

**Ergebnisbericht zum Forschungsprojekt 2/2015:**

**„Untersuchungen zum Vorkommen von Paramyxoviren bei Patienten  
mit chronischen Nierenerkrankungen“**

**Förderzeitraum:**

01.04.2015 – 31.03.2016

**Antragssteller:**

Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp/Dipl.-Biochem. Michael Sieg  
Institut für Virologie  
Zentrum für Infektionsmedizin  
Universität Leipzig  
An den Tierkliniken 29  
04103 Leipzig  
Tel.: 0341/9738-201  
Fax.: 0341/9738-219

**Projektpartner:**

Dr. Tim Drogies  
Institut für Laboratoriumsmedizin,  
Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Universitätsklinikum Leipzig  
Paul-List-Str. 13-15  
04103 Leipzig  
Tel.: 0341 97 22463  
Fax: 0341 97 22209

## 1.) Zielstellung:

- 1.) Im Rahmen dieses geförderten Projektes sollten chronische Nierenerkrankungen beim Menschen hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit bisher unbekanntem Paramyxoviren untersucht werden. Insbesondere sollte dabei geklärt werden, ob für einen Teil dieser Erkrankungsformen eine virale Genese vorliegt.
- 2.) Des Weiteren sollten in diesem Projekt verschiedene Methoden zur Aufreinigung von viraler RNA aus Urin verglichen und optimiert werden.

## 2.) Ergebnisse:

### 2.1. Studiendesign

Zur Klärung der in diesem Projekt formulierten wissenschaftlichen Fragestellung wurden insgesamt 1.000 humane Urinproben gesammelt, asserviert und untersucht. Dazu wurde zunächst ein Ethikantrag gestellt, um am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik im Rahmen der Restmengenverwertung eine entsprechende Probenanzahl generieren zu können. In Anlage 1 ist das positive Ethikvotum gezeigt.

Anschließend wurde ein Protokoll zur Durchführung der klinischen Studie erstellt und die Kriterien definiert, welche die zu sammelnden Proben einschließen mussten. Diese sind im Folgenden zusammenfassend dargestellt:

#### Einschlusskriterien:

- Urine, welche in einem oder mehreren der folgenden Parameter abnorme Werte aufweisen:
  - Protein
  - Nitrit
  - Leukozyten
  - Erythrozyten/Hämoglobin
  - Vorhandensein von Bakterien, Epithelzellen, Zylinder und Salze im Urinsediment

#### Ausschlusskriterien

- Urine, welche die Einschlusskriterien nicht erfüllen
- Urine, welche ein Gesamtvolumen von 3 ml nicht überschreiten

Anhang 2 gibt den genauen Ablaufplan zur Gewinnung der humanen Urinproben wieder.

### 2.2. Ergebnisse der Urinanalyse

Alle gesammelten Urine wurden am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik einer physikochemischen Urinanalyse untersucht. Dazu wurden die Fertigtteststreifen „COMBUR 5 Test HC“ der Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH verwendet. Tabelle 1 fasst das Ergebnis dieser Untersuchungen zusammen. Insgesamt konnten in einem Zeitraum von 6 Monaten die angestrebten 1.000 Urinproben gesammelt werden. Diese Urinproben erfüllten alle die vorgegebenen Einschlusskriterien und konnten so für die weiteren Untersuchungen im Rahmen des hier vorliegenden Forschungsprojektes verwendet werden.

Parameter	Prävalenz (Anzahl am Gesamtpool)
Blut im Urin	50,8 % (508 von 1.000)
Nitrit im Urin	7,7 % (77 von 1.000)
Proteine im Urin	67,7 % (677 von 1.000)
Leukozyten im Urin	38,3 % (383 von 1.000), Mittelwert: 269 Leukozyten pro $\mu\text{l}$ , Standardabweichung: 1041

Tab. 1.: Ergebnisse der Urinanalyse

### 2.3. Optimierung von Methoden zur RNA-Isolation aus Urinproben

Bevor mit der Untersuchung der humanen Urinproben begonnen wurde, sollte zunächst eine optimale Methode zur Isolation von viraler RNA aus diesen Proben etabliert werden. Aus der Vielzahl der kommerziell verfügbaren Systeme zur Aufreinigung von RNA wurden dabei nach entsprechenden Vorversuchen zwei Produkte für die weitere Analyse favorisiert:

- "Urine Total RNA Purification Maxi Kit" (Norgen Biotek, Kanada)
- "QIAamp Viral RNA Mini Kit" (Qiagen, Hilden)

Um die beiden Systeme hinsichtlich Qualität und Stabilität der gewonnenen RNA miteinander vergleichen zu können, wurden 10 ml humaner Urin mit  $1 \cdot 10^6$  Partikeln des Masernvirus (Edmonston-Impfstamm) inokuliert und jeweils 1 ml dieser so generierten Paramyxovirus-positiven Urins mit den beiden oben genannten Produkten aufgereinigt. Mit der so isolierten RNA wurde dann eine Paramyxovirus-PCR durchgeführt. Abbildung 1 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

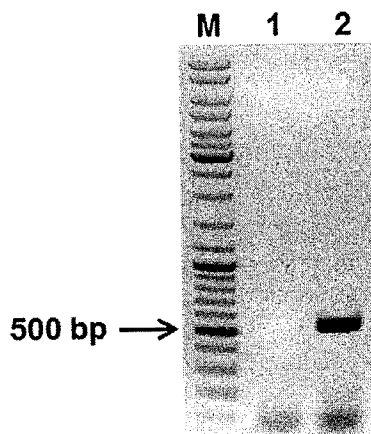


Abb. 1.: Effektivität verschiedener RNA-Ufreinigungs-Kits.

M: DNA-Größenstandard, 1: Norgen-Urin-Kit, 2: Viral-RNA-Kit

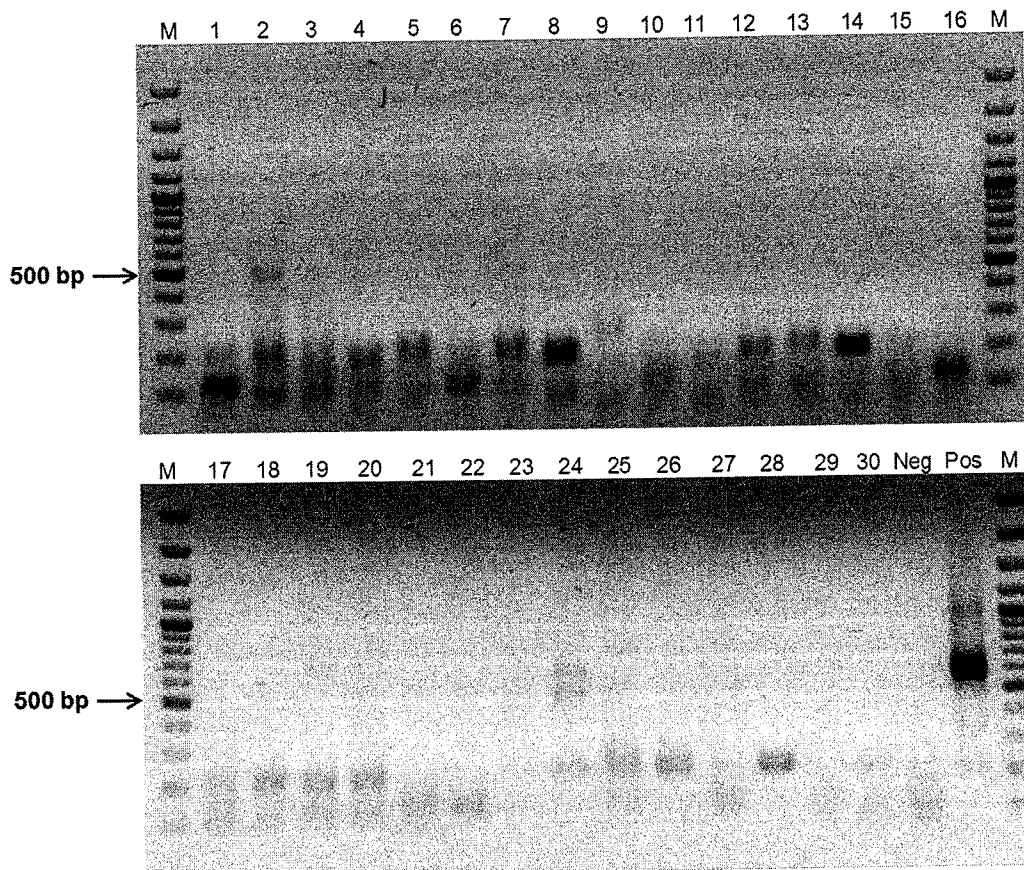
Aus diesen Versuchen wurde deutlich, dass das Norgen-Urin-Kit nicht geeignet ist um virale RNA aus Urinproben aufzureinigen. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung des Viral-RNA-Kits der Firma Qiagen die Paramyxovirus-RNA in der Urinprobe wiedergefunden werden (siehe dazu Abb. 1: Bei Verwendung des viral-RNA-Kits konnte eine spezifische Paramyxovirus-Bande

mit einer Größe von ca. 500 bp nachgewiesen werden [Probe 2]. Dies war beim Norgen-Urin-Kit [Probe 1] nicht der Fall).

Basierend auf diesen Resultaten wurden für die nachfolgenden Analysen der humanen Urinproben das "QIAamp Viral RNA Mini Kit" verwendet.

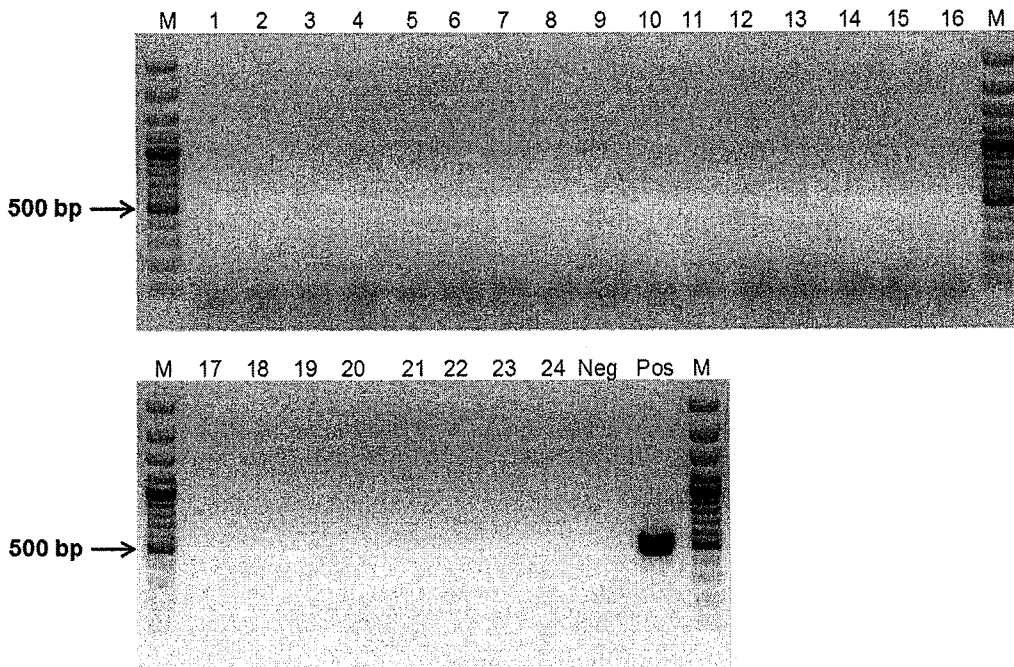
#### 2.4. Vorkommen von Paramyxoviren in humanen Urinproben

Für die Analyse der humanen Urinproben zum Vorkommen von Paramyxoviren wurde die durch Tong *et al.* publizierte Methode (2008) verwendet. Dazu wurden je 9 µl isolierter RNA mittels einer „One-Step-RT-PCR“ analysiert. Abbildung 2 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieser Untersuchungen.



**Abb. 2: Repräsentatives Ergebnis einer Paramyxovirus-PCR von humanen Urinproben.**  
M: DNA-Größenstandard, 1-30: humane Urinproben, Neg: Negativ-Kontrolle, Pos: Positiv-Kontrolle

Daraus wird ersichtlich, dass bei fast allen Proben unspezifische Fehlbanden auftraten (PCR-Amplifikate < 600 bp). Weitergehende Analysen ergaben, dass es sich dabei um Fehlprodukte auf Grund kontaminierender genomischer DNA handelte. Um diese Kontaminationen zu entfernen, wurden alle RNA-Proben vor Verwendung in der Paramyxovirus-PCR mit DNase I behandelt. Abbildung 2 zeigt das PCR-Ergebnis nach einer solchen DNase I-Behandlung. Dabei wird deutlich, dass die Fehlamplifikate signifikant reduziert werden konnten. Das so optimierte Verfahren wurde nun auf alle 1.000 isolierten RNA-Proben aus den humanen Urinen angewandt. Dabei konnte in keinem Fall ein Paramyxovirus-Nachweis festgestellt werden. Damit konnte im Laufe des hier vorliegenden Forschungsprojektes nachgewiesen werden, dass entgegen der Arbeitshypothese in humanen Urinen von Patienten mit Nierenerkrankungen keine Paramyxoviren nachweisbar sind.



**Abb. 2: Repräsentatives Ergebnis einer Paramyxovirus-PCR von humanen Urinproben nach Vorbehandlung mit DNase I.**

M: DNA-Größenstandard, 1-24: humane Urinproben, Neg: Negativ-Kontrolle, Pos: Positiv-Kontrolle

### 3.) Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes konnte eine optimierte Methode zur Isolation von viraler RNA aus humanen Urinproben etabliert werden. Des Weiteren wurde eine bereits bestehende Paramyxovirus-spezifische PCR hinsichtlich ihrer Spezifität verbessert. Damit konnten zwei wesentliche Ziele des Forschungsprojektes erreicht werden.

Daneben wurden im Verlaufe dieser Arbeit 1.000 humane Urinproben von Patienten mit Nierenerkrankungen gesammelt und asserviert. Die Untersuchung zum Vorkommen von Paramyxoviren in diesen Proben verlief in allen Fällen negativ.

Damit konnte gezeigt, dass die im Vorfeld angenommene Arbeitshypothese zur möglichen Assoziation von Paramyxoviren mit Nierenerkrankungen des Menschen im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

### 4.) Anhang

Anhang 1: Ethikvotum

Anhang 2: Ablaufplan zur Patientenstudie

Anhang 3: Verwendungsnachweis der Finanzmittel