Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 9:28 IRST on Tuesday February 20th 2018

تعیین همراهی ویروس ابشتین بار با لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B به روش CISH در بیماران با تشخیص لنفوم

فرید کوثری[۱]
حمیدرضا یاریگر روش[۱*]
ملیحه رضوان[۲]

۱- گروه پاتولوژی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه علوم آزمایشگاهی، بیمارستان آتیه، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، میدان حسن‌آباد، خیابان امام خمینی، بیمارستان سینا تلفن: ۶۶۳۴۸۵۰۱-۰۲۱
E-mail: hyarigar@yahoo.com

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۳۱

زمینه و هدف: لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B شایع‌ترین نوع از لنفوم‌های غیرهوچکینی می‌باشد. نقش ویروس ابشتین بار در ایجاد این لنفوم شناخته شده است. این مطالعه قصد دارد تا میزان همراهی ویروس ابشتین بار را با لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B به روش Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) در بیماران بخش پاتولوژی بیمارستان‌های شریعتی و سینا در سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۴ مورد بررسی قرار دهد.

روش بررسی: این مطالعه به صورت مورد- شاهدی (Case/ control) بر روی ۱۰۰ نمونه پاتولوژی انجام گرفته که ۵۰ مورد از نمونه‌های لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B (DLBCL) در گروه مورد و ۵۰ مورد نمونه‌های غدد لنفاوی واکنشی و لوزه، در گروه کنترل قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها آماده و به روش CISH جهت کشف EBV Encoded RNA (EBER) مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آنالیز آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: هشت مورد از ۵۰ نمونه گروه مورد برای EBER مثبت بودند درحالی که تنها دو مورد در گروه کنترل مثبت گردید که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P=۰/۰۴۶). بین رخداد گره‌ای و خارج گره‌ای و هم‌چنین جنسیت مرد و زن تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد (P=۰/۷۳۶، P=۰/۷۴۶).

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که EBER CISH نسبت به روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry, IHC) روش موفق‌تری در شناسایی ویروس EBV می‌باشد. ما پیشنهاد می‌نماییم در مطالعات آینده تحلیل‌های آماری مقایسه‌ای بین سه روش Polymerase Chain Reaction (PCR) و IHC و CISH انجام پذیرد.

کلمات کلیدی: ویروس ابشتین بار (EBV)، لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B (DLBCL).

مقدمه

ویروس ابشتین بار (Epstein Barr Virus, EBV) یک هرپس ویروس انسانی است که در تمام جمعیت‌های انسانی یافت می‌شود و شیوع آن در بزرگ‌سالان به بیش از ۹۰٪ می‌رسد. این ویروس دارای DNA genome می‌باشد و از طریق رسپتور CD21 به لنفوسیت‌های B می‌چسبد و ژنوم خود را وارد آن می‌نماید.[۱] پس از ورود در مرحله حاد به تکثیر می‌پردازد. ورود به فاز نهفته همراه با بیان انواع پروتیین‌ها مانند LMP، EBNA دو RNA کوچک به نام‌های EBV Encoded RNA 1 (EBER-1) و EBV Encoded RNA (EBER-2) می‌باشد.[۲] سه الگوی بروز نهفتگی وجود دارد. در نوع یک و دو نهفتگی که همراه با بیان محدودتر آنتی‌ژن‌های EBV می‌باشد، با بدخیمی‌هایی چون لنفوم بورکیت و T cell lymphoma ارتباط دارد.[۱] در نوع سه نهفتگی که تمامی آنتی‌ژن‌های EBV و دو RNA کوچک ذکر شده بیان می‌گردند همراهی با ضایعات لنفوپرولیفراتیو مانند Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) دیده می‌شود.[۱] RNA هایی که تحت عنوان EBER-1 و EBER-2 نامیده می‌شود فراوان‌ترین رونوشت‌ها را در فاز نهفتگی به خود اختصاص می‌دهد که در حدود

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 9:28 IRST on Tuesday February 20th 2018

یک تا ۱۰ میلیون نسخه در هر سلول از سلول‌های آلوده به EBV را شامل می‌شوند.[۳] فراوانی رونوشت‌های EBER منجر به استفاده از این RNAها جهت پروسه‌های پاتولوژیک استاندارد و تشخیص بدخیمی‌های ایجاد شده توسط ویروس EBV شده است.[۴-۶] بدخیمی لنفوسیت‌های B (لنفوم سلول‌های B) بیش از ۷۰۰۰۰ مورد از موارد جدید یا ۶٪ کل سرطان‌های آمریکا را تشکیل می‌دهد. لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B شایع‌ترین نوع لنفوم سلول‌های B را به خود اختصاص داده و به طور کلی در حدود ۳۰٪ الی ۴۰٪ کل لنفوم‌ها را شامل می‌شود.[۷و۸] در مطالعات مختلف همراهی ویروس EBV با DLBCL به اثبات رسیده است.[۹-۱۱] و هم‌چنین جهت کشف ژنوم ویروس از روش‌های مختلفی چون IHC, PCR, EBER CISH استفاده شده است[۱۲-۱۴] که در برخی مطالعات از EBER CISH به عنوان Gold standard تشخیص EBV یاد شده است.[۱] با توجه به افزایش شیوع بیماری‌های غیر واگیر در کشورهای در حال توسعه و همراهی ویروس ابشتین بار با بدخیمی‌هایی نظیر لنفوم‌ها، سیستم‌های بهداشتی باید در جهت کنترل بیماری‌های غیر واگیر و کاهش بروز سرطان از طریق اقدامات پیشگیرانه عمل نمایند. لذا در این مطالعه به بررسی ارتباط بین ویروس ابشتین بار با لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B به روش CISH می‌پردازیم.

روش بررسی

این مطالعه به روش مورد- شاهدی (Case- control) انجام گردید. نمونه‌های مورد پژوهش در گروه مورد از میان جمعیت بیمارانی انتخاب شدند که تشخیص پاتولوژی آن‌ها در فاصله سال‌های ۱۳۸۴ الی ۱۳۸۶، Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) بود. نمونه‌های مورد بررسی در گروه کنترل نیز از جمعیتی مشابه با گروه مورد انتخاب شدند و مجموعه‌ای از بافت‌های لوزه نرمال و غدد لنفاوی- واکنشی افراد به ظاهر سالم یا غیر مبتلا به لنفوم بودند. با توجه به مطالعات مختلف میانگین مثبت بودن DLBCL به وسیله روش EBER CISH، ۱۰٪[۱۱-۱۳] و میانگین شیوع EBV به این روش در گروه کنترل ۲٪[۱۴-۱۶] بود که در فرمول‌های آماری قرار گرفت و حجم نمونه کل ۲۰۰ مورد (۱۰۰ مورد در هر گروه) برآورد گردید. لیکن به دلیل محدودیت هزینه‌های این طرح و با مشاوره آماری حداقل حجم نمونه جهت معنی‌دار بودن تحلیل آماری در هر گروه ۵۰ مورد محاسبه شد. هزینه این طرح از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و منابع شخصی تامین گردید. پس از مشخص شدن حجم نمونه با رعایت ملاحظات اخلاقی تمام بلوک‌های موجود در بخش پاتولوژی بیمارستان سینا و شریعتی که کیفیت مناسب داشتند انتخاب شدند و پس از برش‌های لازم به همان بخش عودت داده شدند. با توجه به این نکته که مواد، محلول‌ها، ظروف و دست‌های آلوده همگی محتوی RNAase می‌باشند و جهت in situ hybridization EBER محیط کار باید عاری از RNAase باشد، بدین منظور تمامی ظروف در داخل Oven با درجه حرارت ۲۰۰ $^{\circ}$C به مدت یک شب قرار داده شدند. در تمامی مراحل آزمایش از آب RNAase free استفاده گردید. در ابتدا این آب مورد نظر با نام تجاری Depth water به کار گرفته شد و در میانه راه جهت سهولت کار و صرفه‌جویی در هزینه با حفظ کیفیت آزمایش از محلول RNAase inhibitor (SIGMA-ALDRICH) استفاده شد. در این پروژه تا قبل از مرحله هیبریدیزاسیون از دستکش‌های استریل و سر سمپلرهای تکنیک PCR استفاده شد که RNAase free بودند. در این مطالعه از کیت (Epstein-Barr Virus (EBER) PNA Probe/Fluorescein, Dako, Glostrup, Denmark Code No. Y5200) استفاده گردید.

مراحل انجام Chromogenic in situ hybridization17:

آب‌رسانی (Rehydration) بلوک‌های پارافینه: با غوطه‌ور کردن اسلایدها در الکل‌های با رقت کاهش یابنده انجام پذیرفت و سپس نیز با قلم‌های مخصوص Dako دور تا دور هر نمونه خط‌کشی شد.

مرحله Pretreatment: در این مرحله اسلایدها در یک محوطه مرطوب قرار گرفتند و بر روی هر یک ۱۵۰ میکرولیتر از پروتیناز K افزوده شد و به مدت ۳۴ دقیقه در این محیط انکوبه شدند.

Hybridization: در این مرحله بر روی هر اسلاید، یک تا دو قطره از RNA probe ریخته شد که این عمل برای نمونه‌های مثبت و منفی نیز توسط پروب‌های مخصوص خود انجام گرفت. پس از بستن درب محیط مرطوب، نمونه‌ها در انکوباتور ۵۵ $^{\circ}$C به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شدند و سپس در یک انکوباتور مرطوب ۵۵ $^{\circ}$C به مدت ۲۵ دقیقه تکان داده شدند.

Detection: در این مرحله که آخرین مرحله In situ hybridization به شمار می‌رود، اسلایدهای آماده شده در مرحله قبل

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 9:28 IRST on Tuesday February 20th 2018

در محیط مرطوب قرار گرفته و بر روی هر یک از آن‌ها دو تا پنج قطره از Anti-FITC/AP چکانده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه لام‌ها در همان محیط انکوبه شده و بعد از شست و شو، به مدت شش دقیقه در محیط TBS غوطه‌ور گردیده و سپس با آب خالص شست و شو داده شدند. لام‌ها مجددا در محیط مرطوب قرار گرفته و بر روی هر یک از آن‌ها دو تا سه قطره از سوبسترای رنگی اضافه شده و به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه (بر حسب تغییر رنگ لام) انکوبه گردیده و مجددا لام‌ها شسته شده و پس از قرار گرفتن در آب خالص، مراحل In situ hybridization به پایان رسید. پس از مراحل فوق، لام‌ها در صورت لزوم به مدت پنج دقیقه در محیط هماتوکسیلین غوطه‌ور شده و با چسب لامل مخصوص که محلول در آب است، لامل‌ها بر روی لام‌ها قرار گرفته و سپس در زیر میکروسکوپ قرار داده شدند، که در زیر میکروسکوپ و در بزرگ‌نمایی بالا و در زمینه قهوه‌ای کم‌رنگ، هسته سلول‌های حاوی EBV EBER به رنگ آبی تیره- قهوه‌ای تیره در می‌آیند. به منظور پرهیز از تفسیر Artifact به عنوان جواب مثبت، این نمونه‌ها توسط پاتولوژیست مشاهده گردیده و با Positive control مقایسه شدند. در طی پروسه، کنترل مثبت شامل یک نمونه DLBCL بود که مثبت بودن EBV روی آن به واسطه تکنیک PCR مشخص گردیده بود و هم‌چنین نمونه‌ای از کارسینوم نازوفارنکس که مثبت بودن آن توسط IHC و PCR تایید شده بود.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۵۰ نمونه گروه Case (بیماران مبتلا به لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B) و ۵۰ نمونه گروه کنترل (۲۹ مورد غدد لنفاوی واکنشی و ۲۱ مورد خارج گروهی که اغلب بافت لوزه است) انجام گرفت. میانگین سنی گروه Case ۴۸/۳۲ با انحراف‌معیار ۱۷/۴۱سال بوده اما در گروه کنترل میانگین سنی افراد ۳۳/۹ با انحراف‌معیار ۲۱/۳۶ سال به دست آمد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P=۰/۰۰۱). نحوه توزیع جنسی در گروه مورد بدین صورت است که ۲۳ نمونه را زنان و ۲۷ نمونه را مردان تشکیل می‌دهند در حالی که در گروه کنترل ۲۴ مورد از نمونه‌ها را زنان و ۲۶ مورد را مردان تشکیل می‌دهند. در گروه مورد ۳۱ مورد رخداد درون غده لنفاوی و ۱۹ مورد خارج گره‌ای بود. در گروه کنترل ۲۹ مورد غده لنفاوی و ۲۱ مورد بافت لوزه موجود بود. پس از انجام آزمون EBER CISH در گروه Case هشت مورد (۱۶٪) از نمونه‌ها آزمون EBER مثبت داشتند در حالی که در گروه کنترل دو مورد (۴٪) از نمونه‌ها با آزمون EBER مثبت گزارش شدند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۴۶). حداکثر سن افراد با آزمون EBER مثبت در گروه Case ۷۳ سال و حداقل آن ۲۸ سال و در گروه کنترل حداکثر سن نمونه دارای EBER مثبت ۱۹ سال و حداقل آن ۹ سال به دست آمد و بر اساس آنالیزهای آماری، شیوع لنفوم منتشر سلول‌های B بزرگ در سنین بالاتر شایع‌تر می‌باشد. پنج مورد از موارد EBER مثبت در گروه Case را مردان و سه مورد را زنان تشکیل می‌دادند در حالی که در گروه کنترل، یک مورد از موارد EBER مثبت را مردان و یک مورد را زنان تشکیل می‌دادند و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (P=۰/۸۴۱). شش مورد از موارد مثبت EBER در گروه Case در داخل غدد لنفاوی (گرهی) و دو مورد خارج گرهی بودند، در حالی که در گروه کنترل یک مورد از موارد مثبت مربوط به غدد لنفاوی و یک مورد مربوط به لوزه بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (P=۰/۷۳۶). در آنالیز لجستیک رگرسیون تک متغیره، شانس ابتلا به DLBCL در گروه EBER مثبت ۴/۶ برابر گروه EBER منفی بود که از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید (P=۰/۰۶۳، CI٪۹۵=۰/۹-۲۲/۷، OR=۴/۶). هم‌چنین مشخص شد که

جدول- ۱: مشخصات دموگرافیک بیماران مورد مطالعه

مشخصات	گروه	تعداد	میانگین	انحراف‌معیار
سن	مورد	۵۰	۴۸/۳۲	۱۷/۴۱
	کنترل	۵۰	۳۳/۹	۲۱/۳۶
جنس	مورد	۲۷		
		۲۳		
مرد	کنترل	۲۶		
زن		۲۴		
محل گرهی	مورد	۳۱		
		۱۹		
خارج گرهی	کنترل	۲۹		
		۲۱		

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 9:28 IRST on Tuesday February 20th 2018

جدول- ۲: نتایج آزمون EBER

آزمون EBER	گروه	تعداد	درصد	جنسیت		محل درگیری	
				مذکر	مونث	داخل گرهی	خارج گرهی
مثبت	مورد	۸	۱۶	۵	۳	۶	۲
	کنترل	۲	۴	۱	۱	۱	۱
منفی	مورد	۴۲	۸۴	۲۲	۲۰	-	-
	کنترل	۴۸	۹۸	۲۵	۲۳	-	-
P*			۰/۰۴۶*	۰/۷۴۶		۰/۷۳۶	

* سطح معنی‌داری: P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل، آزمون آماری: t-test.

EBER: EBV Encoded RNA

فاکتور سن به صورت یک متغیر پیشگویی‌کننده برای ابتلا به لنفوم می‌باشد به نحوی که با افزایش هر سال از عمر، شانس ابتلا ۱/۰۴ برابر می‌گردد (P=۰/۰۰۱، CI٪۹۵=۱/۰۲-۱/۰۶، OR=۱/۰۴) به همین ترتیب، در آنالیز تک متغیره بین موارد مثبت و منفی EBER از نظر توزیع جنسی (نسبت مرد به زن ۶۰٪ به ۴۰٪ در گروه EBER مثبت و نسبت ۵۲٪ به ۴۸٪ در گروه EBER منفی با P=۰/۷۴۶) و نیز محل درگیری (۷۰٪ از موارد داخل گرهی در گروه EBER مثبت در برابر ۵۹٪ موارد داخل گرهی در گروه EBER منفی با (P=۰/۷۳۶) اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت.

بحث

یافتن DNA و RNA ویروس ابشتین بار در بافت‌های تومورال از طریق مطالعات مختلف انجام گرفته و مطرح کننده وجود ویروس قبل از گسترش کلونال سلول‌های تومورال می‌باشد. نقش ویروس ابشتین بار در پاتوژنز بیماری‌ها و ارزش تشخیصی و درمانی آن هم چنان مورد تحقیق و بررسی قرار دارد. شواهد استقرار ژن‌های EBER-1 و EBER-2 در سلول‌های وارد شده به مرحله نهفته، به وسیله مطالعات In situ hybridization به دست آمده و با این نظریه که RNA های کوچک در تنظیم ترجمه آن‌ها نقش دارند، موافق می‌باشد. این مطالعه به صورت مورد- شاهدی انجام گردید بدین صورت که ۵۰ مورد از بیماران مبتلا به DLBCL انتخاب شدند و سعی بر این بود که گروه کنترل انتخابی نیز در مواردی نظیر سال وقوع، سن، جنس، محل و غیره مشابه گروه مورد باشند. به لحاظ روش اجرا نظیر این نوع مطالعه قبلا انجام نگرفته بود. در مطالعات قبلی میزان شیوع EBV در بلوک‌های پارافینه DLBCL با روش CISH از ۱۲-۵٪ برآورد شده بود.[۱و۱۱-۱۳] که در این مطالعه در گروه مورد ۱۶٪ به‌دست آمد. این مقدار در گروه کنترل در مطالعات قبلی بین دو تا ۳٪ برآورد شده بود[۱۵و۱۶] که در این مطالعه نیز شیوع در گروه کنترل ۴٪ به‌دست آمد. در مطالعات انجام گرفته محدوده سنی بیماران مبتلا به لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B بین ۸۰-۲۹ سال می‌باشد که میانگین سنی آن ۶۵ سال است که در مطالعه حاضر نیز محدوده سنی بیماران بین ۱۱ تا ۸۴ سال می‌باشد و میانگینی برابر ۴۸/۲ سال دارد.[۱۴و۱۸]

شاید بتوان چنین مطرح نمود که به علت مواجهه زودتر و بیش‌تر افراد در کشورهای در حال توسعه با ویروس EBV وقوع DLBCL وابسته به این ویروس در دهه‌های پایین‌تر رخ می‌دهد.[۱۴،۱۸] در مطالعات قبلی الگوی توزیع جنسی DLBCL و هم‌چنین مثبت بودن EBER در زنان و مردان تقریبا برابر بوده است که در این مطالعه نیز همین میزان به‌دست آمد.[۱۲و۱۴و۱۸]

هم‌چنین در مطالعات قبلی توزیع DLBCL در غدد لنفاوی و خارج غدد لنفاوی و موارد مثبت EBER در این دو مکان تقریبا برابر بوده که در این مطالعه نیز همین میزان به‌دست آمد.[۱۲و۱۴و۱۸] از مزایای استفاده از روش EBER CISH آن است که به راحتی در یک کیت در دسترس می‌باشد و در منابع مختلف به عنوان Gold standard مطرح می‌باشد. از محدودیت‌های انجام این روش گران بودن کیت مورد استفاده و دیگر آن‌که محیط باید عاری از RNA باشد. در این مطالعه همراهی ویروس ابشتین بار با لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B به روش CISH بررسی گردید و ۱۶٪ بیماران مبتلا به لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ EBER مثبت می‌باشند در حالی‌که در گروه کنترل ۴٪ از افراد مورد مطالعه دارای نتیجه مثبت از نظر آزمون EBER بودند. بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مقالات EBER CISH روش موفقی در شناسایی ویروس ابشتین بار می‌باشد. شیوع DLBCL و هم‌چنین مثبت شدن EBER در مردان اندکی بیش از زنان بود و این برتری در گره‌های لنفاوی نیز نسبت به بافت غیر لنفاوی وجود داشت. متاسفانه در این مطالعه سن درگیری DLBCL و نوع EBER positive آن نسبت به مقالات دیگر با حداقل دو دهه کاهش

به دهه‌های چهار و پنج سوق پیدا کرده بود که امید است با انجام اقدامات تشخیصی صحیح نظیر استفاده از کیت EBER و غربالگری مناسب بیماران و هم‌چنین ارایه راهکارهای درمانی مناسب این مورد نیز مرتفع گردد.

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "تعیین همراهی ویروس ابشتین بار با لنفوم منتشر سلول‌های بزرگ B به روش CISH" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۸۹ به کد ۱۰۹۱۳ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

References

1. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001;3(1):1-10.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 377-9.
3. Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(23):9006-10.
4. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am J Pathol* 1994;145(2):239-52.
5. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. *Histopathology* 1994;25(2):101-11.
6. Tsai ST, Jin YT, Wu TC. Synthesis of PCR-derived, digoxigenin-labeled DNA probes for in situ detection of Epstein-Barr early RNAs in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol Methods* 1995;54(1):67-74.
7. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(25):1937-47.
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.
9. Rhinow K, Schirmer I, Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Stein H, Reichart PA. Oral EBV-associated diffuse large B-cell lymphomas in HIV-negative immunocompromised patients. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2006;10(3):155-61.
10. Camilleri-Broët S, Raphaël M. Physiopathogenic aspects of HIV-associated primary brain lymphomas. *Rev Neurol (Paris)* 2006;162(1):57-61.
11. Hassan R, White LR, Stefanoff CG, de Oliveira DE, Felisbino FE, Klumb CE, et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol* 2006;1:17.
12. Hoeller S, Tzankov A, Pileri SA, Went P, Dirnhofer S. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. *Hum Pathol* 2010;41(3):352-7.
13. Williams ME. Effect of EBV in diffuse large B-cell lymphoma. J Watch Oncol Hematol. [Internet] 2007 Aug 14 [cited 2012 May 15]; Available from: http://oncology-hematology.jwatch.org/cgi/content/full/2007/814/1
14. Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007;110(3):972-8.
15. Ohshima K, Kikuchi M, Eguchi F, Masuda Y, Sumiyoshi Y, Mohtai H, et al. Analysis of Epstein-Barr viral genomes in lymphoid malignancy using Southern blotting, polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990;59(6):383-90.
16. Shibata D, Weiss LM, Nathwani BN, Brynes RK, Levine AM. Epstein-Barr virus in benign lymph node biopsies from individuals infected with the human immunodeficiency virus is associated with concurrent or subsequent development of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1991;77(7):1527-33.
17. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed. Philadelphia, Pa: WB. Saunders; 2007. p. 1234-7.
18. Kuze T, Nakamura N, Hashimoto Y, Sasaki Y, Abe M. The characteristics of Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B-cell lymphoma: comparison between EBV(+) and EBV(-) cases in Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 2000;91(12):1233-40.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 9:28 IRST on Tuesday February 20th 2018

TUMJ Tehran University Medical Journal, September 2012; Vol. 70, No. 6: 351-356 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 9:28 IRST on Tuesday February 20th 2018

Determining the correlation of Epstein-Barr virus with diffuse large B-cell lymphoma by chromogenic in situ hybridization

Farid Kosari M.D.[1]
Hamid Reza Yarigarravesh M.D.[1*]
Malihe Rezvan M.Sc.[2]

1- Department of Pathology, School of Sciences, Sina Hospital, Tehran University, Tehran, Iran.
2- Department of Laboratory Medicine, Atieh Hospital, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Sina Hospital, Hassan abad Sq., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 66348501
E-mail: hyarigar@yahoo.com

Abstract

Received: April 21, 2012 Accepted: June 20, 2012

***Background*:** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma. There are various types of DLBCL including immunoblastic and centroblastic. Epstein-Barr virus (EBV) is a member of Herpes virus family found in all human populations inducing different lymphoproliferative disorders. The role of EBV in the development of DLBCL is known. Multiple laboratory methods are available for detecting EBV. This study was conducted to determine the correlation of EBV with DLBCL in samples referred to pathology ward in Shariati and Sina Hospitals by chromogenic in situ hybridization (CISH) method.

***Methods*:** In this case/control study, pathological specimens of 50 patients with DLBCL as well as 50 reactive lymph nodes and tonsils (control group) were collected from archives of Shariati and Sina Hospitals and were evaluated for EBV encoded RNA (EBER) expression based on CISH method. A peptide nucleic acid (PNA) EBV probe (Dakocytomatin) was used while all the processes were done in RNAase-free conditions using RNAase-free water, sterile gloves and samplers.

***Results*:** Out of fifty specimens in the case group, eight were positive for EBER in comparison with two in the control group (P=0.046). No statistically significant difference was observed between intranodal or extranodal samples (P=0.736) or between males and females (P=0.0746).

Conclusion: Our study showed that EBV positivity for EBER in patient with DLBCL could be determined more effectively by CISH method than immunohistochemistry (IHC). Comparative analysis between CISH, PCR and IHC methods is recommended.

Keywords: chromogenic in situ hybridization (CISH), diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), epstein-barr virus (EBV), EBV encoded RNA (EBER).