

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus in einer
großen Kohorte von Patientinnen und Patienten mit früher Multipler Sklerose**

A study of the prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus in a large cohort of patients with
early multiple sclerosis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sargis Abrahamyan

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	1
<u>1. Zusammenfassung</u>	2
<u>2. Einleitung</u>	6
2.1 Multiple Sklerose: Epidemiologie und Klinik	6
2.2 Ätiologie der Multiplen Sklerose	8
2.3 Epstein Barr Virus	9
2.4. Multiple Sklerose und Epstein-Barr Virus	10
<u>3. Fragestellungen und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</u>	11
4.1 EBV-Antikörperbestimmung	13
4.2 Retrospektive Analyse der Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus in Routinelaboreinsendungen	14
4.3 Statistische Auswertung	15
<u>5. Ergebnisse</u>	15
5.1 Epstein-Barr-Virus-Seroprävalenz bei früher Multipler Sklerose	15
5.2 Epstein-Barr-Virus-Seroprävalenz in einer großen Krankenhauspopulation	15
<u>6. Diskussion</u>	21
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	25
<u>8. Eidesstattliche Versicherung</u>	34
<u>9. Der Auszug aus der Journal Summary List</u>	37
<u>10. Publikation</u>	38
<u>10. Publikationsliste</u>	45

Abkürzungsverzeichnis

MS	Multiple Sklerose
KIS	klinisch isoliertes Syndrom
RRMS	relapsing-remitting Multiple Sclerosis
PPMS	primär progrediente MS
SPMS	sekundär progrediente MS
KKNMS	krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA 1	Epstein-Barr nuclear Antigen-1
EBNAc	Epstein-Barr nuclear antigen complex
VCA	viral capsid antigen
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ZNS	Zentralnervensystem
DIS	dissemination in space - räumliche Dissemination
DIT	dissemination in time - zeitliche Dissemination
OKB	oligoklonale Banden
IE	immediate early
E	early
L	late

1. Zusammenfassung

Hintergrund:

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die auf dem Boden einer Interaktion von genetischen und Umweltfaktoren entsteht. Der wichtigste und stärkste derzeit bekannte externe Risikofaktor für die Entwicklung einer MS ist eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Frühere seroepidemiologische Untersuchungen haben übereinstimmend gezeigt, dass fast alle Patienten mit MS EBV-seropositiv sind. Sollte eine Infektion mit EBV tatsächlich eine Voraussetzung zur Entwicklung einer MS sein, wäre jedoch zu erwarten, dass Patienten mit MS ausnahmslos EBV-seropositiv sind. Somit stellt sich die Frage, ob es wirklich EBV-seronegative Patienten mit einer MS gibt.

Zielsetzung:

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Seroprävalenz von Antikörpern gegen das EBV in einer großen Kohorte von Patienten mit früher MS.

Methodik:

In Serumproben von 901 Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom (KIS, der klinischen Erstmanifestation einer MS) oder schubförmiger MS aus der deutschen nationalen MS-Kohorte wurden IgG-Antikörper gegen das Epstein-Barr nukleäre Antigen-1 (EBNA-1) mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) gemessen. Antikörper gegen das EBV viral capsid antigen (VCA) wurden bei EBNA-1-Antikörper-seronegativen Patienten ebenfalls mittels CLIA analysiert. EBNA-1- und VCA-Antikörper-seronegative Patienten wurden mit einem EBV-IgG-Immunoblot untersucht. Zur Ermittlung der EBV-Seroprävalenz in einer Kontrollpopulation wurde in einer großen Krankenhauspopulation (n=16.163) aus Berlin/Norddeutschland die EBV-Seroprävalenz in unterschiedlichen Altersgruppen von <0,25 bis >80 Jahren ermittelt.

Ergebnisse:

Von 901 Patienten mit KIS/RRMS hatten 839 IgG-Antikörper gegen EBNA-1. IgG-Antikörper gegen VCA wurden bei 45 von 62 EBNA-1-Antikörper seronegativen Patienten nachgewiesen. Unter Verwendung von EBV-IgG-Immunoblots wurden bei allen übrigen 17 Patienten IgG-Antikörper gegen EBV gefunden. Somit waren alle 901 Patienten (100%) mit KIS/RRMS, die in unsere Studie eingeschlossen wurden, seropositiv für EBV. Die EBV-Seroprävalenz in der Krankenhauspopulation stieg mit zunehmendem Alter in allen 5-Jahres-Alterskohorten an,

erreichte aber in keiner der untersuchten Altersgruppen 100%.

Schlussfolgerungen:

Die Abwesenheit von EBV-seronegativen Personen in dieser gut charakterisierten Kohorte von Patienten mit früher MS weist auf eine zentrale Rolle von EBV bei der MS hin. Eine negative EBV-Serologie bei Patienten mit Verdacht auf eine entzündliche Erkrankung des ZNS spricht gegen eine MS und sollte anderweitige Diagnosen in Betracht ziehen lassen.

Abstract

Background:

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system, which develops through an interaction of genetic and environmental factors. Epstein-Barr virus (EBV) is the most important and strongest currently known risk factor for MS. Previous seroepidemiological studies have consistently shown that almost all patients with MS are EBV-seropositive. However, if EBV infection was indeed a prerequisite for development of MS, one would expect that all patients with MS (100%) would be EBV seropositive. The question therefore arises whether EBV seronegative patients with MS do really exist.

Objective:

The present study aimed to determine the seroprevalence of antibodies against EBV in a large cohort of patients with early MS.

Methods:

In serum samples from 901 patients with a clinically isolated syndrome (CIS, the first clinical manifestation of multiple sclerosis) or with early relapsing-remitting MS (RRMS) from the German National MS cohort antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1) were measured by a chemiluminescence immunoassay (CLIA). Antibodies to the EBV viral capsid antigen (VCA) were analyzed in EBNA-1 antibody seronegative patients by CLIA as well. EBV IgG immunoblot was used to analyze EBNA-1 and VCA antibody seronegative patients. To determine the EBV seroprevalence in a control population, we determined the EBV seroprevalence in different age groups ranging from <0.25 to >80 years in a large hospital population (n = 16,163) from Berlin/Northern Germany.

Results:

Of the 901 patients with CIS/RRMS, 839 had IgG antibodies to EBNA-1. IgG antibodies to VCA were detected in 45 of 62 EBNA-1 antibody seronegative patients. Using EBV IgG immunoblots, IgG antibodies to EBV were found among all the remaining 17 patients. Therefore, all 901 patients (100%) with CIS/RRMS included in our study were seropositive for EBV. EBV seropositivity increased with increasing age in the hospital population, but did not reach 100% in any of the examined age groups.

Conclusions:

The absence of EBV seronegativity in this well-characterized cohort of patients with early MS indicates a central role of EBV in MS. EBV seronegativity in patients with suspected inflammatory central nervous system diseases should alert clinicians to take into account diagnoses other than MS.

2. Einleitung

2.1 Multiple Sklerose: Epidemiologie und Klinik

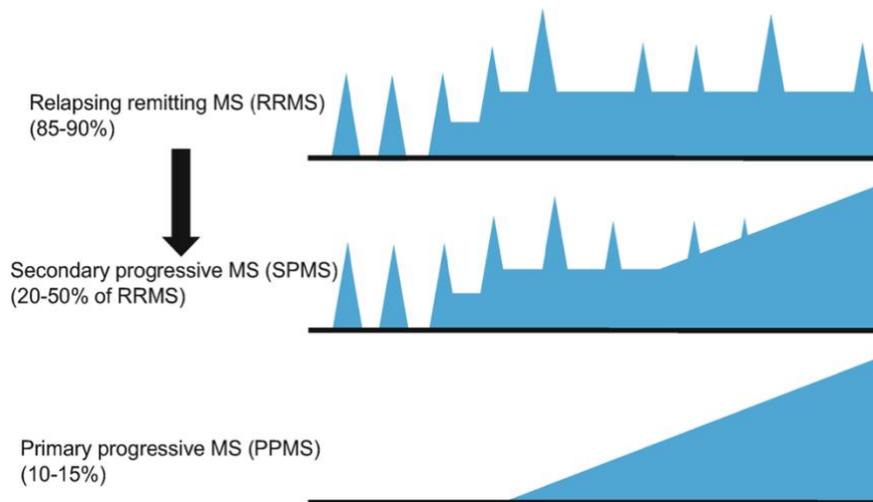
Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die im jüngeren Erwachsenenalter auftritt und zu vorübergehenden, oft aber auch dauerhaften neurologischen Ausfallserscheinungen führt.¹

Man geht davon aus, dass es weltweit ca. 2 Millionen MS-Erkrankte gibt.² Die Erkrankungshäufigkeit der MS nimmt auf der nördlichen Halbkugel mit wachsender Entfernung vom Äquator zu.³ Die Gesamtzahl der Erkrankten in Deutschland wird auf mindestens 120.000 Patienten geschätzt.⁴ Deutschland gehört mit einer Prävalenz von 149 auf 100.000 Einwohner aus globaler Sicht zu Gebieten mit einer hohen MS-Prävalenz. Die Inzidenz der MS liegt in Deutschland bei 2-5 pro 100.000 Einwohnern.⁵

Der Altersgipfel für die Erstmanifestation einer MS liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr mit einer Geschlechterbevorzugung von Frauen (Verhältnis Frauen zu Männer von etwa 2-3 : 1).⁶⁻⁸ Die Erkrankung kann jedoch bereits vor dem 10. Lebensjahr auftreten, ebenso kann sie sich auch bis in die achte Lebensdekade erstmals klinisch manifestieren.⁹

Das klinische Bild der MS ist sehr heterogen und es gibt keine pathognomonischen Symptome für die Erkrankung, weshalb die MS auch als „Krankheit der 1000 Gesichter“ bezeichnet wird. Demyelinisierende Entzündungsherde können an unterschiedlichen Stellen in der weißen Substanz des Gehirns und Rückenmarks auftreten. Dadurch sind die möglichen klinischen Symptome vielfältig und umfassen im frühen Verlauf beispielsweise eine Optikusneuritis, Störungen der Sensibilität, Paresen oder auch eine Hirnstammsymptomatik. Kognitive Einschränkungen, Fatigue und Blasen- und Mastdarmstörung treten hingegen eher im späteren Verlauf auf.¹⁰ Jean Martin Charcot beschrieb als MS-typische Symptom-Trias Intentionstremor, Nystagmus und skandierende Sprache. Die Symptom-Trias nach Marburg-Pette umfasst cerebelläre Ataxie, Pyramidenbahnzeichen sowie Retrobulbärneuritis. Beide sind in dieser Kombination relativ selten und treten allenfalls eher in späteren Krankheitsstadien auf.¹¹

Die MS kann unterschiedliche Verlaufsformen annehmen. Abbildung 1 stellt die typischen Verlaufsformen der MS gemäß der Klassifikation von Lublin und Reingold dar.¹²



Systematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der MS nach Lublin et al. ¹²

(Abbildung aus Kira J., Isobe N. (2019) Multiple Sclerosis¹³)

Klinisch beginnt die MS bei ungefähr 85% der Patienten mit einem schubförmigen Verlauf.¹⁴ Die Schübe bilden sich nach wenigen Tagen bis Wochen meist vollständig zurück. Dieser Verlaufstyp wird als schubförmig-remittierende MS (relapsing-remitting MS, RRMS) bezeichnet. Als Schub bezeichnet man neue klinische Symptome, die länger als 24 Stunden anhalten und wenn die Symptome nicht mit einer Änderung der Körpertemperatur (sog. Uhthoff-Phänomen) oder im Rahmen von Infektionen erklärbar sind.¹⁵

Eine RRMS geht mit längerer Krankheitsdauer oftmals in eine sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform (SPMS) über. Diese Verlaufsform geht mit einer progredienten Verschlechterung mit oder ohne überlagerte Schübe einher. Bei bis zu 90% der Patienten mit einem initial schubförmigen Verlauf kann nach 20 Jahren eine Konversion zur SPMS verzeichnet werden.¹⁶

Beim primär chronisch-progredienten Verlauf (PPMS) kommt es von Beginn an zu einer progredienten Zunahme der neurologischen Funktionsstörungen mit einem Ausbleiben der charakteristischen Schübe. Diese Verlaufsform liegt bei ca. 10-20% der Patienten vor.¹⁷

Als "klinisch isoliertes Syndrom" (KIS) bezeichnet man die erste Manifestation einer schubförmigen MS, also ein erstes Schubereignis, das auf ein entzündlich-demyelinisierendes Geschehen hindeutet.^{18,19}

Die Diagnosestellung einer MS basiert auf den modifizierten McDonald Kriterien aus dem Jahr 2017.²⁰ Gemäß dieser Kriterien erfordert die Diagnosestellung einer MS den klinischen oder kernspintomographischen Nachweis einer zeitlichen (DIS) und räumlichen Dissemination (DIT) von MS-typischen Läsionen. Kernspintomographische räumliche Dissemination bedeutet hierbei einen Nachweis von ≥ 1 hyperintensiven MRT Läsion in zwei der charakteristischen Regionen:

juxtacortical, periventrikulär, infratentoriell oder spinal. Die kernspintomographische zeitliche Dissemination ist als das Neuauftreten einer T2-hyperintensiven Läsion in einem Verlaufs-MRT oder als das gleichzeitige Vorhandensein einer T2-hyperintensiven Läsion und einer asymptomatischen gadolinumanreichernden Läsion definiert.¹⁸

Eine wichtige Rolle bei Diagnosestellung der MS spielt zudem die Liquordiagnostik. Der klassische Liquorbefund bei einer MS ist eine lokale IgG-Synthese im ZNS, die sich in Form von sog. oligoklonalen Banden (OKB) in der isoelektrischen Fokussierung nachweisen lässt. Liquorspezifische OKB finden sich bei bis zu 98% von Patienten mit MS, wobei die Spezifität von OKB für die MS jedoch weniger hoch ist.²¹ Die McDonald Kriterien wurden mehrfach überarbeitet und seit der letzten Revision der Kriterien im Jahr 2017 kann der Nachweis oligoklonaler Banden den kernspintomographischen Nachweis der zeitlichen Dissemination ersetzen.^{20,22}

Außer den OKB kann bei bis zu 80% der Patienten mit MS eine sogenannte „MRZ-Reaktion“ nachgewiesen werden, die spezifischer für die MS als die OKB ist. Hierbei handelt sich um eine intrathekale IgG-Synthese gegen Masern-, Röteln- und Varizella-Zoster-Virus.²³ An diesem Phänomen ist besonders interessant, dass es nicht an eine entsprechende Viruspersistenz gebunden ist.²⁴

2.2 Ätiologie der Multiplen Sklerose

Die genauen Ursachen der MS sind trotz zahlreicher Studien nach wie vor ungeklärt. Die vorliegenden Befunde sprechen jedoch eindeutig dafür, dass die MS auf dem Boden eines komplexen Wechselspiels zwischen Umweltfaktoren und genetischen Faktoren entsteht.^{25–28} So zeigten Studien mit monozygoten Zwillingen, dass das Erkrankungsrisiko für diese bei ungefähr 30% liegt, bei dizygoten Zwillingen jedoch nur bei 3%.¹⁴ Migrationsstudien zeigten, dass Einwanderer, die ihr Geburtsland im frühen Kindesalter verlassen, das Erkrankungsrisiko des neuen Heimatlandes annehmen. Umgekehrt nehmen Einwanderer beim Wechseln des Wohnorts nach der Pubertät das MS-Risiko ihres Geburtslandes mit.^{3,29}

Wie bei vielen Erkrankungen prädisponieren bestimmte genetische Faktoren zu einer MS. In den letzten Jahren sind mit Entwicklung molekulargenetischer Untersuchungstechniken Polymorphismen in verschiedenen immunologisch bedeutsamen Genloci entdeckt worden, welche mit einem erhöhten Risiko an einer MS zu erkranken assoziiert sind. In einer Studie wurden bei über 14.000 Patienten insgesamt 48 unterschiedliche Genloci entdeckt, die das Risiko für die Entstehung einer MS erhöhen.³⁰ Der stärkste genetische Risikofaktor für die MS

ist das HLA Klasse II Allel HLA-DRB1*15:01.²¹

Mit Hinblick auf Umweltfaktoren, die zur Entstehung der MS beitragen, erscheinen insbesondere 3 von besonderer Relevanz: Vitamin-D-Mangel, regelmäßiges Rauchen und eine Infektion mit dem EBV.^{31–34}

In den vergangenen Jahren wurde der mögliche Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D-Spiegeln und MS intensiv untersucht. Eine aktuelle Metanalyse aus dem Jahr 2014 zeigte, dass Patienten mit MS signifikant niedrigere Vitamin D Spiegel haben als gesunde Probanden.³⁵ Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass ein Vitamin D-Mangel mit erhöhter Krankheitsaktivität bzw. einer schnelleren Progression einer MS einhergehen kann.^{36–38}

Ein weiterer Faktor, welcher das Erkrankungsrisiko für eine MS um das 1,5-fache steigert, ist regelmäßiges Rauchen.²³ Als Risikofaktor für eine MS Erkrankung wurde sowohl Passiv- als auch Aktiv-Rauchen nachgewiesen.^{39,40} In einer Studie von Healy et al. wurde gezeigt, dass Raucher mit MS einen signifikant schlechteren EDSS-Wert (Expanded Disability Status Scale) und einen höheren Anteil an PPMS hatten. Die EDSS-Skala wird zur Einstufung der neurologischen Behinderung von Menschen mit MS verwendet. Es werden acht Funktionssysteme untersucht (u.a. Pyramidenbahn, Kleinhirn, Visus, Hirnstamm usw.) und jeweils von 0 (normal) bis 6 (maximal Beeinträchtigung) bewertet. Die Skala umfasst Werte von 0 (keine Beeinträchtigung) bis 10 (Tod durch MS).⁴¹ Es wurde auch gezeigt, dass bei Rauchern die Zeit vom Übergang einer RRMS in eine SPMS im Mittel kürzer war. Außerdem konnte bei Rauchern eine höhere T2-Läsionslast nachgewiesen werden.⁴²

Der wichtigste und stärkste derzeit bekannte externe Risikofaktor für die Entwicklung einer MS ist jedoch eine Infektion mit dem EBV.⁴³

2.3 Epstein Barr Virus

Das EBV wurde erstmalig 1964 von M. Epstein, B.G. Achong und Y.M. Barr beschrieben.⁴⁴ Das EBV ist ein B-lymphozytotropes Virus und gehört zu der Familie der γ -Herpesviren. Wie andere Herpesviren, hat EBV ein lineares DNA-Genom, umgeben von einem Proteinkapsid.⁴⁴ Zwischen Virushülle und dem Kapsid ist das Proteintegumentum. Von besonderer Wichtigkeit für die Rezeptorerkennung und den Zelltropismus des EBV sind die, in der Hülle befindlichen, Glykoprotein-Spikes. Dort bildet gp350/220 das Hauptglykoprotein.⁴⁵

Der Hauptübertragungsweg von EBV ist oral durch Speichel.⁴⁶ Das Virus gelangt über den Speichel in das lymphatische Gewebe des Nasopharynx, wo es zunächst hauptsächlich Lymphozyten und Epithelzellen infiziert.⁴⁷ ⁴⁵ Trotz zahlreicher Untersuchungen ist es bis jetzt

unklar, ob das Virus erst nach der primären Epithelzellinfektion sekundär B-Lymphozyten befällt oder ob es in vivo in der Lage ist, direkt B-Zellen zu infizieren.^{48 49 50}

Durch die Interaktion zwischen dem gp350 Protein auf der Virushülle und dem CD21 Zelloberflächenprotein auf naiven B-Zellen gelangt das Virus in seine Wirtszelle. Nach der Fusion von Virushülle und Plasmamembran und Internalisation durch Endozytose in zytoplasmatische Vesikel kommt es zur Freisetzung des Nukleoidkapsids und des Proteinteguments in das Zytoplasma des Wirts.⁵¹ Die primäre EBV-Infektion mündet in eine anschließende, lebenslang persistierende latente Infektion von B-Zellen im menschlichen Organismus (latente Phase). In der sogenannten lytischen Phase der Infektion kommt es in der Wirtszelle zur Produktion und Freisetzung infektiöser Viren.⁵²

Bei der lytischen Phase werden sehr frühe (immediate early, IE), frühe (early, E) und späte (late, L) EBV-Gene unterschieden. Einzige bekannte IE-Proteine, die die lytische EBV-Replikation initiieren, sind BZLF1 und BRLF1.⁵³ Die frühen Produkte der Replikation – wie beispielweise BNLF2a – übernehmen u.a. die Blockade der Antigenprozessierung. Spätere Gene enthalten Informationen über die Strukturproteine wie die viralen Kapsidantigene (VCA). In den naiven B-Zellen wird durch die EBV-Primärinfektion das Wachstumsprogramm aktiviert, welches zur Differenzierung in Gedächtnis-B-Zellen (memory B Zellen) führt.⁵⁴

Als latente Phase wird eine persistierende Virusinfektion ohne aktive Virusproduktion bezeichnet. In latent infizierten B-Zellen werden bis auf eine Expression des EBNA-1 Proteins bei der Zellteilung keine viralen Proteine exprimiert, so dass latent mit EBV infizierte B-Zellen vom Immunsystem nicht erkannt werden.⁵⁵ Über 90 % der Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert und ab dem 40. Lebensjahr zeigen je nach Region bis zu 98% eine Seropositivität für dieses Virus.⁵⁶

2.4. Multiple Sklerose und Epstein-Barr Virus

Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahrzehnte zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und der MS. In zahlreichen seroepidemiologischen Studien von Patienten mit MS und Kontrollen konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass praktisch alle Patienten mit MS (~99%) EBV-seropositiv sind, wohingegen sich bei Kontrollen eine EBV Seroprävalenz von ca. 94% fand.^{31,57}

Die Ansteckung mit EBV erfolgt üblicherweise bereits im Kleinkindalter und verläuft klinisch meist asymptomatisch.⁵⁸ Eine EBV-Erstinfektion in Jugend- oder Erwachsenenalter manifestiert sich dagegen in bis zu 40% der Fälle mit einer Symptomtrias aus Pharyngitis, Fieber und

Lymphadenopathie, also dem klinischen Bild einer infektiösen Mononukleose.⁵⁹⁻⁶² In zahlreichen Studien konnte zweifelsfrei bestätigt werden, dass die symptomatische EBV-Erstinfektion mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer MS einhergeht und selbiges für 30 oder mehr Jahre nach einer symptomatischen EBV-Erstinfektion persistiert. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass nach einer durchgemachten symptomatischen EBV-Erstinfektion eine bleibende Veränderung entsteht, die das Risiko für die Entwicklung einer MS dauerhaft erhöht.^{63,64}

Es gibt mehrere Studien, die dafür sprechen, dass schon vor dem Ausbruch einer MS vermehrt Antikörper gegen Proteine des EBV vorliegen. Aus prospektiven Studien weiß man, dass bei erwachsenen Patienten mit MS, schon bis zu 10 Jahre vor ihrer klinischen Erstmanifestation, erhöhte Antikörpertiter gegen den Epstein-Barr nuclear antigen complex (EBNAc) und das Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA-1) nachweisbar sind. Zudem steigt das Entwicklungsrisiko einer MS in Abhängigkeit von der Höhe der Antikörper.^{26,65,66} Eine schwedische Studie an erwachsenen Patienten mit MS zeigte, dass EBNA1-Antikörper fünf oder mehr Jahre vor Beginn der MS im Vergleich zu Kontrollpersonen, die keine MS entwickelten, erhöht waren.⁶⁷ DeLorenze et al. konnten ebenfalls erhöhte EBNA1-Antikörper schon bis zu 30 Jahre vor Ausbruch einer MS feststellen.⁶⁵

3. Fragestellungen und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die seroepidemiologischen Daten zu EBV bei der MS sprechen eindeutig dafür, dass das Risiko für die Entwicklung einer MS bei EBV-seronegativen Personen extrem gering ist.⁴³ Die Assoziation einer EBV-Infektion mit der MS ist derartig stark, dass eine EBV-Infektion als eine notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung zur Entwicklung einer MS angesehen werden kann.^{57,67,68}

Hieraus ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

- I. Handelt es sich bei den wenigen in den bisherigen seroepidemiologischen Untersuchungen berichteten EBV-seronegativen Patienten mit MS möglicherweise um Patienten mit falsch-negativen EBV-Serologien?
- II. Handelt es sich bei den wenigen in seroepidemiologischen Untersuchungen identifizierten EBV-seronegativen Patienten mit der Diagnose einer MS möglicherweise um Patienten die gar keine MS haben?

III. Stellt eine negative EBV-Serologie somit einen Marker zum Ausschluss einer MS bei Patienten mit dem V.a. eine entzündliche ZNS-Erkrankung/MS dar?

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, innerhalb von Patientinnen und Patienten aus der nationalen MS-Kohorte des Krankheitsbezogenen Kompetenznetzes Multiple Sklerose (KKNMS) EBV-seronegative Personen mit der Diagnose einer MS zu identifizieren, um anschließend deren klinische und paraklinische Befunde mit Hinblick auf das Vorliegen einer MS zu überprüfen.

4. Patienten und Methodik

Zur Bearbeitung der Fragestellungen erhielten wir nach positiver Begutachtung durch den Fachausschuss für Biomaterialverwertung (FaBio), 901 Serumproben von Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (KIS) oder schubförmiger MS (RRMS) vom Krankheitsbezogenen Kompetenznetzwerk MS (KKNMS).

Die deutsche nationale MS-Kohorte ist eine multizentrische prospektive longitudinale Beobachtungskohorte, die zwischen August 2010 und Dezember 2014 insgesamt 1.212 Patienten rekrutierte.

Die Einschlusskriterien für eine Aufnahme in die KKNMS-Kohorte waren wie folgt:

- Patienten beider Geschlechter im Alter ≥ 18 Jahre
- Diagnose eines KIS, die in den letzten 6 Monaten vor der Aufnahme gestellt wurde und Erfüllung von 3 von 4 Barkhof-Kriterien ODER
- Diagnose eines KIS, die in den letzten 6 Monaten vor der Aufnahme gestellt wurde und Erfüllung von 2 von 4 Barkhof-Kriterien in Kombination mit entweder auffälligen visuell evozierten Potentialen oder Nachweis einer intrathekalen IgG-Produktion im Liquor
- Diagnose eines KIS, die in den letzten 6 Monaten vor der Aufnahme gestellt wurde und Erfüllung von 3 von 4 Barkhof-Kriterien in Kombination mit den McDonald 2010 Kriterien für RRMS
- Diagnose einer RRMS basierend auf den McDonald 2005-Kriterien innerhalb von 2 Jahren vor Aufnahme

Die Ausschlusskriterien für eine Aufnahme in die KKNMS-Kohorte waren wie folgt:

- primär oder sekundär progrediente MS
- Eine bereits eingeleitete krankheitsmodifizierende MS-Therapie, mit Ausnahme einer Schubtherapie mit intravenösem Kortison
- Sämtliche Umstände (z.B. Kontraindikationen für MRT), die Untersuchungen im Rahmen der Kohorte beeinträchtigen könnten
- Zusätzliche progrediente neurologische Erkrankungen

Im Rahmen der KKNMS Kohorte werden demographische und klinische Daten der Patienten erfasst. Zudem wird in einer klinisch neurologischen Untersuchung der EDSS-Score erhoben und es erfolgt eine Blutabnahme mit anschließender Gewinnung von Serum.⁶⁹

Die Seren von therapie-naiven Patienten wurden bei -80°C in der Abteilung für Neurologie der Technischen Universität München gelagert, nachdem sie zuvor bei den Baseline-Visiten in den teilnehmenden Zentren gesammelt und auf Trockeneis an die Technische Universität München geschickt wurden. Anschließend wurden 901 Baseline-Serumproben auf Trockeneis an die Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin zur EBV-Antikörperbestimmung verschickt. Drei zuvor identifizierte EBV-seronegative Seren von gesunden Kontrollen, die ebenfalls bei -80°C gelagert wurden, wurden ebenfalls analysiert.⁷⁰

4.1 EBV-Antikörperbestimmung

Der Liaison® (DiaSorin, Saluggia, Italien) automatisierte quantitative Chemiluminescence immunoassay (CLIA) wurde zur Messung von Serum-IgG-Antikörpern gegen das Epstein-Barr nukleäre Antigen-1 (EBNA-1) und gegen das EBV viral capsid antigen (VCA) bei der Labor Berlin GmbH, Berlin, Deutschland, eingesetzt. Die Seren der Patienten mussten verdünnt werden, da nur begrenzte Mengen an Serum für die Antikörperbestimmung zugänglich waren.

So wurden die Serumproben entweder 1:20 (n = 40) oder 1:10 (n = 861) in Assay-Verdünnungspuffer verdünnt, um EBNA-1-IgG-Antikörper zu messen. Dementsprechend wurde als negativ ein EBNA-1-IgG Wert <3 U/ml und als positiv ein EBNA-1-IgG Wert \geq 3 U/ml angesehen.

In allen EBNA-1-IgG-negativen Proben bestimmten wir Antikörper gegen VCA in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10. Hier sahen wir einen VCA-IgG Wert <10 U/ml als negativ und \geq 10 U/ml als positiv an. Laut des Herstellers gelten für das EBNA-1 IgG CLIA ein Testbereich

von 3 bis 600 U/ml und beim VCA IgG CLIA 10 bis 750 U/ml. EBNA-1- und VCA-IgG Antikörper-negative Seren gelten gemeinhin als EBV-seronegativ. Zum sicheren Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wurden EBNA-1- und VCA-IgG Antikörper negativ getestete Seren zusätzlich unverdünnt mittels einem EBV-IgG-Immunoblot (recomLine EBV IgG, Mikrogen, Deutschland) getestet. Anschließend galten die Serumproben als EBV-seronegativ, wenn IgG-Antikörper gegen EBNA-1, VCA und im EBV-IgG-Immunoblot negativ waren.

Als EBV-seropositiv sahen wir demgegenüber Serumproben mit mindestens einem positiven Befund in den drei Testungen (EBNA-1-IgG, VCA-IgG, EBV-IgG-Immunoblot) an. Die Bestimmung der EBV-Antikörper erfolgte in Zusammenarbeit mit der Labor Berlin GmbH.

4.2 Retrospektive Analyse der Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus in Routinelaboreinsendungen

Zu Vergleichszwecken wurden von 16.163 Patienten die EBV-Serologien aus routinediagnostischen Einsendungen an das Labor Berlin im Zeitraum von Januar 2014 bis Dezember 2016 analysiert. Die Proben stammten von Patienten, die stationär oder ambulant an den Kliniken der Charité oder kommunalen Krankenhäusern in Berlin und Norddeutschland behandelt wurden. Die 16.163 Patienten wurden dabei unabhängig von der Diagnose oder dem Anlass für eine EBV-Diagnostik eingeschlossen. Bei im Studienzeitraum mehrfach getesteten Patienten verwendeten wir ausschließlich die Ergebnisse der ersten durchgeführten EBV-Serologie. Als Voraussetzung für die Verwendung der Daten war das Vorhandensein von Ergebnissen für EBNA-1-IgG, VCA-IgM und VCA-IgG. Im Rahmen der Routinediagnostik wurden die Seren unverdünnt auf EBNA-1-IgG, VCA-IgM und VCA-IgG mittels automatisiertem quantitativem CLIA (Liaison®) getestet. Laut Herstellerhinweis galten in unverdünnten Seren EBNA-1 IgG-Werte <5 U/ml als negativ, Werte zwischen 5 - 20 U/ml als Grauzone und Werte ≥ 20 U/ml als positiv; VCA IgG-Werte <20 U/ml als negativ und VCA IgG-Werte ≥ 20 U/ml als positiv; und VCA IgM- Werte <20 U/ml als negativ, Werte zwischen 20 - 40 U/ml als Grauzone und VCA-IgM-Werte ≥ 40 U/ml als positiv. Seren, bei denen mindestens einer der drei Antikörper (EBNA-1-IgG, VCA-IgG, VCA-IgM) über den jeweiligen cut-offs lag, wurden als EBV-seropositiv betrachtet. Seren mit EBNA-1-IgG, VCA-IgG und VCA-IgM unterhalb der jeweiligen cut-offs wurden als EBV-seronegativ eingestuft. Ab einem Alter von 5 Jahren gruppierten wir die Patienten aus der Krankenhauskohorte in 5-Jahres-Alterskohorten, z. B. Personen >5 bis ≤ 10 Jahre, >10 bis ≤ 15 Jahre usw.. Neugeborene und Kleinkinder unter 5

Jahren wurden in engeren Altersintervallen erfasst, um die EBV-Seroprävalenz im frühen Lebensalter genauer zu analysieren.

4.3 Statistische Auswertung

Kontinuierliche Daten wurden durch Angabe des Medians und der Interquartilsbereiche (IQR) zusammengefasst wohingegen kategorische Daten als absolute und relative Häufigkeiten (%) angegeben wurden. Durch die Verwendung des zweiseitigen exakten Fisher-Tests (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2/>) wurde die Signifikanz der unterschiedlichen EBV-Seropositivitätsraten zwischen Patienten mit früher MS und Personen in der Krankenhauspopulation bewertet. Dabei wurde ein p-Wert $<0,05$ als signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Epstein-Barr-Virus-Seroprävalenz bei früher Multipler Sklerose

Das mediane (IQR) Alter der 901 in diese Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten betrug 33 (27 - 41) Jahre. 630 der 901 (69,9%) untersuchten Patientinnen und Patienten waren weiblich. Gemäß der Einschlusskriterien der nationalen MS-Kohorte lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei 380 (42,2%) Patienten ein KIS und bei 521 (57,8%) eine RRMS vor. Der mediane (IQR) EDSS beider Gruppen (KIS und RRMS) betrug dabei 1,5 (1,0 - 2,0; Daten verfügbar von n = 899 Patienten).

IgG-Antikörper gegen EBNA-1 waren bei 839 von 901 (93,1%) der Patientinnen und Patienten mit KIS oder RRMS nachweisbar. Bei 45 der 62 (72,6%) EBNA-1-seronegativen Seren waren IgG-Antikörper gegen VCA nachweisbar. In allen verbleibenden 17 Patienten konnten wir mittels EBV-IgG-Immunoblots Antikörper gegen EBV nachweisen. Insgesamt waren also 901/901 (100%) der in dieser Studie untersuchten Patienten mit KIS/RRMS EBV-seropositiv.

5.2 Epstein-Barr-Virus-Seroprävalenz in einer großen Krankenhauspopulation

Um die EBV-Seroprävalenz bei Patienten mit früher MS mit der EBV-Seroprävalenz bei nicht an einer MS Erkrankten in einer ähnlichen geographischen Region vergleichen zu können, analysierten wir retrospektiv die EBV-Seroprävalenz über verschiedene Altersgruppen in einer

großen Krankenhauspopulation (n = 16.163) aus Berlin/Norddeutschland. Daten zum Geschlecht waren von 16.036 dieser Personen verfügbar, von denen 7714 weiblich und 8322 männlich waren. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 1 zusammengefasst und in Abbildung 1 grafisch dargestellt.

Höchstwahrscheinlich aufgrund von mütterlichen Antikörpern fanden wir eine hohe Prävalenz von EBV-Antikörpern (91,7%) bei Neugeborenen $\leq 0,25$ Jahre. Danach fiel die EBV-Seropositivität bei 9 - 12 Monate alten Kindern auf 18,4% ab. In der Folge stieg die EBV-Seropositivität bis ins Erwachsenenalter an, mit den stärksten Anstiegen in den Alterskohorten von 18 - 23 Monaten (EBV-Seropositivität 45,7%) und 15 - 19 Jahren (EBV-Seropositivität 84,3%). In diesen Alterskohorten fanden sich dementsprechend ebenfalls vermehrt VCA-IgM-Antikörper, welche einen Marker für eine primäre EBV-Infektion darstellen. Die EBV-Seroprävalenz stieg mit zunehmendem Alter weiter an und erreichte in allen 5-Jahres-Alterskohorten von 45 bis 80 Jahren Werte $\geq 98\%$, nie jedoch 100% (Abbildung 1A). Frauen waren insgesamt etwas häufiger EBV-seropositiv als Männer, wobei die Verläufe der Seropositivität über unterschiedliche Lebensalter bei Frauen und Männern ähnlich waren (Abbildung 1B).

Als Negativkontrollen untersuchten wir drei Seren von gesunden Kontrollen in denen zuvor mittels CLIA Untersuchung keine Antikörper gegen EBNA-1 und VCA nachgewiesen werden konnten.⁷⁰ Diese drei Seren waren in einer aktuellen Untersuchung mittels EBV-IgG-Immunoblot ebenfalls negativ für Antikörper gegen EBV.

Tabelle 1

Seropositivität für IgG-Antikörper gegen Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 (EBNA-1), IgG-Antikörper gegen EBV-Viral-Capsid-Antigen (VCA) und IgM-Antikörper gegen VCA in verschiedenen Alterskohorten in einer großen Krankenhauspopulation

Alterskohorte (Jahre)	EBV-Seropositivität^a (%)	EBNA1-IgG positiv (%)	VCA-IgM positiv (%)	VCA-IgG positiv (%)	untersuchte Personen^b (Anzahl)	Alle negativ^c (Anzahl)	Mindestens ein Antikörper positiv^d (Anzahl)
≤0.25	91.67	73.33	0.00	76.67	60	5	55
>0.25 – ≤0.5	61.54	38.46	2.56	46.15	39	15	24
>0.5 – ≤0.75	26.83	17.07	2.44	21.95	41	30	11
>0.75 – ≤1	18.37	8.16	4.08	10.20	49	40	9
>1 – ≤1.5	21.49	7.44	7.44	17.36	121	95	26
>1.5 – ≤2	45.65	23.19	13.77	39.13	138	75	63
>2 – ≤5	57.79	36.59	12.86	54.53	552	233	319
>5 – ≤10	67.94	46.62	10.23	65.34	577	185	392
>10 – ≤15	70.93	55.90	9.41	66.99	712	207	505

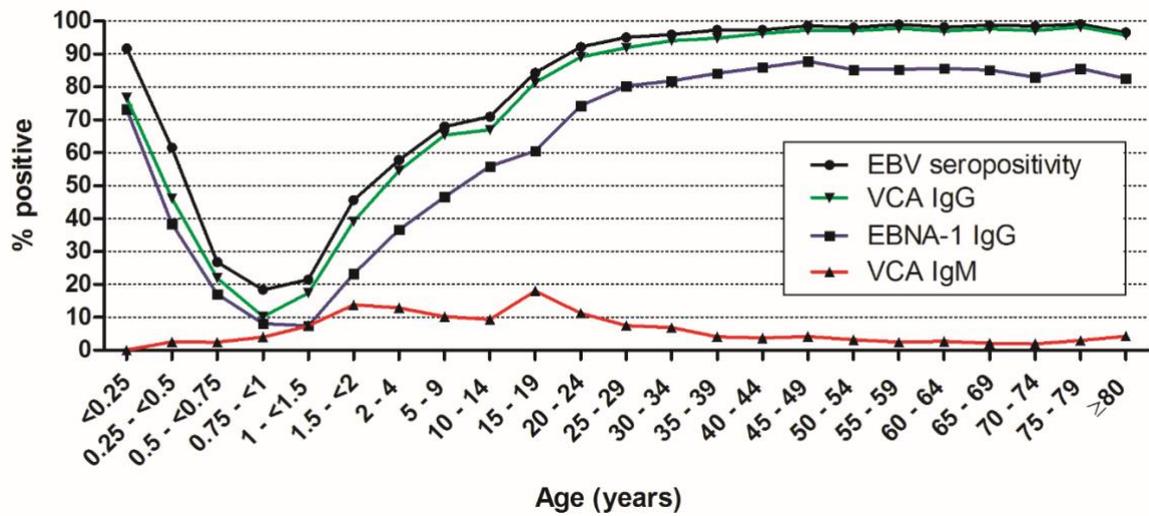
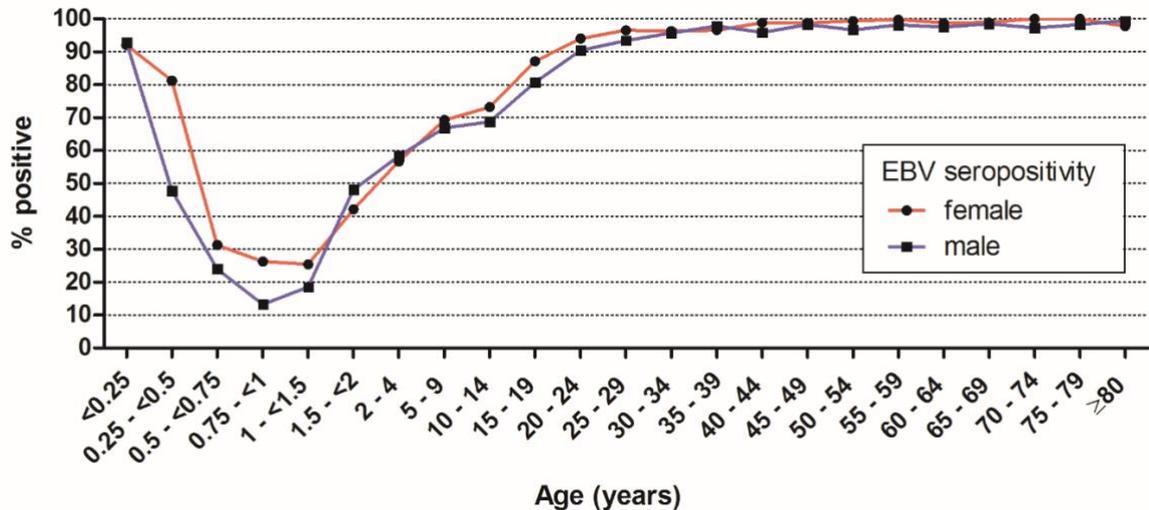
>15 – ≤20	84.26	60.50	18.02	81.29	1010	159	851
>20 – ≤25	92.15	74.30	11.29	89.03	930	73	857
>25 – ≤30	95.00	80.27	7.58	91.84	1201	60	1141
>30 – ≤35	95.91	81.76	6.91	94.03	1173	48	1125
>35 – ≤40	97.31	84.12	4.14	94.80	1039	28	1011
>40 – ≤45	97.31	85.94	3.72	96.17	967	26	941
>45 – ≤50	98.51	87.83	4.22	97.19	1208	18	1190
>50 – ≤55	98.00	85.18	3.22	97.07	1397	28	1369
>55 – ≤60	98.96	85.30	2.49	97.75	1245	13	1232
>60 – ≤65	98.14	85.59	2.70	96.93	1076	20	1056
>65 – ≤70	98.70	85.16	2.12	97.64	849	11	838
>70 – ≤75	98.44	82.99	1.95	97.14	770	12	758
>75 – ≤80	99.08	85.50	2.94	98.17	545	5	540
>80	96.55	82.54	4.31	95.69	464	16	448

^aSeropositivität für EBV wurde als Seropositivität für mindestens einen der drei Antikörper EBNA-1-IgG, VCA-IgG oder VCA-IgM definiert.

^bAnzahl der für die Analyse verfügbaren Personen in den verschiedenen Alterskohorten.

^cAnzahl der Personen, bei denen EBNA-1 IgG und VCA IgG und VCA IgM negativ waren.

^dAnzahl der Personen, bei denen mindestens einer der drei untersuchten Antikörper (EBNA-1 IgG, VCA IgG, VCA IgM) positiv war

A**B**

(Abbildung aus Abrahamyan S., Ruprecht K. et al.⁷¹)

Außerdem verglichen wir die EBV-Seropositivitätsraten für alle Patienten im Alter von 20-40 Jahren der Untersuchungsgruppe - also dem typischen klinischen Erstmanifestationsalter für eine MS¹ - mit denen von Personen im Alter von 20-40 Jahren aus der Kontrollgruppe. Es ergab sich ein hochsignifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zwischen der 100-prozentigen EBV-Seropositivität bei den 610 Patienten mit MS und der EBV-Seropositivität innerhalb der Krankenhauspopulation im Alter von 20 bis 40 Jahren (4134/4343; 95,2%).

6. Diskussion

Auch wenn die Ätiologie der MS bislang nicht exakt geklärt ist existieren starke Hinweise dafür, dass das EBV eine zentrale Rolle in der Entstehung der MS spielt. Sollte eine EBV-Infektion tatsächlich eine Voraussetzung für die Entwicklung einer MS sein, wäre zu erwarten, dass es keine EBV-seronegativen Patienten mit MS gibt. In diesem Zusammenhang ist das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchung die komplette Abwesenheit von EBV-seronegativen Patienten in einer großen Kohorte (n = 901) von Patienten mit früher MS.

Eine Erklärung für die hier beobachtete 100%-ige EBV-Seropositivität bei Patienten mit früher MS könnten die sehr strengen Einschlusskriterien in die nationale MS-Kohorte des KKMNS (s.o.) sein. Die Wahrscheinlichkeit für die fälschliche Aufnahme von Patienten, die möglicherweise keine MS haben, in die KKMNS Kohorte ist damit sehr gering. Unsere Ergebnisse sprechen somit dafür, dass bei Patienten mit einer gesicherten Diagnose einer frühen MS die EBV Seroprävalenz tatsächlich 100% beträgt.

Antikörper gegen EBNA-1 und VCA mussten in verdünnten Seren mittels CLIA gemessen werden. Die Seren von 17 EBNA-1- und VCA-Antikörper-negativen Patienten wurden daraufhin erneut unverdünnt mit einem EBV-IgG-Immunoblot getestet und bei allen 17 Antikörper gegen EBV nachgewiesen. Hieraus lässt sich schließen, dass die Sensitivität für den Nachweis von EBV-Antikörpern des EBV-Immunoblots in unverdünnten Seren höher ist, als die des CLIA in verdünnten Seren wobei jedoch zu vermuten ist, dass eine Testung unverdünnter Seren EBNA-1 und VCA-AK auch mittels CLIA nachweisen würde.

Die von uns ermittelten Ergebnisse passen zu denen einer aktuellen Studie von Dobson et al.. In dieser Studie wurden 41 scheinbar EBV-seronegative (durch ELISA bestimmt) Patienten aus einer Kohorte von 1.047 Patienten mit einem KIS erneut mit sensitiveren Methoden (in house-ELISA und EBV-Immunoblot) auf EBV-Antikörper untersucht. Hierbei fand sich lediglich ein einziger EBV-seronegativer Patient unter 1.047 Patienten mit einem KIS.⁷²

Sowohl die Ergebnisse unserer als auch der Arbeit von Dobson et al. deuten darauf hin, dass Patienten mit MS entweder gar nicht, oder nur sehr selten seronegativ für EBV sind. Dies unterstützt einerseits die Annahme, dass die MS eine seltene Spätkomplikation einer EBV-

Infektion darstellt⁷³, andererseits ergibt sich als eine relevante Konsequenz für die klinische Praxis, dass bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer entzündlichen ZNS-Erkrankung eine negative EBV Serologie gegen das Vorliegen einer MS spricht.^{34,74,75}

Mögliche einflüsse auf die EBV-Antikörperserologien der von uns untersuchten Proben durch Immuntherapien können ausgeschlossen werden, nachdem kein Patient mit früher MS zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine krankheitsmodifizierende Therapie erhielt.

In der Krankenhauspopulation (Kontrollgruppe) wurde die EBV-Seroprävalenz unverdünnt mittels CLIA gemessen. Die Abwesenheit von EBV-Antikörpern in unverdünnten Proben wird in der klinischen Routinediagnostik als zuverlässiger Indikator für EBV-Seronegativität gewertet und wird nicht routinemäßig anhand alternativer Methoden überprüft. Insofern ist es als eine Einschränkung dieser Untersuchung zu betrachten, dass EBV-seronegative unverdünnte Seren in der Krankenhauspopulation nicht erneut mittels EBV-IgG-Immunoblot nachgetestet wurden. Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass in einigen der EBV-seronegativen, unverdünnten Seren EBV-Antikörper mittels EBV-IgG-Immunoblot nachweisbar gewesen sein könnten. Allerdings wurden in 3 Seren, die bei unverdünnter Testung mittels CLIA negativ für EBNA-1- und VCA-IgG waren, auch mittels EBV-IgG-Immunoblot keine EBV-Antikörper nachgewiesen, sodass für den EBV-Immunoblot im Vergleich zu den Messungen durch CLIA keine signifikant höhere Sensitivität angenommen werden muss.

Mit Hinblick auf die EBV-Seroprävalenzen in der Krankenhauspopulation (Kontrollgruppe) ist die hohe EBV-Seropositivität bei Neugeborenen und der schnelle Rückgang derselben bis zum Alter von 0,75 bis 1 Jahr durch einen transplazentaren Übertragung und dem anschließenden Rückgang von mütterlichen EBV-Antikörpern erklärbar. Der steile Anstieg der EBV-Seropositivität bis zum Alter von 2 Jahren sowie ein weiterer Anstieg in der Altersgruppe der 15 bis 20 Jährigen entspricht den bisherigen Daten zum natürlichen Verlauf einer EBV-Infektion in der westlichen Welt.⁷⁶⁻⁷⁸ Besonders wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass im Alter von 14 Jahren etwa 30% der von uns untersuchten Seren der Krankenhauspopulation noch EBV-negativ waren. Diese Personengruppe ist bekanntermaßen besonders anfällig für die Entwicklung einer primären EBV-Infektion im Sinne einer infektiösen Mononukleose und diese ist wiederum mit einem etwa zweifach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer MS verbunden

⁷⁹

In unserer Studie zeigten alle 380 Patienten mit einem KIS – der frühesten klinischen Manifestation einer MS – eine 100%-ige EBV-Seropositivität. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass eine EBV-Infektion dem klinischen Ausbruch einer MS vorausgeht und dass EBV somit sehr frühe Rolle in der Entwicklung einer MS spielt.⁸⁰

Die niedrigere EBV-Seropositivitätsrate (95,2%) bei Personen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (dem typischen Alter einer klinischen Erstmanifestation einer MS¹) in der Krankenhauspopulation im Vergleich mit der EBV-Seropositivitätsrate bei Patienten mit früher MS (100%) spricht zusätzlich für die Assoziation einer EBV-Infektion mit der MS.

Eine mögliche Limitation unserer Studie besteht darin, dass die EBV-Seroprävalenz in einer Krankenhauspopulation und nicht in der Allgemeinbevölkerung bestimmt wurde.⁷⁸ Es ist daher nicht auszuschließen, dass in der Krankenhauspopulation Personen die aufgrund eines klinischen Verdachtes auf eine EBV-Infektion getestet wurden überrepräsentiert sind, was zu falsch hohen EBV-Seropositivitätsraten führen könnte. Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in der Krankenhauspopulation immunsupprimierte Personen befanden, bei denen die EBV-Serologien falsch negativ ausgefallen sein könnten. Angesichts der sehr hohen Fallzahl betrachten wir die aus dieser Krankenhauspopulation erhaltenen Daten jedoch als weitestgehend repräsentativ für die EBV-Seropositivitätsraten in verschiedenen Altersgruppen der Allgemeinbevölkerung.

Letztlich lässt sich, wie bei jedem serologischen Test, auch ein gelegentliches Auftreten falsch-positiver Ergebnisse nicht vollständig ausschließen. Allerdings spricht die gute Übereinstimmung zwischen unseren und den Ergebnissen früherer Studien zur EBV-Seroprävalenz bei der MS gegen eine systematische Verzerrung aufgrund falsch positiver Befunde.^{31,57,70,72,81,82}

Zusammenfassend liefert das Fehlen einer EBV-Seronegativität in dieser großen Kohorte von Patienten mit früher MS weitere Hinweise auf eine zentrale Rolle von EBV bei der MS. Als Konsequenz für die klinische Praxis legen die Ergebnisse dieser Studie zudem nahe, dass eine negative EBV-Serologie bei Patienten mit Verdacht auf eine entzündliche ZNS-Erkrankung Anlass dazu geben sollte, andere Diagnosen als eine MS in Betracht zu ziehen. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die MS eine seltene Komplikation einer EBV

Infektionen darstellen könnte. Zukünftige Studien sollten versuchen zu klären durch welche molekularen Mechanismen EBV eine Rolle bei der MS spielt.

7. Literaturverzeichnis

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-1231. doi:10.1016/S0140-6736(02)08220-X
2. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor B V, Thompson AJ. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83(11):1022-1024. doi:10.1212/WNL.0000000000000768
3. Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci Le J Can des Sci Neurol*. 1993;20(1):17-29. doi:10.1017/s0317167100047351
4. Hein T, Hopfenmüller W. Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt*. 2012;71:288-294. doi:10.1007/s001150050559
5. Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J Neurovirol*. 2000;6 Suppl 2:S134-40.
6. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD. Epstein-Barr Virus Infection and Antibody Synthesis in Patients With Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 1983;40(7):406-408. doi:10.1001/archneur.1983.04050070036006
7. Duquette P, Murray TJ, Pleines J, Ebers GC, Sadovnick D, Weldon P, Warren S, Paty DW, Upton A, Hader W, Nelson R, Auty A, Neufeld B, Meltzer C. Multiple sclerosis in childhood: Clinical profile in 125 patients. *J Pediatr*. 1987;111(3):359-363. doi:https://doi.org/10.1016/S0022-3476(87)80454-7
8. Kurtzke JF. Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? Lectio Doctoralis. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2000;21(6):383-403. doi:10.1007/s100720070055
9. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006;129(3):606-616. doi:10.1093/brain/awl007
10. Richards RG, Sampson FC, Beard SM, Tappenden P. A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis: implications for resource allocation and health economic models. *Health Technol Assess*. 2002;6(10):1-73. doi:10.3310/hta6100
11. Fröscher W, von Albert HH. *Neurologie Mit Repetitorium*. De Gruyter; 2011. <https://books.google.de/books?id=l0ysPohqlr8C>
12. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-911. doi:10.1212/wnl.46.4.907

13. Kira J, Isobe N. Multiple Sclerosis BT - Neuroimmune Diseases: From Cells to the Living Brain. In: Mitoma H, Manto M, eds. Springer International Publishing; 2019:487-521. doi:10.1007/978-3-030-19515-1_15
14. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9648):1502-1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7
15. Wiendl H, Kieseier BC, Brandt T, Hohlfeld R, Noth J, Reichmann H. *Multiple Sklerose: Klinik, Diagnostik Und Therapie*. Kohlhammer Verlag; 2010.
<https://books.google.de/books?id=lfZ3DwAAQBAJ>
16. Trojano M, Paolicelli D, Bellacosa A, Cataldo S. The transition from relapsing-remitting MS to irreversible disability: clinical evaluation. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2003;24 Suppl 5:S268-70. doi:10.1007/s10072-003-0171-6
17. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, Montalban X, De Sá J. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120 (Pt 6):1085-1096. doi:10.1093/brain/120.6.1085
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302. doi:10.1002/ana.22366
19. Söllner. DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS. Published online 2014:4-9. http://www.kompetenznetz-multiplesklerose.de/wp-content/uploads/2016/02/dgn-kknms_ms-ll_20140813.pdf
20. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
21. Poeck K, Hacke W, eds. Multiple Sklerose BT - Neurologie. In: Springer Berlin Heidelberg; 2006:489-508. doi:10.1007/3-540-29998-X_22
22. Hemmer B. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis Optica Spektrum und MOG-IgG- assoziierte Erkrankungen. 2020;(030).
<https://dgn.org/neuronews/neuronews/konsultationsfassung-der-s2k-leitlinie-diagnose->

und-therapie-der-multiplen-sklerose/

23. Wildemann B, Diem R. Multiple Sklerose und andere immunvermittelte Enzephalopathien BT - Neurologie. In: Hacke W, ed. Springer Berlin Heidelberg; 2016:559-585. doi:10.1007/978-3-662-46892-0_23
24. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in Multiple Sclerosis. *J Neurol*. 2002;249(4):375-389. doi:10.1007/s004150200026
25. Munch M, Hvas J, Christensen T, Møller-Larsen A, Haahr S. The implications of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis--a review. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1997;169:59-64. doi:10.1111/j.1600-0404.1997.tb08151.x
26. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001;286(24):3083-3088. doi:10.1001/jama.286.24.3083
27. Ramagopalan S V, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 2010;9(7):727-739. doi:10.1016/S1474-4422(10)70094-6
28. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7(3):268-277. doi:10.1016/S1474-4422(08)70042-5
29. Casetta I, Granieri E. Prognosis of multiple sclerosis: environmental factors. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2000;21(4 Suppl 2):S839-42. doi:10.1007/s100720070022
30. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF, Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Sondergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TMC, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Leppä V, Pirinen M, Tienari P, Wellcome Trust Case Control Consor ; Int IBD Genetics Consortium IIBDGC Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2013;45(11):1353-1360. doi:10.1038/ng.2770
31. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007;61(4):288-299. doi:10.1002/ana.21117
32. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007;61(6):504-513. doi:10.1002/ana.21141

33. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan S V. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(3):156-166. doi:10.1038/nrneurol.2010.1
34. Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(11):602-612. doi:10.1038/nrneurol.2012.198
35. Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H, Bi S. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2014;570:108-113. doi:10.1016/j.neulet.2014.04.021
36. Ascherio A, Munger KL, White R, Köchert K, Simon KC, Polman CH, Freedman MS, Hartung H-P, Miller DH, Montalbán X, Edan G, Barkhof F, Pleimes D, Radü E-W, Sandbrink R, Kappos L, Pohl C. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol*. 2014;71(3):306-314. doi:10.1001/jamaneurol.2013.5993
37. Burton JM, Kimball S, Vieth R, Bar-Or A, Dosch H-M, Cheung R, Gagne D, D'Souza C, Ursell M, O'Connor P. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(23):1852-1859. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e1cec2
38. Malik MT, Healy BC, Benson LA, Kivisakk P, Musallam A, Weiner HL, Chitnis T. Factors associated with recovery from acute optic neuritis in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2014;82(24):2173-2179. doi:10.1212/WNL.0000000000000524
39. Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(Pt 3):653-664. doi:10.1093/brain/awq371
40. Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol*. 2001;154(1):69-74. doi:10.1093/aje/154.1.69
41. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444
42. Healy BC, Ali EN, Guttman CRG, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, Houtchens M, Stazzone L, Moodie J, Berger AM, Duan Y, Bakshi R, Khoury S, Weiner H, Ascherio A. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009;66(7):858-864. doi:10.1001/archneurol.2009.122
43. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol*. 2016;36(2):103-114. doi:10.1055/s-0036-1579693
44. EPSTEIN MA, ACHONG BG, BARR YM. VIRUS PARTICLES IN CULTURED

- LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet (London, England)*. 1964;1(7335):702-703. doi:10.1016/s0140-6736(64)91524-7
45. RICKINSON, AB. Epstein-Barr virus. *Fields Virol*. Published online 1996:2397-2446. Accessed February 17, 2021. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10008037886/en/>
 46. Gerber P, Lucas S, Nonoyama M, Perlin E, Goldstein L. ORAL EXCRETION OF EPSTEIN-BARR VIRUS BY HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS. *Lancet*. 1972;300(7785):988-989. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)92402-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)92402-6)
 47. Alfieri C, Ghibu F, Joncas JH. Lytic, nontransforming Epstein-Barr virus (EBV) from a patient with chronic active EBV infection. *Can Med Assoc J*. 1984;131(10):1249-1252. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6093976>
 48. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. 1984;310(19):1225-1230. doi:10.1056/NEJM198405103101905
 49. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*. 1997;182(2):151-159. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<151::AID-PATH824>3.0.CO;2-3
 50. Kanegane H, Nomura K, Miyawaki T, Tosato G. Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;44(3):239-249. doi:10.1016/s1040-8428(02)00115-4
 51. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(14):4510-4514. doi:10.1073/pnas.81.14.4510
 52. Thorley-Lawson DA. EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):151-209. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_8
 53. Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*. 2005;15(1):3-15. doi:10.1002/rmv.441
 54. Hadinoto V, Shapiro M, Greenough TC, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood*. 2008;111(3):1420-1427. doi:10.1182/blood-2007-06-093278
 55. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1328-1337.

doi:10.1056/NEJMra032015

56. Rickinson AB, Long HM, Palendira U, Münz C, Hislop AD. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* 2014;35(4):159-169. doi:10.1016/j.it.2014.01.003
57. Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One.* 2009;4(2):e4565. doi:10.1371/journal.pone.0004565
58. Sumaya C V, Henle W, Henle G, Smith MH, LeBlanc D. Seroepidemiologic study of Epstein-Barr virus infections in a rural community. *J Infect Dis.* 1975;131(4):403-408. doi:10.1093/infdis/131.4.403
59. Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med.* 1993;118(1):45-58. doi:10.7326/0003-4819-118-1-199301010-00009
60. Evans AS, Carvalho RP, Frost P, Jamra M, Pozzi DH. Epstein-Barr virus infections in Brazil. II. Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst.* 1978;61(1):19-26. doi:10.1093/jnci/61.1.19
61. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000;343(7):481-492. doi:10.1056/NEJM200008173430707
62. Ascherio A, Munger KL. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol.* 2010;5(3):271-277. doi:10.1007/s11481-010-9201-3
63. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol.* 2006;59(3):499-503. doi:10.1002/ana.20820
64. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sørensen PS, Hjalgrim H. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol.* 2007;64(1):72-75. doi:10.1001/archneur.64.1.72
65. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelman JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol.* 2006;63(6):839-844. doi:10.1001/archneur.63.6.noc50328
66. Levin LI, Munger KL, Rubertone M V, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, Ascherio A. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA.* 2005;293(20):2496-2500. doi:10.1001/jama.293.20.2496
67. Sundström P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nyström L, Dillner J,

- Forsgren L. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 2004;62(12):2277-2282.
doi:10.1212/01.wnl.0000130496.51156.d7
68. Ruprecht K. [Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus : new developments and perspectives]. *Nervenarzt*. 2008;79(4):399-407. doi:10.1007/s00115-007-2335-8
69. von Bismarck O, Dankowski T, Ambrosius B, Hessler N, Antony G, Ziegler A, Hoshi M-M, Aly L, Luessi F, Groppa S, Klotz L, Meuth SG, Tackenberg B, Stoppe M, Then Bergh F, Tumani H, Kümpfel T, Stangel M, Heesen C, Wildemann B, Paul F, Bayas A, Warnke C, Weber F, Linker RA, Ziemann U, Zettl UK, Zipp F, Wiendl H, Hemmer B, Gold R, Salmen A. Treatment choices and neuropsychological symptoms of a large cohort of early MS. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2018;5(3):e446.
doi:10.1212/NXI.0000000000000446
70. Gieß RM, Pfuhl C, Behrens JR, Rasche L, Freitag E, Khalighy N, Otto C, Wuerfel J, Brandt AU, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K. Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175279. doi:10.1371/journal.pone.0175279
71. Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi M-M, Aly L, Luessi F, Groppa S, Klotz L, Meuth SG, Schroeder C, Grüter T, Tackenberg B, Paul F, Then-Bergh F, Kümpfel T, Weber F, Stangel M, Bayas A, Wildemann B, Heesen C, Zettl U, Warnke C, Antony G, Hessler N, Wiendl H, Bittner S, Hemmer B, Gold R, Salmen A, Ruprecht K. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(7):681-686. doi:10.1136/jnnp-2020-322941
72. Dobson R, Kuhle J, Middeldorp J, Giovannoni G. Epstein-Barr-negative MS: a true phenomenon? *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2017;4(2):e318-e318.
doi:10.1212/NXI.0000000000000318
73. Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi MM, Aly L, Luessi F, Groppa S, Klotz L, Meuth SG, Schroeder C, Grüter T, Tackenberg B, Paul F, Then-Bergh F, Kümpfel T, Weber F, Stangel M, Bayas A, Wildemann B, Heesen C, Zettl U, Warnke C, Antony G, Hessler N, Wiendl H, Bittner S, Hemmer B, Gold R, Salmen A, Ruprecht K. Paper of the Month 05/2020: Center for Stroke Research Berlin - Charité – Universitätsmedizin Berlin. Accessed July 21, 2021.
https://schlaganfallzentrum.charite.de/en/metast/news/artikel/detail/paper_of_the_month_052020/

74. Deuschle K, Hofmann J, Otto C, Bellmann-Strobl J, Scherner O, Klumbies K, Schneider E, Broddack J, Paul F, Ruprecht K. Are there Epstein-Barr virus seronegative patients with multiple sclerosis? *Mult Scler.* 2013;19(9):1242-1243.
doi:10.1177/1352458512472751
75. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G, Ramagopalan S V. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler.* 2013;19(2):162-166. doi:10.1177/1352458512449682
76. Morris MC, Edmunds WJ, Hesketh LM, Vyse AJ, Miller E, Morgan-Capner P, Brown DWG. Sero-epidemiological patterns of Epstein-Barr and herpes simplex (HSV-1 and HSV-2) viruses in England and Wales. *J Med Virol.* 2002;67(4):522—527.
doi:10.1002/jmv.10132
77. Balfour HHJ, Sifakis F, Sliman JA, Knight JA, Schmeling DO, Thomas W. Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *J Infect Dis.* 2013;208(8):1286-1293.
doi:10.1093/infdis/jit321
78. Fourcade G, Germe R, Guerber F, Lupo J, Baccard M, Seigneurin A, Semenova T, Morand P, Epaulard O. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000-2016. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175574. doi:10.1371/journal.pone.0175574
79. Balfour HHJ, Odumade OA, Schmeling DO, Mullan BD, Ed JA, Knight JA, Vezina HE, Thomas W, Hogquist KA. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis.* 2013;207(1):80-88. doi:10.1093/infdis/jis646
80. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;67(6):824-830.
doi:10.1002/ana.21978
81. Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One.* 2013;8(4):e61110. doi:10.1371/journal.pone.0061110
82. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Tyblova M, Bergsland N, Hussein S, Willis L, Krasensky J, Vaneckova M, Seidl Z, Lelkova P, Dwyer MG, Zhang M, Yu H, Duan X, Kalincik T, Ramanathan M. Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center SET study. *PLoS One.* 2013;8(1):e53996.

doi:10.1371/journal.pone.0053996

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sargis Abrahamyan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus in einer großen Kohorte von Patientinnen und Patienten mit früher Multipler Sklerose“ („A study of the prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus in a large cohort of patients with early multiple sclerosis“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Sargis Abrahamyan hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation

Publikation 1:

Sargis Abrahamyan, Bettina Eberspächer, Björn Ambrosius, Nicole Hessler, Gisela Antony, Inke R König, Muna-Miriam Hoshi, Lilian Aly, Felix Luessi, Sergiu Groppa, Luisa Klotz, Sven G Meuth, Björn Tackenberg, Muriel Stoppe, Florian Then Bergh, Hayrettin Tumani, Tania Kümpfel, Martin Stangel, Christoph Heesen, Brigitte Wildemann, Friedemann Paul, Antonios Bayas, Clemens Warnke, Frank Weber, Ralf A Linker, Ulf Ziemann, Uwe K Zettl, Frauke Zipp, Heinz Wiendl, Bernhard Hemmer, Ralf Gold, Anke Salmen, Klemens Ruprecht

Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis.

Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 2020; 91:681–686. doi:10.1136/jnnp-2020-322941

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit an der Entwicklung des Studienkonzeptes/Studienprotokolls zusammen mit dem Doktorvater/Betreuer
- Planung und Organisation der Experimente
- Durchführung der laborexperimentellen Arbeiten:
 - o Verwaltung der Serumproben
 - o Probenvorbereitung einschließlich Verdünnung der Patientenseren
 - o EBV-Antikörpermessungen
- Erfassung und Dokumentation der Ergebnisse
- Dateneingabe in Excel, Aufarbeitung und Datenanalyse
- Mitarbeit an der Verfassung des Manuskripts:
 - o Mitarbeit am „Patients and Methods“ Teil
 - o Sämtliche Daten im Results Teil sind aus den Auswertungen der Doktorarbeit entstanden.
 - o Die Daten in Figure 1 wurden von Frau Dr. Bettina Eberspächer zusammengestellt und im Rahmen der Doktorarbeit ausgewertet.

- Mitarbeit an der Überarbeitung und Revision des Manuskriptes

Unterschrift des Doktoranden

S.Abrahamyan

9. Der Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PSYCHIATRY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 214 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	World Psychiatry	5,426	34.024	0.014100
2	Lancet Psychiatry	4,887	18.329	0.022100
3	JAMA Psychiatry	10,894	15.916	0.055560
4	PSYCHOTHERAPY AND PSYCHOSOMATICS	3,892	13.744	0.005800
5	AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY	43,025	13.655	0.036370
6	MOLECULAR PSYCHIATRY	20,353	11.973	0.049290
7	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	43,122	11.501	0.053320
8	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	29,660	8.272	0.030730
9	SCHIZOPHRENIA BULLETIN	17,794	7.289	0.025590
10	BRITISH JOURNAL OF PSYCHIATRY	25,101	7.233	0.022570
11	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	25,672	7.160	0.039090
12	ADDICTION	19,945	6.851	0.032100
13	Epidemiology and Psychiatric Sciences	1,217	6.402	0.003830
14	JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY	19,942	6.391	0.019370
15	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	14,533	6.170	0.025700
16	JOURNAL OF CHILD PSYCHOLOGY AND PSYCHIATRY	19,072	6.129	0.023100
17	PSYCHOLOGICAL MEDICINE	25,176	5.641	0.038080
18	JOURNAL OF ABNORMAL PSYCHOLOGY	15,807	5.519	0.014930
19	Translational Psychiatry	7,313	5.182	0.024860
20	AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF PSYCHIATRY	7,078	5.000	0.008330

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "PSYCHIATRY"

1



ORIGINAL RESEARCH

Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis

Sargis Abrahamyan,^{1,2} Bettina Eberspächer,³ Muna-Miriam Hoshi,⁴ Lilian Aly,⁴ Felix Luessi,⁵ Sergiu Groppa,⁵ Luisa Klotz,⁶ Sven G Meuth,⁶ Christoph Schroeder,⁷ Thomas Grüter,⁷ Björn Tackenberg,⁸ Friedemann Paul,^{1,9} Florian Then-Bergh,¹⁰ Tania Kümpfel,¹¹ Frank Weber,¹² Martin Stangel,¹³ Antonios Bayas,¹⁴ Brigitte Wildemann,¹⁵ Christoph Heesen,¹⁶ Uwe Zettl,¹⁷ Clemens Warnke,^{18,19} Gisela Antony,²⁰ Nicole Hessler,²¹ Heinz Wiendl,⁶ Stefan Bittner,⁵ Bernhard Hemmer,⁴ Ralf Gold,⁷ Anke Salmen,²² Klemens Ruprecht,¹ on behalf of the German Competence Network Multiple Sclerosis (KKNMS)

► Additional material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2020-322941>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Klemens Ruprecht, Department of Neurology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; klemens.ruprecht@charite.de

This paper was presented at the 34th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, 12 October 2018, Berlin, Germany (<https://doi.org/10.1177/1352458518799980>).

Received 2 February 2020
Revised 9 April 2020
Accepted 16 April 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi M-M, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/jnnp-2020-322941

ABSTRACT

Objective To determine the prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus (EBV) in a large cohort of patients with early multiple sclerosis (MS).

Methods Serum samples were collected from 901 patients with a clinically isolated syndrome (CIS) or early relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS) participating in the German National MS cohort, a prospective cohort of patients with early MS with stringent inclusion criteria. Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA)-1 and viral capsid antigen (VCA) antibodies were measured in diluted sera by chemiluminescence immunoassays (CLIAs). Sera of EBNA-1 and VCA antibody-negative patients were retested undiluted by an EBV IgG immunoblot. For comparison, we retrospectively analysed the EBV seroprevalence across different age cohorts, ranging from 0 to >80 years, in a large hospital population (N=16 163) from Berlin/Northern Germany.

Results EBNA-1 antibodies were detected by CLIA in 839 of 901 patients with CIS/RRMS. Of the 62 patients without EBNA-1 antibodies, 45 had antibodies to VCA as detected by CLIA. In all of the remaining 17 patients, antibodies to EBV were detected by immunoblot. Altogether, 901 of 901 (100%) patients with CIS/RRMS were EBV-seropositive. EBV seropositivity increased with age in the hospital population but did not reach 100% in any of the investigated age cohorts.

Conclusion The complete EBV seropositivity in this large cohort of patients with early MS strengthens the evidence for a role of EBV in MS. It also suggests that a negative EBV serology in patients with suspected inflammatory central nervous system disease should alert clinicians to consider diagnoses other than MS.

INTRODUCTION

Strong and consistent evidence indicates an association of multiple sclerosis (MS) and infection with the Epstein-Barr virus (EBV).^{1–3} This led to the proposal that, from an epidemiological perspective, MS could be regarded as a late complication of EBV infection.⁴ If this was true, one would expect that there should be practically no EBV-seronegative patients with MS.⁵ Previous seroepidemiological

studies and meta-analyses thereof indeed observed very high EBV seropositivity rates (~98% to 100%) in patients with MS or a clinically isolated syndrome (CIS).^{1–11} Nevertheless, the detection of few EBV-seronegative persons with a diagnosis of MS in some of those studies suggests that EBV-seronegative MS may occur. However, as inclusion criteria of previous studies on the seroprevalence of EBV in patients with MS were heterogeneous, it cannot be excluded that EBV-seronegative persons with a diagnosis of MS reported in the literature may occasionally have been misclassified and could in fact have diagnoses other than MS.⁸ Furthermore, it was shown that the EBV seroprevalence in patients with MS may depend on the sensitivity and specificity of the applied antibody assays and that in the likely most robust studies, that is, those that used two independent methods for detection of EBV antibodies, EBV seropositivity in patients with a diagnosis of MS may reach 100%.⁷

To systematically search for EBV-seronegative patients with MS, we analysed the EBV seroprevalence in 901 patients of the German National MS cohort, a prospective longitudinal observational cohort of patients with early MS with stringent inclusion criteria. For comparison, we retrospectively determined EBV seroprevalence rates across different age cohorts in a large hospital population (N=16 163) from Berlin/Northern Germany.

PATIENTS AND METHODS

Patients with early MS

The German National MS cohort is a multicentre prospective longitudinal observational cohort which recruited a total of 1212 patients between August 2010 and December 2014.¹² Inclusion criteria have previously been reported in detail and comprise female and male patients aged ≥18 years and

► A diagnosis of a CIS (defined as a first clinical event suggestive of inflammatory demyelination) within 6 months before inclusion and fulfilment of three of four Barkhof criteria.

Multiple sclerosis

- ▶ A diagnosis of a CIS within 6 months before inclusion and fulfilment of two of four Barkhof criteria and intrathecal IgG production in cerebrospinal fluid (CSF) or abnormal visually evoked potentials.
- ▶ A diagnosis of a CIS within 6 months before inclusion and fulfilment of the McDonald 2010 criteria for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS).
- ▶ A diagnosis of RRMS based on the McDonald 2005 criteria within 2 years before inclusion.¹²

Exclusion criteria comprise previous use of any disease-modifying therapy for MS (except for short-term relapse treatment), primary or secondary progressive MS, concurrent progressive neurological diseases and conditions interfering with the assessment plan, for example, contraindications to MRI. The assessment plan includes standardised collection of demographic and clinical data, assessment of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and standardised sampling of biospecimens. All patients were recruited at specialised MS centres and study data were monitored with a query system.

Sera from therapy-naïve patients were collected, centrifuged and aliquoted during the baseline visit at the participating centres according to standard operating procedures and were shipped overnight to the Department of Neurology, Technische Universität München, where they were stored at -80°C . Baseline serum samples of 901 patients were available for EBV antibody testing and were sent on dry ice to the Department of Neurology, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Detection of EBV antibodies

Serum IgG antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA)-1 and to the EBV viral capsid antigen (VCA) were measured by Liaison (DiaSorin, Saluggia, Italy) automated quantitative chemiluminescence immunoassay (CLIA) at Labor Berlin GmbH, Berlin, Germany. As only limited amounts of serum ($\sim 50\mu\text{L}$) from participants of the German National MS cohort were available, all sera had to be measured in dilution. EBNA-1 IgG antibodies were measured in serum samples diluted either 1:20 ($n=40$) or 1:10 ($n=861$) in assay dilution buffer. With these dilutions, EBNA-1 IgG levels $<3\text{ U/mL}$ were considered negative, and EBNA-1 IgG levels $\geq 3\text{ U/mL}$ were considered positive. All EBNA-1 IgG-negative serum samples were tested at a dilution of 1:10 in assay dilution buffer for antibodies to VCA. With this dilution, VCA IgG levels $<10\text{ U/mL}$ were considered negative and VCA IgG levels $\geq 10\text{ U/mL}$ were considered positive. As per the manufacturer's instructions, the assay range of the EBNA-1 IgG CLIA is 3–600 U/mL and that of the VCA IgG CLIA is 10–750 U/mL.

Since we had to determine EBNA-1 and VCA IgG by CLIA in diluted sera of participants of the German National MS cohort, we retested EBNA-1 and VCA IgG-negative sera without dilution by an EBV IgG immunoblot (recomLine EBV IgG, Mikrogen, Germany). As only a small volume of serum ($20\mu\text{L}$) is needed for the EBV IgG immunoblot, we were able to use undiluted sera for these measurements. Serum samples that were positive in at least one of the three assays (EBNA-1 IgG CLIA, VCA IgG CLIA or EBV IgG immunoblot) were considered EBV seropositive.

Retrospective analysis of EBV seroprevalence in a large hospital population

We retrospectively analysed results of EBV serologies, which were performed for routine diagnostic purposes in 16 163 persons at Labor Berlin GmbH, Berlin, Germany, between January 2014 and December 2016. Sera were sent for EBV

serological testing from persons treated as inpatients or outpatients at university hospitals (Charité – Universitätsmedizin Berlin) located in Berlin or community hospitals located in Berlin and Northern Germany. The 16 163 persons were included irrespective of diagnoses or the reason for ordering EBV serologies. For individuals tested more than once during the study period, only the results of the first EBV serology were considered. From all persons included in the analysis, results of serological tests for EBNA-1 IgG and VCA IgG and VCA IgM had to be available. Notably, EBNA-1 IgG is a marker of past EBV infection, VCA IgG can be found in primary and past EBV infections, and VCA IgM is a marker of primary EBV infection.¹³ Testing for EBNA-1 IgG, VCA IgG and VCA IgM was performed by Liaison automated quantitative CLIA using undiluted sera. Thus, the same method (Liaison CLIA) was used for testing of patients with CIS/RRMS and patients of the hospital population, with sera of patients with CIS/RRMS being measured in dilution and sera of patients from the hospital population being measured without dilution. According to the manufacturer's recommendations, in undiluted sera, EBNA-1 IgG levels $<5\text{ U/mL}$ were considered negative, levels between 5 and 20 U/mL were considered equivocal and levels $\geq 20\text{ U/mL}$ were considered positive; VCA IgG levels $<20\text{ U/mL}$ were considered negative and VCA IgG levels $\geq 20\text{ U/mL}$ were considered positive; and VCA IgM levels $<20\text{ U/mL}$ were considered negative, levels between 20 and 40 U/mL were considered equivocal and VCA IgM levels $\geq 40\text{ U/mL}$ were considered positive. Persons with EBNA-1 IgG and VCA IgG and VCA IgM below the respective cut-offs were considered EBV-seronegative. Persons in whom at least one of the three antibodies, EBNA-1 IgG, VCA IgG or VCA IgM, was above the respective cut-offs were considered EBV-seropositive. From the age of 5 years onwards, persons were grouped in 5-year age cohorts. To analyse the EBV seroprevalence in early life in more detail, newborns and infants below 5 years of age were grouped in smaller age cohorts.

Statistical analyses

Continuous data were summarised using medians and IQRs. Categorical data are reported as absolute and relative frequencies (%). The significance of different EBV seropositivity rates between patients with early MS and persons in the hospital population was assessed by two-tailed Fisher exact tests (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2/>). A p value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

EBV seroprevalence in early MS

The median (IQR) age of the 901 patients included in this study was 33 (27–41) years, and 630/901 (69.9%) were women. At the time of blood sampling, 380 (42.2%) had a diagnosis of a CIS and 521 (57.8%) had a diagnosis of RRMS according to the inclusion criteria of the German National MS cohort. The median (IQR) EDSS score of patients with CIS and RRMS was 1.5 (1.0–2.0, data available from $n=899$ patients).

IgG antibodies to EBNA-1, as measured in diluted sera by CLIA, were positive in 839 of 901 (93.1%) patients with CIS/RRMS. Of the 62 patients without antibodies to EBNA-1, 45 (72.6%) had positive IgG antibodies to VCA, as measured in diluted sera by CLIA. Of the 17 remaining patients, 17 (100%) had IgG antibodies to EBV as detected in undiluted sera by EBV IgG immunoblot. Detailed results of EBV IgG immunoblots are provided in online supplementary table 1. In sum, 12

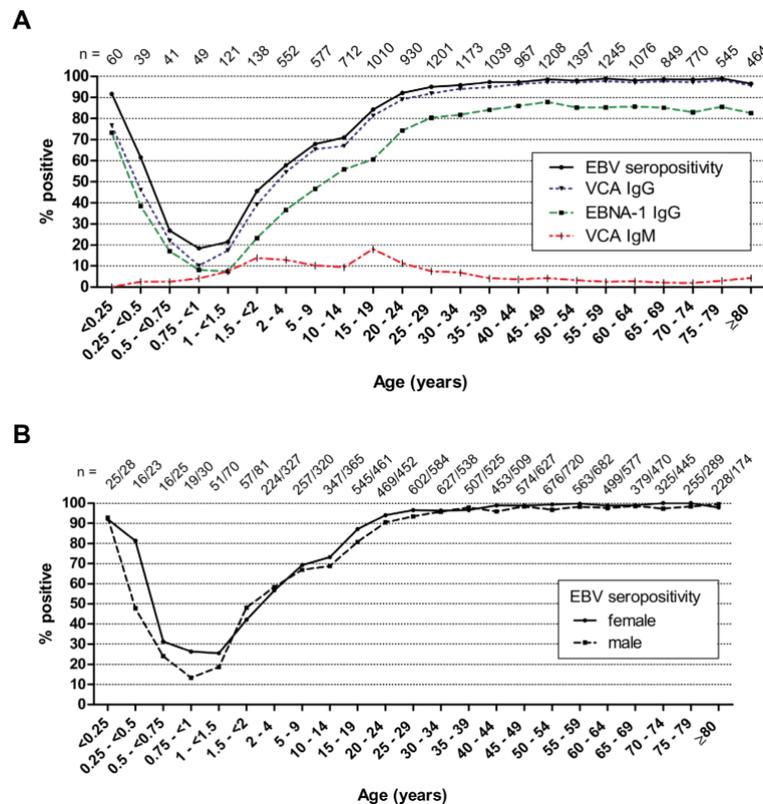


Figure 1 (A) EBV seropositivity rates by age cohorts in a large hospital population (N=16 163). The percentage positivity of IgG antibodies to EBNA-1 and of IgG and IgM antibodies to VCA in different age cohorts is shown. Note that the x-axis is not proportional. EBV seropositivity was defined as seropositivity to at least one of the three antibodies, EBNA-1 IgG, VCA IgG or VCA IgM. The number of persons analysed in each age cohort is indicated above the graph. (B) EBV seropositivity rates by age cohorts in a large hospital population are shown separately for female (n=7714) and male (n=8322) persons. EBV seropositivity was defined as seropositivity to at least one of the three antibodies, EBNA-1 IgG, VCA IgG or VCA IgM. The number of female/male persons analysed in each age cohort is indicated above the graph. EBNA-1, Epstein-Barr nuclear antigen-1; EBV, Epstein-Barr virus; VCA, viral capsid antigen.

of 17 sera reacted with the EBNA-1 p72 antigen and 17 of 17 sera reacted with at least one of two VCA antigens (p18 and p23) included in the EBV IgG immunoblot. Altogether, 901 (100%) patients with CIS/RRMS investigated in this work were EBV seropositive.

EBV seroprevalence in a large hospital population

To compare the EBV seroprevalence in patients with early MS with the general EBV seroprevalence in a similar geographical region, we analysed the EBV seroprevalence across different age groups in a large hospital population (n=16 163) from Berlin/Northern Germany. Data on sex were available from 16 036 of these persons, of which 7714 (48%) were female and 8322 (52%) were male. **Figure 1A** summarises the EBV seroprevalence in the entire hospital population; the respective source data are provided in online supplementary table 2. EBV seropositivity was high in newborns (<0.25 years) and lowest in 0.75-1 year olds. Subsequently, EBV seropositivity increased until adulthood, with steepest increases in the age cohorts of 1.5-2.0 and 15-19 years. The increases of EBV seropositivity in these age cohorts were paralleled by an increased detection

of VCA IgM antibodies, indicating primary EBV infections. While EBV seropositivity further increased with increasing age and was $\geq 98\%$ in all 5-year age cohorts from 45 to 79 years, it did not reach 100% in any of these age cohorts. EBV seropositivity tended to be overall slightly higher in women than in men, but the course of EBV seropositivity across the life span was similar in both sexes (**figure 1B**).

When comparing the EBV seropositivity rates in patients with early MS and in participants of the hospital population in the age range of 20-40 years, that is, the typical age of clinical onset of MS,¹⁴ EBV seropositivity among patients with MS (610/610, 100%) was higher than among participants of the hospital population (4134/4343, 95.2%; $p < 0.0001$). In a comparison of EBNA-1 IgG seropositivity by age between patients with early MS and patients from the hospital population, the difference in EBNA-1 IgG seropositivity was strongest in the youngest analysed age cohort (20-24 years) and subsequently declined with increasing age (online supplementary figure 1).

DISCUSSION

The key result of this study is a complete EBV seropositivity in a large cohort (n=901) of patients with early MS. While this finding is consistent with the known high EBV seroprevalence in MS,^{1,6–11} the absence of any EBV-seronegative patients with early MS in our cohort appears remarkable and further strengthens the evidence for an association of EBV infection and MS. The already 100% EBV seropositivity in the 380 patients with a CIS, that is, the earliest clinically detectable manifestation of MS, complies with the concept that EBV infection precedes the clinical onset of MS and suggests that EBV exerts its role early in the development of MS.¹⁵

The German National MS cohort is a prospective longitudinal cohort with stringent inclusion criteria, requiring MRI, CSF or electrophysiological evidence supportive of MS in patients with a CIS.¹² Thus, the likelihood of inclusion of patients not having a true CIS, that is, a CIS as a first clinical manifestation of MS, or not having true MS into this well-characterised cohort of patients with CIS/early RRMS appears very low. Assuming that there is a genuine association of EBV and MS, the high degree of diagnostic certainty in patients participating in the German National MS cohort may therefore explain the 100% EBV seropositivity observed in this cohort. This conclusion is supported by findings of a previous meta-analysis, which in a post hoc analysis found higher ORs for EBNA-1 and VCA IgG seropositivity in serological studies of EBV prevalence in MS that included confirmed cases of MS as compared with studies that included confirmed and probable cases of MS.⁸ The most plausible explanation for this observation is that probable cases of MS are more likely to comprise misclassified patients who actually do not have MS. The EBV seroprevalence of those misclassified patients would be expected to correspond to that of the general population and to thus be lower than the EBV seroprevalence of patients with true MS, which could explain the occasional detection of EBV-seronegative persons in some former studies on EBV seroprevalence in MS.⁸

Our study corroborates results obtained in 1047 retrospectively collected patients with a CIS, only one of whom was found to be EBV seronegative.^{10,16} Altogether, the present evidence suggests that EBV-seronegative patients with MS, if they should exist at all, occur extremely rarely. An implication of these findings of relevance for clinical practise is that a negative EBV serology in a patient with suspected inflammatory central nervous system disease should alert clinicians to consider diagnoses other than MS.^{2,5,7} Given that the difference in the EBV seropositivity rates between patients with MS and controls declines with age (see also online supplementary figure 1), the younger the age of the patient, the more informative testing for EBV should be. Future studies on this issue may therefore focus in particular on children with suspected inflammatory central nervous system disease, as the difference between the likewise high EBV seroprevalence in children with MS and the EBV seroprevalence in paediatric controls is rather pronounced.¹⁷

The high EBV seropositivity in newborns and the rapid decline until the age of 1 year observed in the hospital population is explained by placental transmission and subsequent disappearance of maternal EBV antibodies. The subsequent steep increases of EBV seropositivity in early infancy and in the age cohort of 15–19 years correspond to previous data on the natural course of EBV infection in industrialised countries of the northern hemisphere.^{18–21} The somewhat higher seroprevalence of VCA IgG as compared with EBNA-1 IgG in patients of the hospital population is consistent with findings of previous

large seroepidemiological studies and likely related to the known phenomenon that a certain proportion of persons infected with EBV does not develop antibodies to EBNA-1.^{8,13,22} Importantly, we found that about 30% of 10–14 year olds in our hospital population from Northern Germany were EBV seronegative. This is of relevance as these individuals are particularly prone to develop symptomatic primary EBV infection in the form of infectious mononucleosis, which is associated with an about twofold increased risk of MS.^{23,24}

The higher EBV seropositivity rate in patients with early MS (100%) as compared with persons in the hospital population (95.2%) in the age range of 20–40 years is consistent with previous data⁸ and appears compatible with the concept that EBV may be a necessary but not sufficient factor for the development of MS.

Of note, due to only limited amounts of serum available, sera of patients from the MS cohort had to be measured by CLIA in dilution. All EBNA-1 and VCA antibody-negative patients with CIS/early RRMS, as determined in diluted sera by CLIA, were thus retested by an EBV IgG immunoblot, which requires only a small volume of serum, enabling us to analyse undiluted sera. Detection of EBV antibodies by immunoblot in patients, who were EBV and VCA IgG negative by CLIA, is therefore explained by the fact that those sera were measured undiluted, that is, at a 10-fold higher concentration than in the CLIA. The majority of the 17 sera tested by the EBV immunoblot contained antibodies to EBNA-1, and all 17 sera contained antibodies to VCA (see online supplementary table 1), further supporting the conclusion that antibody responses in those 17 patients differed only quantitatively but not qualitatively from that of the other 884 patients.

Of further note, unlike patients with CIS/RRMS, EBV-seronegative participants of the hospital population, as determined by CLIA using undiluted sera, were not retested by an EBV immunoblot. We consider it very unlikely that this could have resulted in a higher rate of EBV seronegativity in the hospital population than in patients with MS for the following reasons: first, in routine diagnostic serology, absence of EBNA-1 IgG, VCA IgG and VCA IgM, as determined by CLIA in undiluted sera, is generally accepted to reliably indicate EBV seronegativity with no further confirmatory tests being required.^{13,21,25} Second, while we are not aware of published studies that directly compared the recomLine EBV IgG immunoblot with the liaison CLIA applied in our work, in a previous comparative study, the sensitivity of the recomLine EBV IgG immunoblot was not higher than that of another CLIA method (Architect; Abbott, Wiesbaden, Germany),²⁵ which is similar to the CLIA Method used in our work.²⁶ Third, when we re-tested 28 sera, which were EBNA-1 IgG and VCA IgG negative, as determined in undiluted sera by the Liaison CLIA, by EBV immunoblots, all of these sera were likewise EBV seronegative in the EBV immunoblot (unpublished observation). Altogether, the available evidence therefore clearly argues against a higher sensitivity of the EBV IgG immunoblot as compared with determination of EBNA-1 IgG and VCA IgG in undiluted sera by the liaison CLIA.

A limitation of this study is that we did not determine EBV seroprevalence in the general population, but, similar to a previous large investigation,²¹ used a hospital population as a surrogate instead. The hospital population may have included patients in whom EBV serologies were ordered for a suspected primary EBV infection, which could potentially result in higher EBV seropositivity rates than in the general population. Conversely, our hospital population may also have included immunosuppressed patients in whom EBV serologies could potentially result false

negative. However, given the very high number of patients analysed, it seems conceivable that the data obtained in the hospital population are overall representative of EBV seropositivity rates across different age ranges in the general population. Finally, as is the case with every serological test, we cannot exclude the occurrence of rare false-positive results. Nevertheless, such rare false-positive results would be highly unlikely to explain the 100% EBV seropositivity observed in patients with CIS/RRMS in our study.

CONCLUSION

The complete EBV seropositivity in this large cohort of patients with CIS/RRMS strengthens the evidence for a role of EBV in MS. It also suggests that a negative EBV serology in patients with suspected inflammatory central nervous system disease should alert clinicians to consider diagnoses other than MS. The results of this study are compatible with the concept that MS could be a rare late complication of EBV infection. Future studies should focus on the clarification of the mechanisms underlying the role of EBV in MS.

Author affiliations

¹Department of Neurology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Yerevan State University, Yerevan, Armenia

³Labor Berlin Charité-Vivantes GmbH, Berlin, Germany

⁴Department of Neurology, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Munich, Germany

⁵Department of Neurology, University Medicine Mainz, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany

⁶Department of Neurology with Institute of Translational Neurology, University of Münster, Münster, Germany

⁷Department of Neurology, St. Josef-Hospital, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany

⁸Department of Neurology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

⁹NeuroCure Clinical Research Center, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

¹⁰Department of Neurology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

¹¹Institute of Clinical Neuroimmunology, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

¹²Neurological Clinic, Sana Kliniken des Landkreises Cham, Cham, Germany

¹³Clinical Neuroimmunology and Neurochemistry, Department of Neurology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

¹⁴Department of Neurology, Universitätsklinikum Augsburg, Augsburg, Germany

¹⁵Department of Neurology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

¹⁶Department of Neurology, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

¹⁷Department of Neurology, University of Rostock, Rostock, Germany

¹⁸Department of Neurology, University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany

¹⁹Department of Neurology, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

²⁰Central Information Office (CIO), Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

²¹Institute of Medical Biometry and Statistics, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Germany

²²Department of Neurology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland

Acknowledgements The authors and representatives of the Kompetenznetz Multiple Sklerose express their deep gratitude to all patients participating in the German National MS cohort, as well as to the study nurses, for their motivated collaboration and recruitment efforts, and to the data monitoring and administrative personnel of the study.

Collaborators Katrin Pape, Department of Neurology, University Medicine Mainz, Johannes Gutenberg University Mainz, Germany; Gerd Meyer zu Hörste, Department of Neurology with Institute of Translational Neurology, University of Münster, Germany; Maria Seipelt, Department of Neurology, Philipps-Universität Marburg, Germany; Sandra Nischwitz and Matthias Knop, Department of Neurology, Max-Planck-Institute of Psychiatry, Munich, Germany; Susanne Rothacher, Department of Neurology, Universitätsklinikum Augsburg, Germany; Hayrettin Tumani, Department of Neurology, University of Ulm, Germany, and Clinic of Neurology Dietenbronn, Schwendi, Germany; Ulf Ziemann, Department of Neurology, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Germany; Ralf A Linker, Department of Neurology, University Hospital Regensburg, Germany.

Contributors SA and BE participated in study design, performed antibody measurements and analysed the data. M-MH, LA, FL, SG, LK, SGM, CS, TG, BT, FP, FT-B, TK, FW, MS, AB, BW, CH, UZ, CW, GA, NH, HW, SB, BH, RG and AS contributed patients and clinical data. GA, RG, BH, AS and HW designed and conceptualised the German National MS cohort. KR conceived the study, participated in the study design, analysed the data and drafted the manuscript. All authors reviewed and revised the manuscript.

Funding The German National MS Cohort and the Kompetenznetz Multiple Sklerose are supported by grants from the German Federal Ministry for Education and Research, grant number 01GI0914 (Bochum), 01GI0916, 01GI1601G (Lübeck) and 01GI1601B (Marburg). This study was supported by the Charité Research Fund and Stiftung Charité (BIH Clinical Fellow Program).

Competing interests SA reports no disclosures. BE reports no disclosures. M-MH received travel expenses from Bayer Health Care and honoraria for an advisory board member for Roche Pharma and has received travel grants from Teva Pharma. SG reports no disclosures. LK received compensation for serving on scientific advisory boards (Genzyme, Novartis Pharma); speaker honoraria and travel support (CSL Behring, Merck Serono, Roche, Novartis Pharma); research support (Biogen, Novartis Pharma). SGM receives honoraria for lecturing, and travel expenses for attending meetings from Almirall, Amicus Therapeutics Germany, Bayer Health Care, Biogen, Celgene, Diamed, Genzyme, MedDay Pharmaceuticals, Merck Serono, Novartis, Novo Nordisk, ONO Pharma, Roche, Sanofi-Aventis, Chugai Pharma, QuintilesIMS and Teva. His research is funded by the German Ministry for Education and Research (BMBF), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Else Kröner Fresenius Foundation, Gemeinsamer Bundesausschuss (G-BA), German Academic Exchange Service, Hertie Foundation, Interdisciplinary Center for Clinical Studies (IZKF) Münster, German Foundation Neurology and Alexion, Almirall, Amicus Therapeutics Germany, Biogen, Diamed, Fresenius Medical Care, Genzyme, HERZ Burgdorf, Merck Serono, Novartis, ONO Pharma, Roche, and Teva. CS reports no disclosures. TG received travel reimbursement from Biogen Idec; not related to this work. BT received personal speaker honoraria and consultancy fees as a speaker and advisor from Bayer Healthcare, Biogen, CSL Behring, GRIFOLS, Merck Serono, Novartis, Octapharma, Roche, Sanofi Genzyme, TEVA and UCB Pharma. His University received unrestricted research grants from Biogen-idec, Novartis, TEVA, Bayer Healthcare, CSL-Behring, GRIFOLS, Octapharma, Sanofi Genzyme and UCB Pharma; none related to this work. FP serves on the scientific advisory board for Novartis; received speaker honoraria and travel funding from Bayer, Novartis, Biogen Idec, Teva, Sanofi-Aventis/Genzyme, Merck Serono, Alexion, Chugai, MedImmune, and Shire; is an academic editor for PLoS ONE; is an associate editor for Neurology@Neuroimmunology & Neuroinflammation; consulted for Sanofi/Genzyme, Biogen Idec, MedImmune, Shire, and Alexion; and received research support from Bayer, Novartis, Biogen Idec, Teva, Sanofi-Aventis/Genzyme, Alexion, Merck Serono, German Research Council, Werth Stiftung of the City of Cologne, German Ministry of Education and Research, Arthur Arnstein Stiftung Berlin, EU FP7 Framework Program, Guthy Jackson Charitable Foundation, and National Multiple Sclerosis of the USA; none related to this work. FTB received personal compensation for speaking and attending advisory boards from Actelion, Bayer, Biogen, Genzyme, Merck, Novartis, Teva and Roche; financial support, through his institution, to attend scientific meetings or for investigator initiated studies from Actelion, Bayer, Biogen, Genzyme, Merck, Novartis and Teva. TK received travel expenses and personal compensations from Bayer Healthcare, Teva Pharma, Merck-Serono, Novartis, Sanofi-Aventis/Genzyme, Roche and Biogen, as well as grant support from Bayer-Schering AG, Novartis and Chugai Pharma; and none related to this work. FW received honoraria from Genzyme, Novartis, TEVA, Bayer and Biogen for speaking or for serving on a scientific advisory board, a travel grant for the attention of a scientific meeting from Merck-Serono and Novartis and grant support from Merck-Serono, Novartis and from the Federal Ministry of Education and Research (BMBF, Projects Biobanking and Omics in ControlMS as part of the Competence Network Multiple Sclerosis). MS received honoraria for scientific lectures or consultancy from Bayer Healthcare, Biogen, Baxter/Baxalta, CSL Behring, Euroimmune, Grifols, Merck-Serono, Novartis, Roche, Sanofi-Aventis, and Teva. His institution received research support from Bayer Healthcare, Biogen Idec, Genzyme, Merck-Serono, Novartis, and Teva; and none related to this work. AB received personal compensation from Merck Serono, Biogen, Bayer, Novartis, TEVA, Roche, Sanofi/Genzyme, Celgene, Alexion and grants for congress trips and participation from Biogen, TEVA, Novartis, Sanofi/Genzyme, Merck Serono, Celgene; none related to this work. BW reports grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft, grants from Bundesministerium für Forschung und Technologie, grants from Dietmar Hopp Stiftung, grants from Klaus Tschira Stiftung, grants and personal fees from Merck Serono, personal fees from Biogen, personal fees from Bayer Healthcare, personal fees from TEVA, grants and personal fees from Novartis, grants and personal fees from Sanofi Genzyme, personal fees from Roche, outside the submitted work. CH received research grants and speaker honoraria from Biogen, Genzyme, Roche, and Merck; none related to this work. UKZ received speaker fees from Aventis, Almirall, Biogen, Bayer, Merck, Novartis, Roche, and Teva. CW has received institutional fees for consultancy, speaking, or research from Novartis, Biogen, Sanofi-Genzyme and Roche. GA reports no disclosures. NH reports

no disclosures. HW receives honoraria for acting as a member of scientific advisory boards and as a consultant for Biogen, Evgen, MedDay Pharmaceuticals, Merck Serono, Novartis, Roche Pharma AG, Sanofi-Genzyme, as well as speaker honoraria and travel support from Alexion, Biogen, Cognomed, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Gemeinnützige Hertie-Stiftung, Merck Serono, Novartis, Roche Pharma AG, Sanofi-Genzyme, TEVA, and WebMD Global. Professor Wiendl is acting as a paid consultant for Abbvie, Actellon, Biogen, IGES, Novartis, Roche, Sanofi-Genzyme, and the Swiss Multiple Sclerosis Society. His research is funded by the BMBF, DFG, Else Kröner Fresenius Foundation, Fresenius Foundation, Hertie Foundation, NRW Ministry of Education and Research, Interdisciplinary Center for Clinical Studies (IZKF) Muenster and RE Children's Foundation, Biogen GmbH, GlaxoSmithKline GmbH, and Roche Pharma AG, Sanofi-Genzyme. SB has received honoraria and compensation for travel from Biogen Idec, Merck Serono, Novartis, Sanofi-Genzyme and Roche. BH served on scientific advisory boards for F. Hoffmann-La Roche Ltd, Novartis, Bayer AG, and Genentech; he has served as DMSC member for Allergy Care and TG Therapeutics; he or his institution have received speaker honoraria from Biogen Idec, Teva Neuroscience, Merck Serono, Medimmune, Novartis, Desitin, and F. Hoffmann-La Roche Ltd; his institution has received research support from Chugai Pharmaceuticals; holds part of two patents; one for the detection of antibodies and T cells against KIR4.1 in a subpopulation of patients with MS and one for genetic determinants of neutralizing antibodies to interferon β during the last 3 years. RG serves on scientific advisory boards for Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, and Novartis; has received speaker honoraria from Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Bayer Schering Pharma, and Novartis; serves as editor for *Therapeutic Advances in Neurological Diseases* and on the editorial boards of *Experimental Neurology* and the *Journal of Neuroimmunology*; and receives research support from Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Genzyme, Merck Serono, and Novartis; none related to this work. AS received speaker honoraria and/or travel compensation for activities with Almirall Hermal GmbH, Biogen, Merck, Novartis, Roche, and Sanofi Genzyme; none related to this work. KR received research support from Novartis, Merck Serono, German Ministry of Education and Research, European Union, Stiftung Charité (BIH Clinical Fellow), Arthur Arnstein Stiftung Berlin, as well as speaking fees and travel grants from Bayer Healthcare, Biogen Idec, Merck Serono, Sanofi-Aventis/Genzyme, Teva Pharmaceuticals, Roche, Novartis, and Guthy Jackson Charitable Foundation.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval The study protocol, including collection of biospecimens for scientific purposes, was approved by the lead ethics committee, Ruhr-University Bochum (registration number 3714-10), and local ethics committees of all participating centres.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iDs

Thomas Grüter <http://orcid.org/0000-0001-8927-9818>

Christoph Heesen <http://orcid.org/0000-0001-8131-9467>

Anke Salmen <http://orcid.org/0000-0002-4751-299X>

Klemens Ruprecht <http://orcid.org/0000-0003-1962-6014>

REFERENCES

- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61:288–99.
- Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2012;8:602–12.
- Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, et al. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* 2015;14:263–73.
- Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to Prevention-An update. *Semin Neurol* 2016;36:103–14.
- Deuschle K, Hofmann J, Otto C, et al. Are there Epstein-Barr virus seronegative patients with multiple sclerosis? *Mult Scler* 2013;19:1242–3.
- Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One* 2009;4:e4565.
- Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler* 2013;19:162–6.
- Almohmed YH, Avenell A, Aucott L, et al. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One* 2013;8:e61110.
- Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, et al. Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center set study. *PLoS One* 2013;8:e53996.
- Dobson R, Kuhle J, Middeldorp J, et al. Epstein-Barr-negative MS: a true phenomenon? *Neuro Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017;4:e318.
- Gieß RM, Pfuhl C, Behrens JR, et al. Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS One* 2017;12:e0175279.
- von Bismarck O, Dankowski T, Ambrosius B, et al. Treatment choices and neuropsychological symptoms of a large cohort of early MS. *Neuro Neuroimmunol Neuroinflamm* 2018;5:e446.
- Niller H-H, Bauer G. Epstein-Barr virus: clinical diagnostics. *Methods Mol Biol* 2017;1532:33–55.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet* 2008;372:1502–17.
- Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, et al. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67:NA–30.
- Kuhle J, Disanto G, Dobson R, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: a large multicentre study. *Mult Scler* 2015;21:1013–24.
- Pohl D, Krone B, Rostasy K, et al. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology* 2006;67:2063–5.
- Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. 4th edn. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 2575–627.
- Morris MC, Edmunds WJ, Hesketh LM, et al. Sero-Epidemiological patterns of Epstein-Barr and herpes simplex (HSV-1 and HSV-2) viruses in England and Wales. *J Med Virol* 2002;67:522–7.
- Balfour HH, Sifakis F, Slijman JA, et al. Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6–19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *J Infect Dis* 2013;208:1286–93.
- Fourcade G, Germi R, Guerber F, et al. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a City laboratory network, 2000–2016. *PLoS One* 2017;12:e0175574.
- De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, et al. Seroepidemiology of EBV and interpretation of the "isolated VCA IgG" pattern. *J Med Virol* 2009;81:325–31.
- Balfour HH, Odumade OA, Schmeling DO, et al. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis* 2013;207:80–8.
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, et al. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 2010;5:e12496.
- Guerrero-Ramos A, Patel M, Kadakia K, et al. Performance of the architect EBV antibody panel for determination of Epstein-Barr virus infection stage in immunocompetent adolescents and young adults with clinical suspicion of infectious mononucleosis. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21:817–23.
- François C, Segard C, Bouvier M, et al. Comparison of Abbott Architect[®], Siemens Immulite[®], and Diasorin Liaison[®] for determination of Epstein-Barr virus serological diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90:96–101.

11.Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Publikationsliste

Sargis Abrahamyan, Bettina Eberspächer, Björn Ambrosius, Nicole Hessler, Gisela Antony, Inke R König, Muna-Miriam Hoshi, Lilian Aly, Felix Luessi, Sergiu Groppa, Luisa Klotz, Sven G Meuth, Björn Tackenberg, Muriel Stoppe, Florian Then Bergh, Hayrettin Tumani, Tania Kümpfel, Martin Stangel, Christoph Heesen, Brigitte Wildemann, Friedemann Paul, Antonios Bayas, Clemens Warnke, Frank Weber, Ralf A Linker, Ulf Ziemann, Uwe K Zettl, Frauke Zipp, Heinz Wiendl, Bernhard Hemmer, Ralf Gold, Anke Salmen, Klemens Ruprecht

Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 2020;0:1–6. doi:10.1136/jnnp-2020-322941

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Ruprecht für die Überlassung des spannenden Themas, für die wissenschaftlichen Gespräche sowie für seine ausgezeichnete Betreuung danken. Durch die hervorragende wissenschaftliche Betreuung wurden meine Interessen an der Neurologie und insbesondere an neuroimmunologischen Fragestellungen geweckt.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle Frau Bettina Eberspracher danken für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit im Labor.

Ein herzliches Dankeschön geht vor allem auch an meine Eltern und meine Frau für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.