

T. Derfuß<sup>1,2</sup> · R. Hohlfeld<sup>1,2</sup> · E. Meinl<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Abteilung für Neuroimmunologie, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried

<sup>2</sup> Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians Universität, München

# Multiple Sklerose

## Chlamydien-Hypothese in der Diskussion

### Zusammenfassung

Vor kurzem wurde die Hypothese einer Assoziation zwischen Multipler Sklerose und Chlamydia pneumoniae aufgestellt. Eine Reihe von Studien konnte jedoch aufgrund fehlender Standardisierung der PCR-Methoden keine Klarheit zur Existenz von Chlamydia pneumoniae im Hirngewebe oder Liquor von MS-Patienten bringen. Andere Studien legten deshalb den Schwerpunkt auf die Untersuchung der humoralen Immunantwort gegen Chlamydia pneumoniae. Dabei fiel bei 24% der MS-Patienten, aber nur bei 5% der Kontrollpatienten eine Chlamydien-spezifische intrathekale Immunglobulinsynthese auf. Sollte eine Infektion mit Chlamydia pneumoniae ursächlich an der Entstehung von MS beteiligt sein, wäre in Analogie zu anderen erregerebedingten Infektionen des zentralen Nervensystems auch bei MS zu erwarten, dass die oligoklonalen Immunglobuline den auslösenden Erreger erkennen. Unsere Untersuchungen mittels affinitätsgetriebenem Immunoblot zeigten allerdings, dass die oligoklonalen Banden im Liquor von MS-Patienten Chlamydienantigen nicht erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten die Immunglobuline im Liquor von Patienten mit Neuroborreliose eine heftige Reaktivität gegen Borrelien im affinitätsgetriebenen Immunoblot. Diese Befunde sprechen dafür, dass die intrathekale Immunglobulinproduktion gegen Chlamydia pneumoniae Teil einer polyspezifischen Immunantwort ist. Chlamydia pneumoniae ist somit nicht kausal mit MS in Verbindung zu bringen.

### Schlüsselwörter

Multiple Sklerose · Chlamydia pneumoniae · Oligoklonale Banden · Intrathekale Immunglobulinproduktion

**M**ultiple Sklerose ist eine immunpathologische Erkrankung [10]. Sowohl epidemiologische als auch pathologische Befunde weisen darauf hin, dass zumindest in einer Untergruppe von MS infektiöse Erreger bei der Pathogenese eine Rolle spielen könnten [15, 17]. Dabei wurden hauptsächlich Viren (HHV 6, EBV, HSV, endogene Retroviren) als Auslöser von MS diskutiert [20]. Für keinen dieser Erreger konnte jedoch ein kausaler Zusammenhang mit MS bewiesen werden.

Vor 2 Jahren wurde von Dr. Sriram von der Vanderbilt University in Tennessee die Hypothese einer Assoziation von Chlamydia pneumoniae mit MS aufgestellt. In einem ersten Fallbericht zum Zusammenhang zwischen Chlamydia pneumoniae und MS berichtete Dr. Sriram vom Ansprechen einer Antibiotikatherapie bei einem MS-Patienten, dessen Symptomatik sich zuvor akut verschlechtert hatte. Der Liquor dieses Patienten erwies sich sowohl in der Kultur als auch in der PCR (Nachweis der DNA für das „major outer membrane protein“) als Chlamydien-positiv [27]. In einer zweiten Studie zeigten sich 64% der Liquores von MS-Patienten und 11% der Liquores von Kontrollpatienten in der Kultur als positiv; in der PCR waren die Liquores von 97% der MS-Patienten und von 18% der Kontrollpatienten positiv für Chlamydien [28].

Chlamydia pneumoniae ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, das hauptsächlich alveoläre Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen infiziert. Anhand serologischer Untersuchungen zeigte sich, dass ungefähr 50% der Bevölkerung Kontakt mit Chlamydia pneumoniae hatten [8]. Einen Hinweis auf einen möglichen Neurotropis-

mus dieses Erregers geben Berichte vom Auftreten von Meningoenzephalitiden [12, 13, 26] und eines Guillain-Barre-Syndroms [6] nach respiratorischen Infekten mit Chlamydia pneumoniae. Diese Erkrankungen korrelierten mit einem Anstieg des Chlamydien-spezifischen Antikörpertiters. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen der sporadischen Enzephalomyelitis bei Kühen und Chlamydien nachgewiesen werden [9].

### Studien zur Rolle von Chlamydia pneumoniae bei MS

In den letzten 2 Jahren versuchten viele Gruppen die Rolle von Chlamydia pneumoniae bei MS zu klären. In 5 Studien wurde in Liquor bzw. Hirngewebe von MS-Patienten weder mittels PCR noch mit Kultur ein Nachweis für eine Infektion mit Chlamydien gefunden [1, 7, 11, 21, 22]. In 2 Studien konnten bei ca. 25% der MS Patienten mittels PCR Chlamydien im Liquor nachgewiesen werden [16, 29]. Allerdings wurden bei diesen Studien nur wenige Patienten untersucht und bei einer Studie fehlten die Kontrollen [29]. In einer weiteren Studie konnte bei 21% der MS-Patienten und bei 43% der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, aber bei keinem von 67 untersuchten, neurologisch gesunden Patienten Chlamydia pneumoniae mittels PCR im Liquor nachgewiesen werden [4].

Zur Klärung der Rolle von Chlamydien bei MS wurde im Juli 2000 in

---

Priv.-Doz. Dr. Edgar Meinl  
Abteilung für Neuroimmunologie,  
Max-Planck-Institut für Neurobiologie,  
Am Klopferspitz 18A, 82152 Martinsried,  
E-Mail: meinl@neuro.mpg.de

## Multiple sclerosis. *Chlamydia pneumoniae* put to the test

### Summary

Recently, an association between multiple sclerosis and *Chlamydia pneumoniae* infection has been suggested. Because standardized PCR protocols are lacking, a series of studies could not clarify whether *C. pneumoniae* is present in brain tissue and CSF of MS patients. Therefore, other studies focused on the humoral immune response against *C. pneumoniae*: 24% of MS patients, but only 5% of the control patients showed intrathecally produced antibodies against *C. pneumoniae*. If an infection with *C. pneumoniae* was involved in the pathogenesis of MS, one would expect that, in analogy to other infections of the CNS, the oligoclonal bands in the CSF of MS patients would recognize the responsible agent. However, the results we obtained by affinity-mediated immunoblots showed that the oligoclonal bands in the CSF of MS patients are not directed against *Chlamydia* antigen. In contrast to this, we found that the immunoglobulins in the CSF of neuroborreliosis patients reacted strongly against *Borrelia* antigen in the affinity-mediated immunoblots. In light of these results we assume that the intrathecal immunoglobulin production against *C. pneumoniae* is part of a polyspecific immune response. Thus, it is not likely that *C. pneumoniae* is causally linked to the pathogenesis of multiple sclerosis.

### Keywords

Multiple sclerosis · *Chlamydia pneumoniae* · Oligoclonal bands · Intrathecal immunoglobulin production

Deutschland eine randomisierte, doppelblinde, multizentrische Therapiestudie mit Roxithromycin initiiert [30]. Da der PCR-Nachweis und die Anzüchtung von Chlamydien in Kultur noch nicht standardisiert und beide Verfahren zudem sehr störanfällig sind, wurde in 2 weiteren Studien das Hauptgewicht auf die Analyse der humoralen Immunantwort gegen *Chlamydia pneumoniae* bei MS-Patienten gelegt [3, 14].

In unserer eigenen Studie wurden Liquor-Serum-Paare von 120 Patienten getestet [3]. Serologischen Anhalt für einen Kontakt mit *Chlamydia pneumoniae* hatten ca. 50% der MS- und Kontrollpatienten. Anhand der Liquor-Serum-Werte von Immunglobulin und Albumin wurde der korrigierte Antikörperindex berechnet, der Angaben über die intrathekale Immunglobulinproduktion zulässt [23]. 24% der Patienten mit sicherer MS, aber nur 5% der Kontrollpatienten zeigten im ELISA eine intrathekale Immunglobulinproduktion gegen *Chlamydia pneumoniae* [3]. In Übereinstimmung dazu zeigte die andere Studie eine signifikant erhöhte intrathekale Immunglobulinproduktion gegen *Chlamydia pneumoniae* in der MS-Gruppe verglichen mit den Kontrollgruppen [14]. Diese Chlamydien-spezifische intrathekale Immunglobulinproduktion war über die Zeit stabil und korrelierte nicht mit Krankheitsdauer oder Krankheitsverlauf [3, 14].

### Stellenwert der intrathekalen Immunglobulinproduktion

Chronische intrathekale Immunglobulinproduktion ist ein Kennzeichen bei MS. Labortechnisch sind ein erhöhter Liquor-Serum-Quotient für Immunglobuline und oligoklonale Banden in der isoelektrischen Fokussierung zu finden. Die Antigenspezifität dieser im Liquor produzierten Immunglobuline bei MS ist nicht bekannt. Oligoklonale Immunglobuline, die im Laufe einer Infektion des ZNS produziert werden, sind gegen den jeweiligen Erreger gerichtet [5]. Bei einer erregerbedingten Pathogenese von MS sollten die im Liquor produzierten Immunglobuline den auslösenden Erreger erkennen. Falls Chlamydien bei den 24% der MS-Patienten, die eine intrathekale Immunglobulinproduktion gegen *Chlamydia pneumoniae* aufweisen, eine pathogene Rolle spielen, wäre zu erwar-

ten, dass auch die oligoklonalen Banden im Liquor dieser Patienten mit Chlamydienantigen reagieren, wie es in Analogie z. B. bei Neuroborreliose oder Herpes-simplex-Enzephalitis bereits gezeigt ist. Zur Klärung dieser Frage haben wir mit Liquor und Serum dieser Patienten eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt [3]. Die nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Immunglobuline wurden mittels affinitätsgetriebenem Kapillarblot auf eine mit Antigen beschichtete Membran transferiert. Diese Methode ermöglicht es, die Antigenspezifität der oligoklonalen Banden festzustellen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte, dass die oligoklonalen Immunglobuline im Liquor von MS-Patienten Chlamydienantigen *nicht* erkennen (Abb. 1b; [3]). Im Gegensatz dazu zeigten die Immunglobuline im Liquor von Patienten mit Neuroborreliose eine heftige Reaktion gegen Borrelien im affinitätsgetriebenen Kapillarblot (Abb. 1c). Die Untersuchung von Yao et al. kam allerdings zu entgegengesetzten Ergebnissen: 16/16 der untersuchten MS-Patienten und 2/14 der Kontrollpatienten zeigten oligoklonale Banden, die gegen *Chlamydia pneumoniae*-Antigen gerichtet waren [31]. Außerdem ließen sich die oligoklonalen Banden im Liquor von 14/17 MS-Patienten mit Chlamydienantigen, aber nicht mit Kontrollantigen absorbieren, während sich die oligoklonalen Banden im Liquor von Kontrollpatienten durch Chlamydienantigen nicht absorbieren ließen. Die Gründe für die entgegengesetzten Ergebnisse der beiden Untersuchungen sind derzeit nicht klar. Beim Vergleich unserer Studie mit der von Yao et al. möchten wir Folgendes anmerken:

1. In der Studie von Yao et al. wurden keine ELISA-Untersuchungen durchgeführt, um die intrathekale Immunglobulinproduktion gegen *Chlamydia pneumoniae* zu quantifizieren. Unsere Studie zeigte in Übereinstimmung mit der von Krametter et al., dass die Seropositivität für Chlamydienantikörper von MS-Patienten und Kontrollpatienten bei ungefähr 50% liegt und dass 25% der MS-Patienten eine intrathekale Immunglobulinproduktion gegen Chlamydien aufweisen [3, 14].
2. Die von Yao et al. gefundene Positivität von 100% der MS-Patienten im

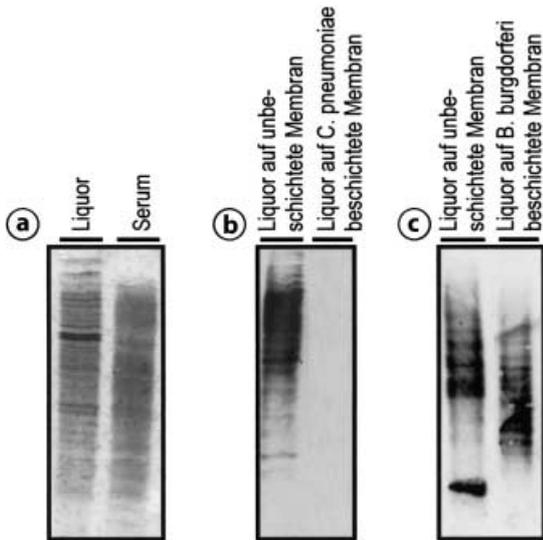


Abb. 1a–c ▲ Darstellung der oligoklonalen Banden und Analyse ihrer Antigen-spezifität bei MS und Neuroborreliose. a Die Proteine in Liquor und Serum eines MS-Patienten wurden in einem Polyacrylamidgel isoelektrisch fokussiert und nachfolgend im Gel silbergefärbt. b Der Liquor eines MS-Patienten wurde in einem Agarosegel isoelektrisch fokussiert. Dann wurden die Proteine mittels eines affinitätsgetriebenen Kapillarblots auf eine unbeschichtete Membran (*links*) oder auf eine Chlamydia-pneumoniae-beschichtete Membran (*rechts*) transferiert. Die Immunglobuline wurden mit Biotin markiertem anti-human IgG, Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase und Chemilumineszenz detektiert. Die Biotinverstärkung war notwendig, um auch sehr schwache Signale sehen zu können. Kontrollexperimente zeigten, dass das Chlamydienantigen auf einer Membran von ELISA-positiven Patientenseren erkannt werden konnte. c Der Liquor eines Neuroborreliose-Patienten wurde in einem Agarosegel isoelektrisch fokussiert. Dann wurden die Proteine mittels eines affinitätsgetriebenen Kapillarblots auf eine unbeschichtete Membran (*links*) oder auf eine Borrelia burgdorferi beschichtete Membran (*rechts*) transferiert. Die Immunglobuline wurden mit anti-human IgG-Meerrettich-Peroxidase und Chemilumineszenz detektiert. Das Signal war so stark, dass eine Verstärkung mit Biotin nicht nötig war

affinitätsgetriebenen Immunoblot erscheint überraschend hoch. Der Unterschied zu unseren Ergebnissen könnte auf verschiedenen Antigenpräparationen und auf technischen Details des affinitätsgetriebenen Immunoblots beruhen. Yao et al. fanden auch eine überraschend hohe Reaktivität gegen Kontrollantigene: 7–8/10 getesteten MS-Patienten zeigten auch eine Antwort gegen HSV-1 und Masernvirus. Das könnte auf eine niedrige Stringenz des affinitätsgetriebenen Immunoblots hinweisen.

- Die Ergebnisse der Absorptionsversuche lassen sich nur schwer interpretieren, da die mit Chlamydien absorbierten Antikörper nicht mit Kontrollantigenen getestet wurden, um eine selektive Absorption der Chlamydien-spezifischen Antikörper zu zeigen.

Die erhöhte intrathekale Immunglobulinreaktivität gegen Chlamydien ist –

nach unserer Studie – am ehesten auf eine so genannte „Bystander-Reaktion“ zurückzuführen. Dabei werden durch das entzündliche Milieu im Bereich der MS Plaques B-Zellen angelockt, die Im-

munglobuline verschiedener Spezifitäten produzieren. Die bekannte Masern-Röteln-Zoster-Reaktivität (MRZ-Reaktion) der Immunglobuline im Liquor von MS-Patienten ist durch eine ähnliche „Bystander-Aktivierung“ von B-Zellen zu erklären [25]. Bei der MRZ-Reaktion besteht eine intrathekale Immunglobulinproduktion gegen Masern, Röteln und Zoster, aber die oligoklonalen Banden erkennen diese Antigene nicht. Diese MRZ-Antikörper stellen zusammen weniger als 2% der Gesamtantikörper im Liquor dar und zeigen eine niedrige Affinität zu ihrem Antigen [18, 24]. Im Gegensatz dazu sind bei erregerbedingten Enzephalitiden, wie z. B. bei SSPE, mehr als 20% der intrathekal produzierten Antikörper gegen den auslösenden Erreger gerichtet [2]. Diese Antikörper besitzen eine hohe Affinität für ihr Antigen (Tabelle 1; [19]).

## Schlussfolgerungen

Trotz kontroverser Ergebnisse legt die Mehrheit der durchgeführten Studien den Schluss nahe, dass Chlamydien bei der Pathogenese von MS nicht kausal beteiligt sind. Bereits laufende Therapiestudien mit Antibiotika werden zur weiteren Klärung beitragen.

Praktische Konsequenzen dieser Ergebnisse sind:

- Es ist derzeit nicht sinnvoll, MS-Patienten serologisch „auf Chlamydien“ zu untersuchen, da sowohl bei Normalpersonen als auch bei MS-

Tabelle 1

### Merkmale des Liquors bei MS und anderen chronischen Enzephalitiden

Liquormerkmal	Krankheit	
	MS	Chronische bakterielle Enzephalitis (z. B. Neuroborreliose)
Antikörperproduktion im ZNS	Ja	Ja
Oligoklonale Antikörper im Liquor	Ja	Ja
Polyspezifische Antikörperproduktion gegen verschiedene Erreger wie Masernvirus, Rötelnvirus, Varizella-Zoster-Virus im ZNS	Fast immer	Selten
Antigen-spezifität der oligoklonalen Antikörper im Liquor	Unbekannt (nicht Chlamydia pneumoniae)	Gegen jeweiligen Erreger gerichtet (z. B. Borrelia burgdorferi)

- Patienten in 50% mit einem positiven Ergebnis zu rechnen ist (Durchsuchungstiter).
2. Eine antibiotische Therapie gegen Chlamydien ist im Allgemeinen nicht indiziert, da selbst bei den 25% MS-Patienten, die eine intrathekale Immunglobulinproduktion gegen Chlamydien zeigten, die oligoklonalen Banden nicht spezifisch gegen Chlamydien reagieren und daher als Teil einer polyklonalen Immunreaktion anzusehen sind.

## Literatur

- Boman J, Roblin PM, Sundstrom P, Sandstrom M, Hammerschlag MR (2000) Failure to detect Chlamydia pneumoniae in the central nervous system of patients with MS. *Neurology* 54:265
- Conrad AJ, Chiang EY, Andeen LE et al. (1994) Quantitation of intrathecal measles virus IgG antibody synthesis rate: subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 54:99–108
- Derfuss T, Gurkov R, Bergh FT et al. (2001) Intrathecal antibody production against Chlamydia pneumoniae in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 124:1325–1335
- Gieffers J, Pohl D, Treib J et al. (2001) Presence of Chlamydia pneumoniae DNA in the cerebral spinal fluid is a common phenomenon in a variety of neurological diseases and not restricted to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 49:585–589
- Gilden DH (1999) Chlamydia: a role for multiple sclerosis or more confusion? *Ann Neurol* 46:4–5
- Haidl S, Ivarsson S, Bjerre I, Persson K (1992) Guillain-Barre syndrome after Chlamydia pneumoniae infection. *N Engl J Med* 326:576–577
- Hammerschlag MR, Ke Z, Lu F, Roblin P, Boman J, Kalman B (2000) Is Chlamydia pneumoniae present in brain lesions of patients with multiple sclerosis? *J Clin Microbiol* 38:4274–4276
- Hargreaves JE, Zajac RA, Kuo CC, Wang SP, Grayston JT (1994) Chlamydia pneumoniae strain TWAR pharyngitis in US Air Force basic trainees. *J Am Osteopath Assoc* 94:51–54
- Harshfield GS (1970) Sporadic bovine encephalomyelitis. *J Am Vet Med Assoc* 156:466–477
- Hohlfeld R (1997) Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120:865–916
- Ke Z, Lu F, Roblin P, Boman J, Hammerschlag MR, Kalman B (2000) Lack of detectable Chlamydia pneumoniae in brain lesions of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 48:400
- Korman TM, Turnidge JD, Grayson ML (1997) Neurological complications of chlamydial infections: case report and review. *Clin Infect Dis* 25:847–851
- Koskiniemi M, Gencay M, Salonen O, Puolakkainen M, Farkkila M, Saikku P, Vaheri A (1996) Chlamydia pneumoniae associated with central nervous system infections. *Eur Neurol* 36:160–163
- Krametter D, Niederwieser G, Berghold A, Birnbaum G, Strasser-Fuchs S, Hartung HP, Archelos JJ (2001) Chlamydia pneumoniae-specific humoral immune responses and clinical disease parameters in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 49:135
- Kurtzke JF (2000) Multiple sclerosis in time and space – geographic clues to cause. *J Neurovirol* 6 [Suppl 2]:S134–S140
- Layh-Schmitt G, Bendl C, Hildt U et al. (2000) Evidence for infection with Chlamydia pneumoniae in a subgroup of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47:652–655
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–717
- Luxton RW, Thompson EJ (1990) Affinity distributions of antigen-specific IgG in patients with multiple sclerosis and in patients with viral encephalitis. *J Immunol Methods* 131:277–282
- Luxton RW, Zeman A, Holzel H et al. (1995) Affinity of antigen-specific IgG distinguishes multiple sclerosis from encephalitis. *J Neurol Sci* 132:11–19
- Meinl E (1999) Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 12:303–307
- Morre SA, De Groot CJ, Killestein J, Meijer CJ, Polman CH, Van der Valk P, Van den Brule AJ (2000) Is Chlamydia pneumoniae present in the central nervous system of multiple sclerosis patients? *Ann Neurol* 48:399
- Pucci E, Taus C, Cartechini E, Morelli M, Giuliani G, Clementi M, Menzo S (2000) Lack of Chlamydia infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 48:399–400
- Reiber H, Lange P (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 37:1153–1160
- Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C (1998) The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4:111–117
- Sindic CJ, Monteyne P, Laterre EC (1994) The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 54:75–80
- Socan M, Beovic B, Kese D (1994) Chlamydia pneumoniae and meningoencephalitis. *N Engl J Med* 331:406
- Sriram S, Mitchell W, Stratton C (1998) Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* 50:571–572
- Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM (1999) Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46:6–14
- Treib J, Haass A, Stille W et al. (2000) Multiple sclerosis and Chlamydia pneumoniae. *Ann Neurol* 47:408–411
- Woessner R, Treib J (2001) Chlamydia infections in neurology. *Dtsch Med Wochenschr* 126:153–155
- Yao SY, Stratton CW, Mitchell WM, Sriram S (2001) CSF oligoclonal bands in MS include antibodies against Chlamydia antigens. *Neurology* 56:1168–1176