhythmias). In such cases, the correct analysis of tissue samples represents an important question to answer.

The information derived from endomyocardial biopsy is increased by the number of methodologies that we apply. For this reason, it is necessary that traditional histology is followed by immunohistochemical, ultrastructural and molecular biological techniques, which can increase the accuracy of the analysis.

About the therapeutic perspectives, endomyocardial biopsy has a role in few clinical cases, according to the persistent perplexity about the therapy of active myocarditis. However, we have to underline that in selected cases endomyocardial biopsy represents a useful method for a correct prognostic and therapeutic evaluation.

(Ital Heart J Suppl 2002; 3 (4): 419-425)

© 2002 CEPI Srl

Ricevuto il 18 febbraio
2002; accettato il 27
febbraio 2002.

Per la corrispondenza:

Dr. Gianfranco Sinagra

Dipartimento
di Cardiologia
Azienda Ospedaliera
"Ospedali Riuniti"
Piazza Ospedale, 1
34100 Trieste
E-mail:
gianfranco.sinagra@
aots.sanita.fvg.it

Introduzione

A partire dal 1962, Sakakibara e Konno¹ introdussero nella pratica clinica l'impiego della biopsia endomiocardica (BEM), fornendo alla ricerca sulle malattie del muscolo cardiaco un nuovo e potente strumento di indagine. Negli anni successivi, la rapida diffusione della metodica, favorita da ulteriori sviluppi tecnologici, ha consentito un significativo progresso nella ricerca e nella diagnostica delle malattie del miocardio ed in particolare della miocardite.

Tuttavia, il prelievo di frammenti di tessuto miocardico presenta alcune problematiche ancora aperte ed il suo impiego, al di fuori di un contesto di ricerca clinica, è oggetto di discussione. Ad alcuni autori appare infatti limitata la ricaduta pratica di tale metodica invasiva in termini di accuratezza diagnostica e scelte terapeutiche².

La BEM rappresenta inoltre per i patologi un banco di prova tutt'altro che semplice. Al fine di ottenere un'elevata accuratezza diagnostica ed una corretta interpretazione dei preparati istologici, è richiesta

una notevole esperienza specifica da parte del patologo ed una stretta collaborazione con il cardiologo clinico.

Note tecniche

La tecnica attuale di esecuzione della BEM prevede il posizionamento, per via percutanea e sotto controllo fluoroscopico, di un introduttore lungo all'interno delle camere cardiache³. Ciò consente il rapido e sicuro avanzamento del biotomo, catetere rigido e potenzialmente traumatico, dotato all'estremità distale di una ganascia tagliente. L'impiego dell'introduttore consente pertanto l'agevole esecuzione di prelievi multipli, che attribuiscono alla metodica una più elevata sensibilità diagnostica.

Con tecnica analoga, il prelievo di tessuto può essere eseguito a livello del ventricolo destro o sinistro mediante approccio giugulare, brachiale o femorale: la scelta è subordinata al tipo di patologia e alla sicurezza di esecuzione. Sebbene il cateterismo sinistro per via femorale comporti il rischio di complicanze emboliche sistemiche, il

maggior spessore delle pareti del ventricolo sinistro rappresenta un fattore protettivo nei confronti della perforazione cardiaca con conseguente tamponamento. Nei processi patologici con presumibile interessamento diffuso del miocardio, le alterazioni riscontrate in una delle due camere ventricolari vengono ritenute rappresentative dell'intero miocardio^{4,5}.

Quando eseguita da persona esperta, la tecnica è relativamente sicura (mortalità 0.03%; complicanze generali 1.17%)⁶, sebbene tale incidenza sia più elevata in pazienti non sottoposti precedentemente a trapianto cardiaco⁷. Complicanze minori della procedura, quali aritmie ventricolari ipercinetiche non sostenute, blocchi atrioventricolari o intraventricolari o reazioni neuro-mediate sono generalmente transitorie ed a risoluzione rapida e spontanea. L'eventualità di tali complicanze rende opportuna l'esecuzione del prelievo bioptico in ambiente protetto (sala emodinamica, terapia intensiva).

Selezione dei pazienti

In considerazione dell'invasività della metodica e dei conseguenti rischi procedurali, appare opportuna un'attenta selezione dei pazienti con scompenso cardiaco candidabili alla BEM. Il rapporto costo/beneficio consiglia l'esecuzione dei prelievi bioptici nei pazienti con sindromi cliniche "maggiori"⁸. Tale problematica è tuttora oggetto di controversie per i casi non inseriti in una specifica ricerca clinica⁹.

Il contesto in cui più frequentemente si pone il problema di eseguire un prelievo bioptico miocardico è sicuramente rappresentato dallo scompenso cardiaco di recente insorgenza, le cui caratteristiche cliniche (recente infezione virale, indici di flogosi aumentati, recente puntura di insetto) suggeriscano una possibile miocardite sottostante.

Ulteriori elementi clinico-anamnestici da tenere in considerazione riguardano l'intervallo esordio-diagnosi di scompenso cardiaco ed i dati ecocardiografici di dimensioni e disfunzione ventricolare sinistra. Una prolungata storia di scompenso cardiaco e una dilatazione-disfunzione ventricolare sinistra in fase avanzata renderanno poco probabile la diagnosi di miocardite e spesso superflua l'esecuzione della BEM.

Le più usuali indicazioni alla BEM possono pertanto essere così riassunte^{2,8,10}:

- scompenso cardiaco persistente, di recente insorgenza (entro 6 mesi), con importante compromissione della funzione di pompa (frazione di eiezione < 40%);
- aritmie ventricolari maggiori (ipo o ipercinetiche) nel sospetto clinico di miocardite;
- sospetta malattia specifica del miocardio, in particolare forme di amiloidosi geneticamente determinate, la cui diagnosi consentirebbe di candidare il paziente a trapianto combinato di cuore e fegato¹¹;
- diagnosi differenziale tra pericardite costrittiva e cardiomiopatia restrittiva;

• BEM di controllo in pazienti con miocardite istologicamente dimostrata, nei quali sia stata impiegata una terapia immunosoppressiva.

È probabile che attualmente l'indicazione più frequente alla BEM sia il follow-up dei pazienti trapiantati: tale situazione clinica del tutto peculiare esula dal contesto della nostra trattazione.

Va solamente menzionata come indicazione "storica" alla BEM il sospetto di cardiotossicità da antraciline, in quanto la possibilità di una precoce diagnosi non invasiva di tale patologia ha reso obsoleta l'esecuzione di prelievi bioptici.

Metodologia di analisi

Una volta ottenuto il campione di tessuto, il problema relativo ad un'analisi corretta e completa non è di semplice soluzione.

Le informazioni derivabili dai campioni di tessuto aumentano quanto più numerose sono le metodiche di indagine applicate. Alle tecniche istologiche tradizionali attualmente vengono affiancate molteplici tecniche immunostochimiche, ultrastrutturali e di biologia molecolare, che consentono una più approfondita analisi dei campioni bioptici¹². Esse peraltro richiedono una specifica esperienza del patologo (ottenibile in particolare in centri in cui vi sia un elevato volume di procedure all'anno) ed una stretta collaborazione con il cardiologo clinico.

Per quanto riguarda l'analisi istopatologica tradizionale, se da un lato le malattie specifiche del miocardio (amiloidosi, emocromatosi, glicogenosi, ecc.) (Figg. 1-3) possono presentare quadri tipici più facilmente interpretabili, nello scompenso cardiaco di incerta origine la BEM mette in luce un'istologia che spesso non consente una diagnosi eziologica certa, ma solo un orientamento della stessa.

Nei pazienti con scompenso cardiaco di recente insorgenza e/o sospetto clinico di miocardite, un infiltrato flogistico è riscontrabile in una percentuale variabile

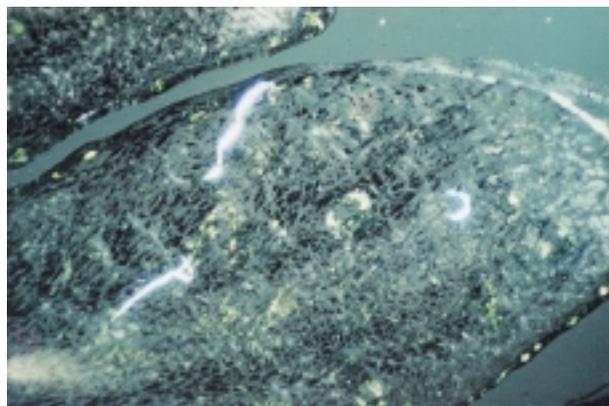


Figura 1. Birifrangenza giallo-verde a luce polarizzata in un caso di amiloidosi cardiaca.

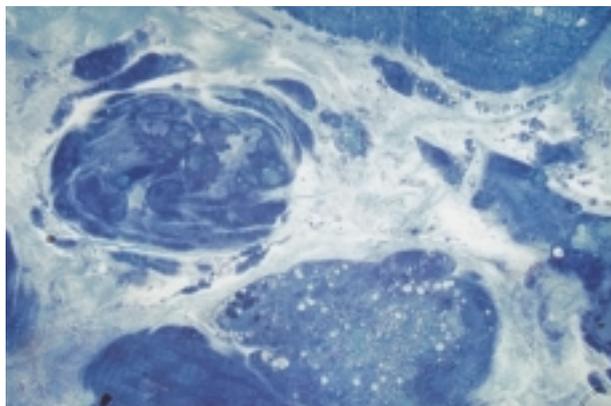


Figura 2. Accumuli di sfingolipidi (ceramide triosside; colorazione PAS) in un caso di malattia di Fabry.

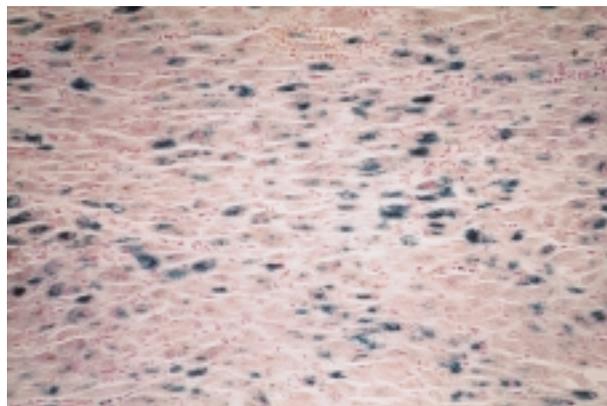


Figura 3. Accumuli intramiocellulari di ferro in un caso di emocromatosi cardiaca (colorazione blu di Prussia).

tra lo 0 ed il 67%^{13,14}. È probabile che nei casi ad elevata probabilità pre-test di miocardite, tale incidenza si aggiri intorno al 15%¹⁵⁻¹⁸.

Da un punto di vista istopatologico, i quadri possono essere classificati come miocardite linfocitaria (Fig. 4), neutrofila o eosinofila, a seconda delle caratteristiche dell'infiltrato. Generalmente essi corrispondono rispettivamente a casi di miocardite a verosimile origine virale o immunomediata, ad infezioni batteriche o a reazioni di ipersensibilità.

In alcuni casi a rapida evoluzione o fulminanti è possibile osservare, accanto ad estese aree di necrosi e ad infiltrati massivi, cellule giganti plurinucleate, di natura macrofagica. Tale riscontro si associa generalmente ad una cattiva prognosi, con una mortalità ad 1 anno del 75% nel Myocarditis Treatment Trial¹⁹.

Per quanto riguarda l'accuratezza diagnostica della metodica nei casi di sospetta miocardite, il "timing" di esecuzione della BEM rappresenta una variabile importante. Va ricordato infatti come la scomparsa dei segni istologici di miocardite possa avvenire in tempi molto brevi²⁰. È quindi importante eseguire la biopsia nelle fasi più precoci della malattia.

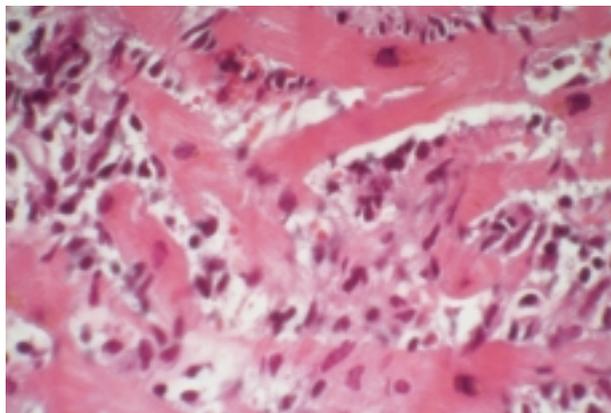


Figura 4. Infiltrato linfocitario con necrosi miocellulare in un paziente con miocardite attiva esordita con scompenso cardiaco (colorazione ematossilina-eosina).

Da un punto di vista tecnico, la BEM presenta un limite di sensibilità diagnostica comune a tutte le metodiche bioptiche nei confronti di patologie multimicrofocali. Esiste pertanto la possibilità di risultati falsi negativi conseguenti ad un errore di campionamento, la cui reale incidenza non è nota^{10,21}. In tal senso, l'esecuzione di prelievi multipli permette di incrementare la sensibilità diagnostica della metodica²².

Peraltro, la causa principale della variabilità dei risultati nella BEM sembra risiedere soprattutto nei diversi criteri diagnostici adottati dagli autori^{23,24}. Anche tra patologi esperti è stata riscontrata una variabilità interosservatore nel giudizio dato ai medesimi campioni di tessuto, tale da limitare teoricamente lo stesso apporto diagnostico della metodica (0-38% di positività)²⁵.

Di conseguenza, la necessità di criteri diagnostici accurati e riproducibili ha spinto un gruppo autorevole di esperti alla definizione morfologica di miocardite e ad una sua semplice classificazione (i cosiddetti "criteri di Dallas")²⁶. Mediante tali criteri, la miocardite "attiva" viene definita come infiltrazione di cellule infiammatorie nel miocardio, con associata necrosi e/o degenerazione dei miociti, senza che si realizzi il quadro tipico della lesione ischemica da malattia coronarica (Tab. I). Nelle successive biopsie di controllo, si parlerà di "miocardite persistente" quando il quadro istologico si presenta con le medesime caratteristiche; di "miocardite in via di risoluzione" se l'infiltrato flogistico e la necrosi risultassero ridotti; di "miocardite risolta o guarita" se il processo infiammatorio fosse del tutto spento²⁶.

Nonostante gli innegabili miglioramenti in termini di specificità diagnostica, l'esperienza clinica ha evidenziato come in una BEM si possano presentare alcuni aspetti istopatologici non del tutto inquadrabili in una miocardite secondo i criteri di Dallas, pur essendo i segni clinici e morfologici chiaramente indicativi.

In tali casi, la metodologia immunoistochimica è stata introdotta nella diagnosi dei processi infiammatori che coinvolgono il miocardio, con il fine di consentire l'identificazione, la quantificazione e la caratterizza-

Tabella I. Criteri diagnostici per miocardite (criteri di Dallas).

Prima biopsia	
Miocardite attiva	Infiltrato associato a necrosi miocellulare con o senza fibrosi
Miocardite borderline	Infiltrato senza necrosi miocellulare (può essere necessario nuovo prelievo biotico)
Non miocardite	
Biopsie successive	
Miocardite persistente	Risultato simile alla prima biopsia con o senza fibrosi
Miocardite in via di guarigione	Con o senza fibrosi
Miocardite guarita	Con o senza fibrosi

zione delle cellule infiammatorie riscontrate nel tessuto miocardico²⁷⁻²⁹. Essa rappresenta pertanto un metodo per amplificare il numero di casi di miocardite diagnosticabile mediante BEM.

L'esecuzione di un'analisi immunoistochimica è attualmente facilitata dalla fattibilità delle specifiche reazioni su materiale paraffinato. Il panel anticorpale più frequentemente utilizzato è riportato nella tabella II^{12,30}. In tal modo sono evidenziabili immunofenotipi di miocardio attivato, caratterizzati da elevata espressività antigenica, caratteristici dei casi di miocardite attiva. Va ricordato peraltro come tali quadri immunoistochimici presentino forti somiglianze a casi relativi di cardiopatia ischemica: la diagnosi differenziale farà quindi riferimento a dati clinico-anamnestici (età, "flu-like syndrome" recente, sintomatologia di base) ed all'eventuale presenza di una malattia coronarica.

L'applicazione delle tecniche di immunoistochimica comporta pertanto l'evidenza di quadri istologici di "miocardite Dallas", in cui accanto ad un miocardio attivato coesiste una flogosi interstiziale e necrosi miocellulare, e quadri di "miocardite non Dallas" dove l'istologia tradizionale non mette in luce un quadro tipico e diagnostico, ma l'indagine immunoistochimica risulta positiva per attivazione antigenica.

L'analisi immunoistochimica consente inoltre di caratterizzare gli infiltrati flogistici interstiziali, evidenziati nell'ambito clinico-strumentale di una cardiomiopatia dilatativa, interpretabili sia come "miocardite cronica" sostenuta da meccanismi prevalentemente autoimmunitari, sia come fenomeni di clearance cellulare

secondaria a necrosi parcellare. L'aumentata espressività miocardica di marker di attivazione immunologica permetterebbe di individuare i pazienti portatori di un processo flogistico cronico con valenza patogenetica³¹.

Sebbene non esista concordanza su tale entità nosologica come forma indipendente dagli altri casi di cardiomiopatia dilatativa, recentemente è stato indicato come criterio diagnostico la presenza di 14 linfociti/mm²³².

Inoltre, appare opportuno ricordare come le analisi immunoistochimiche (condotte con anticorpi specifici) ed ultrastrutturali possono giocare un ruolo rilevante in programmi di ricerca nell'ambito delle forme familiari di cardiomiopatia dilatativa. Dette analisi possono contribuire all'inquadramento di casi secondari a difetti del DNA mitocondriale³³, della distrofina³⁴, della desmina³⁵ e delle glicoproteine associate alla distrofina³⁶.

Recentemente, alcune applicazioni di tecniche di biologia molecolare in campo clinico consentono un'ulteriore analisi del tessuto endomiocardico, al fine di identificare i casi di persistenza del genoma virale. Le tecniche a cui si fa riferimento sono l'ibridizzazione su filtro, l'ibridizzazione *in situ* e l'amplificazione genica mediante catena polimerasica. In particolare quest'ultima è in grado di amplificare in modo esponenziale le molecole di DNA o RNA eventualmente presenti, e rappresenta probabilmente la metodica ideale per l'applicazione sulle piccole quantità di tessuto miocardico della BEM. La sensibilità e la specificità della metodica sono elevate, grazie anche a recenti evoluzioni tecniche (catena polimerasica "nested")^{37,38}.

Tuttavia, una revisione accurata dei numerosi studi che hanno applicato tali metodi di analisi a pazienti con cardiomiopatia dilatativa o sospetta miocardite evidenzia la scarsa univocità dei risultati³⁰. Di particolare interesse risulta il contributo scientifico di Pauschinger et al.³⁹, che sottolinea come sequenze enterovirali insite nel miocardio possano essere potenzialmente replicanti. Peraltro, i dati sul significato prognostico della persistenza di genomi virali sono tuttora oggetto di discussione^{40,41}.

Implicazioni terapeutiche

Le implicazioni prognostiche e terapeutiche della BEM rappresentano uno dei punti fondamentali di di-

Tabella II. Panel anticorpale per indagine immunoistochimica su biopsia endomiocardica.

Anticorpo	Evidenziazione
CD45RO	Linfociti T memory
CD45RA	Linfociti T unmemory
CD4	Linfociti T helper
CD8	Linfociti T suppressor
CD68-PGM1	Istiociti
LN3	Antigeni HLA
CD54	Molecole di adesione
HSP	Fenomeni apoptotici

HLA = antigene dei leucociti umani; HSP = heat shock protein.

battito tra i vari autori, strettamente connesso al problema della corretta selezione dei pazienti da candidare alla metodica. Se da un lato si sostiene che pochi sono i casi in cui la BEM abbia un positivo risvolto terapeutico², dall'altro essa rappresenta talora un passaggio inevitabile per raggiungere una certezza diagnostica¹⁰.

A tale proposito, va sottolineato come relativamente esiguo sia il numero di patologie in cui la BEM rivesta una sicura rilevanza terapeutica² (Tab. III).

Tabella III. Malattie del miocardio diagnosticabili mediante biopsia endomiocardica con provata terapia specifica.

Sarcoidosi cardiaca
Miocardite a cellule giganti
Sindrome ipereosinofila a coinvolgimento miocardico
Infezioni batteriche a coinvolgimento miocardico
Rigetto post-trapianto
Cardiotossicità da antraciclina

Nell'ambito dei pazienti con BEM positiva per diagnosi di miocardite, l'opinabilità dell'approccio terapeutico immunosoppressivo di tale condizione morbosa ha avuto inevitabili ripercussioni sull'impiego della metodica a fini diagnostici e terapeutici. A tale proposito va ricordato infatti che il trattamento della miocardite con immunosoppressione rappresenta un problema tuttora aperto^{19,42,43}. Il Myocarditis Treatment Trial¹⁹ condotto su un elevato numero di pazienti randomizzati a trattamento convenzionale per lo scompenso cardiaco o associazione tra questo e terapia immunosoppressiva (ciclosporina + prednisone) non ha dimostrato vantaggi a favore del trattamento combinato, ma alcune limitazioni metodologiche dello studio (protocollo terapeutico opinabile, sospensione del trattamento attivo dopo 6 mesi senza monitoraggio biptico, assente analisi immunoistochimica sui campioni di tessuto, ecc.) rendono tale studio non conclusivo.

Similmente, la recente proposta di trattamento mediante infusione e.v. di immunoglobuline nei casi di miocardite o scompenso cardiaco di recente insorgenza non ha trovato conferme definitive⁴⁴⁻⁴⁶.

Ciò considerato, è possibile che vi siano alcuni sottogruppi di pazienti in cui il risultato biptico possa guidare l'atteggiamento terapeutico. Ad esempio, i casi di scompenso cardiaco di recente insorgenza in avanzata classe funzionale, con importante riduzione della funzione contrattile, che presentino una BEM positiva per miocardite attiva ed un'umentata espressione miocardica dei marker di attivazione immunologica in assenza di persistenza di sequenze virali potenzialmente replicanti, potrebbero beneficiare del medesimo trattamento³¹⁻⁴².

A tali sottogruppi vanno aggiunti i pazienti in cui la biopsia permetta una diagnosi eziologica specifica (miocardite da *Borrelia*, da rickettsie, clamidie, batterica), in cui è possibile instaurare un trattamento antibio-

tico spesso risolutore. In questi casi può essere utile anche la coltura del tessuto endomiocardico⁴⁷.

Un ultimo aspetto rilevante ai fini delle scelte terapeutiche secondarie all'esecuzione della BEM è quello prognostico. Il consistente gruppo di miocarditi esordite con scompenso cardiaco ha varie possibilità evolutive, che vanno dalla guarigione completa al progressivo instaurarsi di un quadro indistinguibile dalla cardiomiopatia dilatativa. Dati confermati nelle varie casistiche hanno riportato una probabilità di risoluzione spontanea del quadro nel 40-50% dei casi^{14,19,42}. Questo dato va attentamente considerato non solo prima di iniziare una terapia specifica immunosoppressiva, ma anche nei casi a presentazione aritmica (aritmie ventricolari maggiori, blocchi di conduzione avanzati), in cui l'ipotesi di un miglioramento spontaneo può rinviare la necessità di impianto di device antiaritmici^{2,10}.

Conclusioni

La BEM è a tutt'oggi una metodica il cui impiego clinico appare ancora controverso, sebbene il suo contributo diagnostico sia insostituibile in alcune condizioni specifiche.

Nell'ambito dei pazienti con scompenso cardiaco, è probabile che mediante una selezione accurata dei casi con sindromi cliniche maggiori, essa apporti un notevole contributo prognostico e terapeutico.

Nei casi di sospetta miocardite, una moderna pratica della BEM dovrebbe prevedere l'uso routinario di criteri diagnostici ben definiti e rigorosi (criteri di Dallas), il cui apporto è stato storicamente validato. Essi andranno affiancati dallo studio immunoistochimico per un'adeguata caratterizzazione dei marker di attivazione flogistica e per una sua corretta quantificazione. Una valutazione completa ed esaustiva del campione biptico permette di inquadrare i sottogruppi di pazienti candidabili a trattamento specifico e tale risultato è raggiungibile solo con una stretta collaborazione tra il clinico ed il patologo.

Per quanto riguarda le tecniche di biologia molecolare (catena polimerasica) finalizzate al riconoscimento di sequenze di genoma virale nel miocardio, il loro impatto clinico appare in corso di definizione e pertanto il loro impiego non si configura ancora come routinario. Tuttavia esse potranno rappresentare in futuro un importante strumento conoscitivo potenzialmente utile sul piano operativo.

Riassunto

Negli ultimi decenni, la biopsia endomiocardica ha rappresentato un nuovo e potente strumento di indagine sulle malattie del miocardio, divenendo in particolare una metodica diagnostica insostituibile nei casi di

sospetta miocardite. Ciononostante, il suo impiego clinico è tuttora oggetto di controversie in letteratura, in quanto a taluni autori appaiono limitate le ricadute sul piano operativo.

Le attuali tecniche consentono di eseguire prelievi multipli di tessuto endomiocardico dal ventricolo sinistro o destro con una bassa incidenza di complicanze periprocedurali.

In considerazione della sua invasività e della ricaduta pratica, un'attenta selezione dei pazienti da sottoporre a biopsia endomiocardica rappresenta un punto fondamentale per un corretto impiego della metodica. Oltre ad alcune particolari situazioni cliniche (follow-up post-trapianto cardiaco, sospetta malattia specifica del miocardio, ecc.), l'indicazione più frequente alla biopsia endomiocardica è rappresentata da pazienti con sindromi cliniche maggiori (scompenso cardiaco con rilevante disfunzione ventricolare sinistra di recente insorgenza, aritmie ventricolari sostenute) e sospetta miocardite. In tali casi, il problema relativo ad una corretta analisi dei campioni di tessuto non appare di semplice soluzione. Infatti, le informazioni derivabili da essi aumentano quanto più numerose sono le metodologie di indagine applicate. Per tale motivo appare indispensabile affiancare all'istologia tradizionale le tecniche immunostochimiche, ultrastrutturali e di biologia molecolare attualmente disponibili, che consentono di aumentare l'accuratezza diagnostica della metodica.

Da un punto di vista terapeutico, la biopsia endomiocardica ha una propria valenza in un numero limitato di situazioni cliniche, risentendo in ciò delle persistenti incertezze riguardanti l'approccio terapeutico dei casi di miocardite attiva. Va tuttavia ricordato come in casi selezionati essa rappresenti una metodica utile ad un corretto inquadramento prognostico e terapeutico.

Parole chiave: Biopsia endomiocardica; Cardiomiopatia dilatativa; Scompenso cardiaco.

Bibliografia

1. Sakakibara S, Konno S. Endomyocardial biopsy. *Jpn Heart J* 1962; 3: 537-43.
2. Mason JW, O'Connell JB. Clinical merit of endomyocardial biopsy. *Circulation* 1989; 79: 971-9.
3. Hill JA, Lambert CR, Vlietstra RE, Pepine CJ. Review of techniques. In: Pepine CJ, ed. *Diagnostic and therapeutic cardiac catheterization*. Baltimore, MA: Williams & Wilkins, 1998: 106-28.
4. Sinagra G, Klugmann S. Quando si deve effettuare la biopsia endomiocardica in pazienti con cardiomiopatia? *Giornale Italiano di Emodinamica* 1995; 4: 16-8.
5. Mason JW. Techniques for right and left endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 1978; 41: 887-92.
6. Starling RC, Van Fossen DB, Hammer DF, Unverferth DV. Morbidity of endomyocardial biopsy in cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1991; 68: 133-6.
7. Anastasiou-Nana MI, O'Connell JB, Nanas JN, Sorensen SG, Anderson JL. Relative efficiency and risk of endomyocardial biopsy: comparisons in heart transplant and non-transplant patients. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1989; 18: 7-11.
8. Parrillo JE. Myocarditis: how should we treat in 1998? *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 941-4.
9. Waller BF, Slack JD, Orr CD, Adlam JH, Bournique VM. "Flaming", "smoldering", "burned out": the fireside saga of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 1627-30.
10. Billingham ME. Acute myocarditis: is sampling error a contraindication for diagnostic biopsies? *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 921-2.
11. Kyle RA. Amyloidosis. *Circulation* 1995; 91: 1269-71.
12. Arbustini E, Grasso M, Diegoli M, Dal Bello B. Biopsia endomiocardica. In: Santini M, ed. *Trattato di cardiologia*. Milano: Excerpta Medica, 2000: 629-52.
13. Rose AG, Fraser RC, Beck W. Absence of evidence of myocarditis in endomyocardial biopsy specimens from patients with dilated (congestive) cardiomyopathy. *S Afr Med J* 1984; 66: 871-4.
14. Dec GW, Palacios IF, Fallon JT, et al. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312: 885-90.
15. Sinagra G, Maras P, D'Ambrosio A, et al. Polimorfismo clinico di presentazione e storia naturale della miocardite attiva: esperienza su 60 casi. *G Ital Cardiol* 1997; 27: 758-74.
16. Arbustini E, Gavazzi A, Dal Bello B, et al. Ten-year experience with endomyocardial biopsy in myocarditis presenting with congestive heart failure: frequency, pathologic characteristics, treatment and follow-up. *G Ital Cardiol* 1997; 27: 209-23.
17. Mason JW. Endomyocardial biopsy and the causes of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 591-2.
18. Salvi A, Silvestri F, Gori D, Klugmann S, Tanganelli P, Camerini F. La biopsia endomiocardica: un'esperienza clinica relativa a 156 pazienti. *G Ital Cardiol* 1985; 15: 251-9.
19. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, et al. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 1995; 333: 269-75.
20. Keogh AM, Billingham ME, Schroeder JS. Rapid histological changes in endomyocardial biopsy specimens after myocarditis. *Br Heart J* 1990; 64: 406-8.
21. Baandrup U, Florio RA, Olsen EGJ. Do endomyocardial biopsies represent the morphology of the rest of the myocardium? A quantitative light microscopic study of single versus multiple biopsies with the King's biotome. *Eur Heart J* 1982; 3: 171-8.
22. Camerini F, Perkan A, Sinagra G, ed il Gruppo di Studio sulle Malattie del Miocardio. Le miocarditi: inquadramento epidemiologico e clinico. *La Cardiologia nella Pratica Clinica* 1994; 3: 161-72.
23. Edwards WD. Current problems in establishing quantitative histopathological criteria for the diagnosis of lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy. *Heart Vessels Suppl* 1985; 1: 138-42.
24. Fenoglio JJ, Ursell PC, Kellogg CF, Drusin RE, Weiss MB. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. *N Engl J Med* 1983; 308: 12-8.
25. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987; 75: 401-5.
26. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis: a histopathological definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14.
27. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schannwell M, Welp LB, Schultheiss HP. Chronic inflammation in the myocardium

- of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 1994; 1: 13-25.
28. Steenbergen C, Kolbeck PC, Wolfe JA, Anthony RM, Sanfilippo FP, Jennings RB. Detection of lymphocytes in endomyocardium using immunohistochemical techniques. Relevance to evaluation of endomyocardial biopsies in suspected cases of lymphocytic myocarditis. *J Appl Cardiol* 1986; 1: 63-73.
 29. Milei J, Bortman G, Fernandez-Alonso G, Grancelli H, Beigelman R. Immunohistochemical staining of lymphocytes for the reliable diagnosis of myocarditis in endomyocardial biopsies. *Cardiology* 1990; 77: 77-85.
 30. Sinagra G, Silvestri F, Pinamonti B, Bussani R, Salvi A, Perkan A. Miocarditi. In: Santini M, ed. *Trattato di cardiologia*. Milano: Excerpta Medica, 2000: 2013-34.
 31. Kühl U, Noutsias M, Schultheiss HP. Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O): 100-6.
 32. Maisch B. Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force - more questions than answers? *Med Klin* 1998; 93: 199-209.
 33. Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998; 153: 1501-10.
 34. Arbustini E, Diegoli M, Morbini P, et al. Prevalence and characteristics of dystrophin defects in adult male patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1760-8.
 35. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, et al. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 100: 461-4.
 36. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, et al. Mutations in the human δ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000; 106: 655-62.
 37. Severini GM, Mestroni L, Falaschi A, Camerini F, Giacca M. Nested polymerase chain reaction for high sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1345-9.
 38. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia J, et al. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99: 1348-54.
 39. Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U, et al. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999; 99: 889-95.
 40. Why HJF, Meany BT, Richardson PJ, et al. Clinical and prognostic relevance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89: 2582-9.
 41. Figulla HR, Stille-Siegener, Mall G, et al. Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: a benign disease compared with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1170-5.
 42. Maisch N, Herzum M, Hufnagel G, Schoenian U. Immunosuppressive and immunomodulatory treatment for myocarditis. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 310-24.
 43. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1388-98.
 44. McCarthy RE III, Bochmer JP, Hruban RH, et al. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 342: 690-5.
 45. McNamara DM, Rosenbaum WD, Janosko KM, et al. Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 95: 2476-8.
 46. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, et al. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103: 2254-9.
 47. Lardieri G, Salvi A, Camerini F, Cinco M, Trevisan G. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from myocardium. (letter) *Lancet* 1993; 342: 490.