دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و پنجم، شماره ۴، صفحه ۳۳۹-۳۲۶ (مهر و آبان ۱۴۰۱)

Iran South Med J 2022; 25(4): 326-339

شناسایی مولکولی ویروس اپشتن بار در نمونه‌های بیوپسی مبتلایان به سرطان مثانه در استان بوشهر، ایران

رضا طاهرخانی (PhD)[۱و۲*]، محمدرضا فرزانه (MD)[۳]، سکینه طاهرخانی (PhD)[۴]، اعظم امینی (MD)[۲]، فائزه کشتکار (MD)[۱]، مریم آقاسی‌پور (MD)[۱]، آرزو بدری (MD)[۱]، زهرا عنایی (MD)[۱]، فاطمه فرشادپور (PhD)[۱و۲**]

[۱] گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۲] مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، پژوهشکدهٔ علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۳] گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۴] گروه مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۲۹- پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱)

چکیده

زمینه: سرطان مثانه ششمین سرطان شایع در مردان و دهمین نوع سرطان در زنان است. نقش عفونت‌های ویروسی در ایجاد سرطان مثانه در سال‌های اخیر بسیار مورد بحث قرار گرفته است. نقش ویروس اپشتن بار (EBV) به‌عنوان کوکارسینوژن در برخی از سرطان‌های انسانی اثبات شده است. لذا هدف این پژوهش، بررسی مولکولی EBV در تومورهای مثانه در استان بوشهر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر یک مطالعه توصیفی- تحلیلی است. جمعیت مورد مطالعه شامل بیوپسی‌های بافت مثانه افراد مبتلا به سرطان مثانه مراجعه کننده به بیمارستان شهدای خلیج‌فارس بوشهر می‌باشد. بافت بیوپسی مثانه پارافینه مربوط به ۱۸۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه با میانگین سنی ۱۳/۷۸±۶۴/۵۲ و همچنین تعداد ۳۰ نمونه بافت مثانه غیرسرطانی به عنوان گروه کنترل، بعد از پارافین‌زدایی و تخلیص اسیدنوکلئیک، جهت آزمون‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور اطمینان از عدم حضور مهارکننده‌های PCR ابتدا شناسایی ژن بتاگلوبین انسانی به‌عنوان کنترل داخلی و سپس شناسایی ژن BKRF1 ویروس EBV با روش nested PCR انجام گردید. در پایان از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ جهت تجزیه تحلیل داده‌ها و آزمون‌های آماری استفاده شد.

یافته‌ها: از ۱۸۱ بافت کارسینوم مثانه مورد مطالعه، ۷ مورد (۳/۹ درصد) با ویروس EBV آلوده بودند، ولی رابطه آماری معناداری میان سن، جنس، مرحله و درجه تومور با مثبت شدن نمونه از نظر ویروسEBV مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). همچنین در هیچ‌کدام از نمونه‌های غیرسرطانی به‌عنوان گروه کنترل ویروس EBV شناسایی نشد، با این وجود، اختلاف شیوع EBV بین گروه بیماران سرطان مثانه و گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۳۳). همچنین نتایج توالی‌یابی محصولات nested-PCR ژن BKRF1 و رسم درخت فیلوژنیک بیانگر وجود ویروس EBV تایپ ۱ در نمونه‌های مثبت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر و با وجود اینکه درصد عفونت EBV در نمونه‌های سرطانی بیشتر از نمونه‌های غیرسرطانی بود، بعید است که ویروس EBV عامل مؤثری در ایجاد سرطان مثانه در استان بوشهر باشد و احتمالاً در جمعیت مورد مطالعه ما عوامل خطر دیگری همانند آلودگی روزافزون هوا در این منطقه از کشور، مشاغل پرخطر، مصرف دخانیات و سایر عوامل ویروسی سرطان‌زا در اتیولوژی تومور مثانه نقش دارد.

واژگان کلیدی: سرطان مثانه، ویروس اپشتن بار، nested PCR، استان بوشهر

** بوشهر، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

E.mail: F.Farshadpour@yahoo.com
* ORCID: 0000-0001-6499-0531
** ORCID: 0000-0002-8317-9573

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

مقدمه

تومور مثانه (urinary bladder cancer) دهمین سرطان شایع در دنیا و ششمین سرطان شایع در مردان می‌باشد و ۳ درصد کل بدخیمی‌ها را شامل می‌شود که در مردان ۴ برابر شایع‌تر از زنان است (۱). تخمین زده شده در کشوری که ۲۵۰ میلیون جمعیت دارد سالانه حدود ۶۵ تا ۷۵ هزار مورد جدید ابتلا به سرطان مثانه گزارش می‌شود که ۱۳ تا ۱۵ هزار نفر از آن‌ها به علت ابتلا به این تومور جان خود را از دست می‌دهند (۲). سرطان مثانه در کشورهای در حال توسعه بیشتر از کشورهای توسعه یافته می‌باشد (۳ و ۴) و سن شروع این بیماری از دهه چهارم می‌باشد که در دهه ششم، هفتم و هشتم به بیشترین میزان خود می‌رسد (۳). بیش از ۹۰ درصد از سرطان‌های مثانه بصورت کارسینوم‌های سلول‌های انتقالی (Transitional Cell Carcinomas-TCCs) می‌باشد که اکنون به آن کارسینوم سلول‌های یوروتلیال (Urothelial Cell Carcinomas) می‌گویند، در حالی‌که ۱۰ درصد کارسینوما سلول‌های سنگفرشی (SCCs)-squamous cell carcinomas) و آدنوکارسینوما می‌باشد (۵).

فاکتورهای خطر دخیل در سرطان مثانه شامل جنس، سن، فاکتورهای ژنتیکی، مصرف سیگار، تماس شغلی با مواد شیمیایی و سرطان‌زا، مصرف الکل، مصرف گوشت فرآوری شده، مصرف مسکن، شیرین کننده‌های صناعی، رادیوتراپی و کموتراپی، التهاب مزمن مثانه و عوامل عفونی در ایجاد سرطان مثانه می‌باشند (۵ و ۶). عفونت می‌تواند سبب تحریک التهاب شود و عوامل عفونی می‌توانند پیش‌برنده‌های (promoters) ترانسفورماسیون نئوپلاستیک باشند و خطر بدخیمی‌های یورولوژیکال (Urological) با قرار گرفتن در معرض عوامل عفونی مرتبط است. مشخص شده است ویروس‌های مرتبط با سرطان (رتروویروس‌ها، ویروس هپاتیت C و DNA ویروس‌های مختلف) باعث ۱۵ تا ۲۰ درصد از سرطان‌های انسانی می‌شوند (۷).

خانواده هرپس ویریده دارای هشت پاتوژن مهم انسانی شامل ویروس هرپس سیمپلکس ۱ و ۲، ویروس واریسلازوستر، ویروس سیتومگالو، ویروس اپشتین بار (EBV) و ویروس‌های هرپس انسانی ۶، ۷ و ۸ می‌باشد (۸). نقش ویروس EBV به‌عنوان کوکارسینوژن (Co-carcinogen) در برخی سرطان‌های انسانی پذیرفته شده است. گرچه راه اصلی انتقال ویروس EBV از طریق تنفسی است ولی احتمال انتقال ویروس EBV از طریق تماس جنسی نیز وجود دارد (۹) این ویروس می‌تواند علاوه بر خون، از این طریق نیز به بافت مثانه وارد شود. نقش ویروس اپشتن–بار (EBV) به‌عنوان یک کارسینوژن در لنفوم بورکیت (Burkitt lymphoma) و کارسینوما نازوفارنکس (Nasopharyngeal carcinoma) شناخته شده است، همچنین احتمالاً در بدخیمی‌های دیگری شامل لنفوماهای هوچکین و غیرهوچکین (Non-Hodgkin) درگیر می‌باشد که احتمالاً بنظر می‌رسد به‌وسیله مهار آپوپتوزیس سلول‌های لنفوما باشد (۱۰ و ۱۱). همچنین ویروس EBV با برخی از نئوپلازی‌های دیگری همانند لوزه (tonsil)، زبان (tongue)، حنجره (laryngeal)، غده بنا گوشی (parotid)، معده‌ای (gastric) و ریوی (pulmonary) مرتبط می‌باشد (۱۱). علاوه‌براین ویروس EBV در اپیتلیوم گردن رحم تکثیر می‌کند و در بیوپسی‌های گردن رحم بیماران با کارسینوما مهاجم تشخیص داده شده است (۱۲). همچنین ژنوم EBV

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

در مجاری ادراری (urethra) مردان مبتلا به سوزاک مشخص شده است که احتمالاً از طریق تماس جنسی هم منتقل می‌شود (۱۱ و ۱۳).

اگرچه EBV به شدت با تعدادی از سرطان‌های انسانی وابسته است، برخی از سرطان‌ها به میزان زیادی در جمعیت‌های خاص و موقعیت‌های خاص جغرافیایی شیوع پیدا می‌کند که این تفاوت‌ها در شیوع نشان می‌دهد که عوامل محیطی و ژنتیکی نیز بر توسعه سرطان تأثیر گذارند. نخستین بار گازانیگا (Gazzaniga) و همکاران، حضور ژنوم EBV را در ۳۴ درصد از بافت‌های سرطان مثانه گزارش نمودند (۱۴). همچنین در مطالعه دیگری حضور ژنوم EBV در ۲۴ درصد از بافت کارسینوما سلول‌های یوروتلیال گزارش گردید که پیشنهاد کننده نقش این ویروس در ایجاد آلودگی در بدخیمی‌های مجاری ادراری می‌باشد (۱۵). با توجه به اینکه نرخ شیوع سرطان مثانه در دنیا و ایران رو به افزایش است (۱ و ۲) و تاکنون هیچ مطالعه‌ای در جنوب ایران و استان بوشهر به بررسی شیوع ویروس EBV در بیماران مبتلا به کارسینوما مثانه نپرداخته است بنابراین انجام این نوع مطالعات جهت بررسی‌های اپیدمیولوژی برای کاهش بروز سرطان و شناسایی عوامل زمینه‌ساز بروز آن ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی توصیفی- تحلیلی توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بوشهر با کد اخلاق IR.BPUMS.REC.1398.093 و شماره گرنت ۹۳-۲-۱۱۰ تصویب شده است. جمعیت مورد مطالعه شامل بلاک‌های بافت پارافینه افراد مبتلا به سرطان مثانه مراجعه کننده به بیمارستان شهدای خلیج‌فارس بوشهر می‌باشد. اطلاعات موجود در پرونده ۲۱۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه از آرشیو بخش پاتولوژی استخراج گردید. تعداد ۳۰ بیمار بدلیل موجود نبود بلاک بافت پارافینه و یا کیفیت نامناسب بافت بدنبال استخراج DNA، از مطالعه حذف گردید. بنابراین از میان ۲۱۱ بیمار، بافت پارافینه مربوط به ۱۸۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه جهت آزمون‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین تعداد ۳۰ نمونه بافت مثانه غیرسرطانی به‌عنوان گروه کنترل استفاده شدند، که شامل تعداد ۱۱ نمونه بافت مثانه غیرسرطانی که توسط همکار پاتولوژیست در پرونده التهابی و یا هموراژیک (شامل ۶ نمونه Chronic Inflammation، یک نمونه Active Hemorrhagic cystitis، یک نمونه Chronic Inflammation and Eosinophilic Infiltration، دو نمونه Fibromuscular hyperplasia and congested vessels و یک نمونه Fibrosis with mild Inflammation) گزارش شده است و تعداد ۱۹ نمونه بافت نرمال (بدون سرطان و فاقد التهاب) که از نمونه‌های اتوپسی کالبد شکافی اجساد که از پزشکی قانونی گرفته شدند، بود. لام‌های مربوط به تمام نمونه‌ها سرطانی و غیرسرطانی (گروه کنترل) توسط همکار پاتولوژیست تأیید شدند.

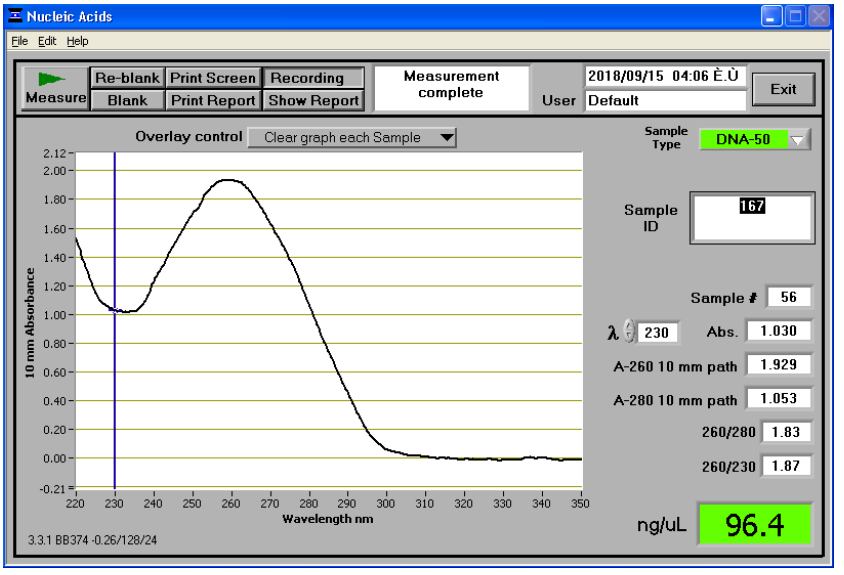
جهت استخراج اسید نوکلئیک (DNA) از نمونه‌های بافتی، ابتدا توسط دستگاه میکروتوم از هر نمونه ۱۰ برش متوالی با ضخامت ۱۰ میکرون تهیه و در لوله اپندرف با حجم ۲ میلی‌لیتر استریل جمع‌آوری شدند. قبل از برش‌های ۱۰ میکرونی، از هر بلاک سه برش ۲۰ میکرونی زده شده و بدلیل در معرض هوا بودن و بجهت جلوگیری از آلودگی دور ریخته شدند. در حین کار با نمونه‌ها احتیاطات لازم جهت اجتناب از آلودگی متقاطع رعایت گردید (۱۸-۱۶). به‌منظور کنترل و اجتناب از آلودگی میان نمونه‌ها، بعد از برش از هر بلاک پارافینه بافت مثانه، از یک بلاک پارافینه بدون

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

بافت نیز برش زده شد و برش‌های پارافینه در میکروتیوب‌ها جمع‌آوری و مراحل تخلیص و PCR در مورد این میکروتیوب‌ها نیز انجام گردید (بدلیل محدودیت هزینه‌ها، محتویات هر ۱۰ میکروتیوب حاوی برش‌ها پارافینه بدون بافت، بعد از پارافین زدایی، در یک حجم بافر لیزکننده جهت تخلیص استفاده شد). در این مطالعه برای استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی از کیت تجاری High Pure PCR Template Preparation Kit از شرکت Roche ساخت کشور آلمان و براساس دستورالعمل آن استفاده گردید. کارایی و بازده این کیت نسبت به کیت‌های تجاری دیگر جهت تخلیص اسیدنوکلئیک قبلاً تأیید شده است (۱۹). خلوص و غلظت اسیدنوکلئیک تخلیص شده با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری گردید (شکل ۱).

جهت شناسایی ویروس اپشتن-بار، از روش Semi-nested PCR و با پرایمرهای اختصاصی ژن BKRF1 (EBNA1 protein) استفاده شد. محصول مرحله اول و دوم PCR به‌ترتیب برابر ۲۹۶ جفت‌باز و ۲۳۰ جفت‌باز می‌باشد (جدول ۱)(۲۰). در مرحله اول و دوم آزمایش، اجزاء PCR با میزان $MgCl_2$ برابر ۲ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP و ۲/۵ یونیت آنزیم DNA پلیمراز و ۲۰۰ نانوگرم الگو به ازای هر واکنش ۵۰ میکرولیتر خواهد بود. شرایط PCR شامل ۵ دقیقه ۹۵ċ، سپس ۳۵ سیکل: دما تقلیب (denaturation) ۹۴ċ بمدت ۶۰ ثانیه، دما اتصال (annealing) ۵۶ċ بمدت ۶۰ ثانیه و دما بسط (extension) ۷۲ċ بمدت ۶۰ ثانیه و مرحله نهایی بسط (elongation final) ۵ دقیقه خواهد بود. به‌منظور تشخیص آلودگی‌های احتمالی در معرف‌های PCR (master mix) یک کنترل فاقد DNA الگو به‌طور روتین استفاده می‌شود همچنین در هر واکنش کنترل مثبت منظور گردید (۲۱).



شکل ۱) ارزیابی کمیت و خلوص **DNA** استخراج شده از بافت‌های پارافینه مثانه با دستگاه نانودراپ

Fig 1) Evaluation of the quantity and purity of DNA extracted from the paraffin tissues of the bladder with the nanodrop device

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

جدول ۱) توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ویروس	پرایمرها	توالی پرایمرها	ناحیه در ژنوم	موقعیت در ژن یا ژنوم	دما اتصال پرایمرها	سایز	منبع
EBV	EB3-F1	AGGAGGGTGGTTTGGAAAG	EBNA1	۹۹۰۳۰-۹۹۰۴۸	۵۶Ć	۲۹۶ bp	۲۰
	EB4-R1	AGACAATGGACTCCCTTAG		۹۹۳۰۷-۹۹۳۲۵			
	EB3-F1	AGGAGGGTGGTTTGGAAAG		۹۹۰۳۰-۹۹۰۴۸	۵۶Ć	۲۳۰ bp	
	EB2-R2	ACTCAATGGTGTAAGACGAC		۹۹۲۳۹-۹۹۲۵۸			
Internal control	PCO3F	ACACAACTGTGTTCACTAGC	β globin gene	۵۲۴۸۱۷۹	۵۵Ć	۱۱۰ bp	۱۹
	PCO4R	CAACTTCATCCACGTTCACC		۵۲۴۸۲۸۸			
	KRAS-F	GGTGAGTTTGTATTAAAAGGTACTGG	KRAS gene	۱۰۴۲۳	۵۵Ć	۲۶۳ bp	
	KRAS-R	TCCTGCACCAGTAATATGCA		۱۰۶۸۶			

به‌منظور ارزیابی و تأیید کیفیت DNA و اجتناب از نتایج منفی کاذب بدلایلی همانند نامناسب بودن DNA تخلیص شده یا بدلیل وجود مهارکننده‌های PCR، یک کنترل داخلی PCR (Intern Control-IC) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن بتاگلوبین (Human β-globin gene) و یا پروتوآنکوژن KRAS برای نمونه‌ها گذاشته شد. جهت کنترل داخلی، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰ برابر غلظت (۱۰X)، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP (۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP)، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر رفت و برگشت، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و DNA ژنومیک با غلظت نهایی ۲۰۰ نانوگرم بود.

حجم ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی DNA Safe Stain، به‌مدت ۱ ساعت در ۱۰۰v الکتروفورز گردید و بوسیله UV transilluminator در طول موج ۲۵۴ نانومولار عکس‌برداری شد. محصول مرحله اول PCR و nested PCR به‌ترتیب برابر ۲۹۶ جفت‌باز و ۲۳۰ جفت‌باز می‌باشد. جهت تأیید نهایی تعدادی از نمونه‌های مثبت با کیت استخراج محصول PCR شرکت Roche تخلیص و جهت توالی‌یابی به شرکت Macrogen کره ارسال شدند. توالی‌یابی با استفاده از روش دی داکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات نشان‌دار با موارد فلئورسنت انجام گردید (۲۲). کیفیت الکتروفروگرام‌ها (Electropherogram) با نرم‌افزار MEGA ویرایش ۱۰/۰ بررسی شدند و نتایج توالی‌یابی در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) در قسمت نوکلئوتید بلاست (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST) جستجو گردید و با توالی‌های موجود در سایت مقایسه گردید، همچنین درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA ویرایش ۱۰ رسم گردید. نتایج به‌دست‌آمده وارد نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ گردید و داده‌ها جهت هر متغییر بصورت میانگین ± انحراف معیار، فراوانی و درصد بیان شدند و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری مربع کای (χ_2) و فیشر (Fisher's exact test) استفاده شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

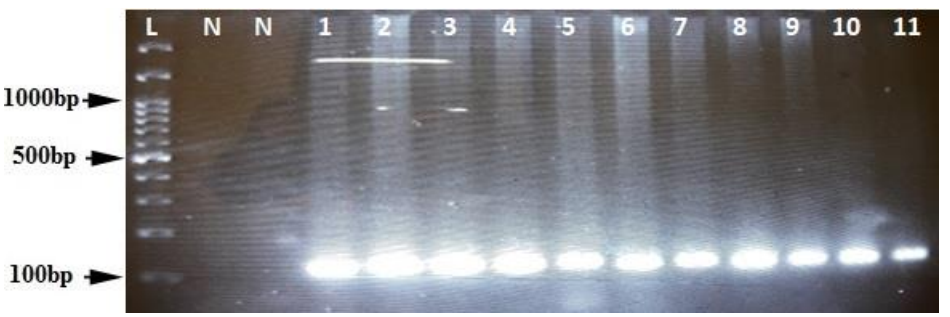
[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

یافته‌ها

از تعداد ۱۸۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه که دامنه سنی برابر ۲۷ تا ۹۲ سال و میانگین سنی ۱۳/۷۸±۶۴/۵۲ داشتند، تعداد ۱۳۸ نفر مرد با دامنه سنی ۲۹ تا ۹۲ سال و میانگین سنی ۱۳/۴۲±۶۵/۴۶ و تعداد ۴۳ نفر زن با دامنه سنی ۲۷ تا ۸۱ سال و میانگین سنی ۱۴/۶۴±۶۱/۴۹ بودند. میانگین سنی بیمارانی که stage آن‌ها T2-T3 است بیشتر از افراد با Ta-T1 می‌باشد. میانگین سنی بیماران با افزایش گرید آن‌ها بیشتر می‌شود به‌طوری که در بیمارن سرطانی با گرید یوروتلیال پاپیلوما میانگین سنی برابر ۷/۲۶±۵۰/۰ می‌باشد و در بیماران با گرید بالا برابر ۱۲/۱±۷۱/۰ است.

از تعداد ۳۰ نمونه بافت مثانه غیرسرطانی به‌عنوان گروه کنترل، تعداد ۱۶ مرد و ۱۴ زن با میانگین سنی ۱۸±۵۸/۷۸ و دامنه سنی ۲۲ تا ۸۴ سال بودند. از تعداد ۳۰ نمونه، تعداد ۱۱ نمونه التهابی و یا هموراژیک بودند و ۱۹ نمونه بافت مثانه نرمال بودند. ۱۸ نمونه از شهرستان بوشهر، ۵ نمونه شهرستان دشتستان، ۲ نمونه گناوه، ۳ نمونه شهرستان تنگستان، ۲ نمونه شهرستان دشتی بودند.

بعد از تخلیص اسید نوکلئیک از تعداد ۳۰ نمونه بافت غیرسرطانی و ۱۸۱ نمونه بافت بیوپسی سرطان مثانه ابتدا با نانودراپ غلظت و خلوص DNA مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱) سپس با PCR از ژن بتاگلوبین به‌عنوان کنترل داخلی جهت اطمینان از عدم حضور مهارکننده‌های PCR بررسی شدند (شکل ۲) سپس جهت شناسایی ژنوم ویروس EBV با تکنیک nested PCR مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳).



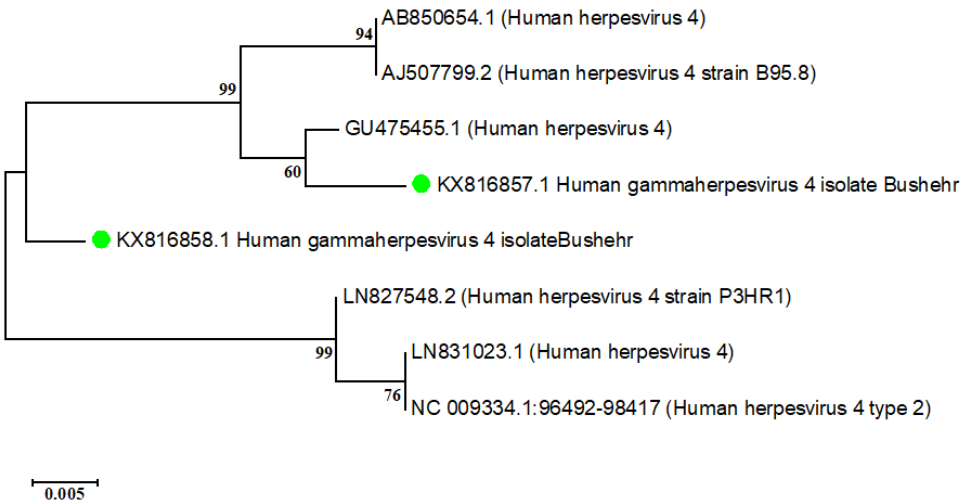
شکل ۲) الکتروفورز ژل آگاروز مربوط به محصولات PCR از ژن بتاگلوبین
Fig 2) Agarose gel electrophoresis of PCR products from betaglobin gene



شکل ۳) الکتروفورز محصولات مرحله دوم آزمون PCR بمنظور تشخیص ژنوم ویروسEBV. الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲درصد. L: نشانگر DNA 100bp (چاهک اول)، N: کنترل منفی، P: کنترل مثبت، محصولات PCR نمونه‌های بیماران (نمونه شماره ۸ با باند اختصاصی ۲۳۰bp ≈).
Fig 3) Electrophoresis of the products of the second round of PCR assay in order to detect EBV genome. Electrophoresis on 2% agarose gel. L: 100bp DNA ladder (first well), N: negative control, P: positive control, PCR products of patient samples (sample number 8 with specific band ≈ 230bp).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

پس از اینکه ۱۸۱ نمونه از نظر ویروس EBV با آزمون nested PCR مورد بررسی قرار گرفتند، در تعداد ۷ مورد (۳/۹ درصد) از نمونه‌ها ژنوم EBV شناسایی گردید و ۱۷۴ مورد (۹۶/۱ درصد) از نظر وجود EBV منفی بودند. شکل ۳ نتایج الکتروفورز محصول PCR مرحله دوم را نشان می‌دهد. همچنین از ۳۰ مورد نمونه کنترل، ویروس EBV در هیچ کدام از نمونه‌ها شناسایی نگردید (p=۰/۳۳). همچنین تعداد ۲ نمونه مثبت EBV جهت توالی‌یابی ارسال گردید و توالی آن‌ها با شماره دستیابی KX816857 و KX816858 در بانک ژن ثبت و بعد از مقایسه با توالی‌های مرجع و رسم درخت فیلوژنیک مشخص گردید که ایزوله‌ها مربوط به تایپ یک ویروس اپشتن بار می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴) رسم درخت فیلوژنیک توسط نرم افزار MEGA-10 با روش Neighbor-joining براساس توالی نوکلئوتیدی ژن EBNA-1 ایزوله های جداشده از بافت سرطان مثانه (دایره سبز) در استان بوشهر و توالی‌های رفرانس. ایزوله های بوشهر بیانگر تایپ ۱ ویروس EBV می‌باشد.

Fig 4) Phylogenic tree drawing by MEGA-10 software with Neighbor-joining method based on nucleotide sequence of EBNA-1 gene isolated from bladder cancer tissue (green circle) in Bushehr province and reference sequences. Bushehr isolates indicate EBV type 1.

جدول ۲ نتایج آماری به‌دست آمده از مطالعه بیوپسی‌های سرطان مثانه از نظر وجود ویروس EBV با استفاده از آزمون nested-PCR را به تفکیک سن، جنس، شهرستان، شهر، مرحله و درجه نمایش می‌دهد. بیشترین تعداد نمونه مثبت در آزمون PCR، مربوط به بازه سنی ۶۹-۶۰ سال و ۷۹-۷۰ سال با تعداد هر کدام ۲ نمونه (۲۸/۶درصد) از ۷ نمونهٔ مثبت شده است. ولی با توجه به p=۰/۶۶ از نظر آماری ارتباط معناداری بین سن ابتلا (یا سن بیماران) و میزان مثبت شدن عفونت EBV وجود ندارد.

همچنین تعداد ۶ مورد (۸۵/۷ درصد) از ۷ مورد مثبت، مذکر بودند با p=۰/۵۴ که هم ارتباط آماری معناداری بین جنس مبتلا به سرطان مثانه و نمونهٔ EBV مثبت به ما نشان نداد. تعداد ۴ مورد از ۷ مورد (۵۷/۱ درصد از موارد مثبت EBV، مربوط به شهر بوشهر بود که نسبت به سایر شهرهای استان بوشهر بیشترین درصد را داشت ولی ارتباط آماری معناداری بین فراوانی شیوع EBV در شهرستان‌های مختلف استان وجود نداشت (p=۰/۸۵).

تمام نمونه‌های مثبت از نظر ویروس EBV دارای Stage Ta-T1 بودند (۷ نمونه (۱۰۰ درصد) از ۷ نمونه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

مثبت). علارغم این امر نتایج نشان دهندهٔ عدم وجود ارتباط آماری معنادار میان مراحل مختلف پاتولوژی تومور مثانه با فراوانی شیوع عفونت EBV می‌باشد (P=۰/۴۱).

تعداد ۳ نمونه از ۷ نمونه مثبت، که معادل ۴۲/۹ درصد بود دارای گرید Low gade papillary carcinoma است و تعداد ۳ نمونه (۴۲/۹ درصد) از نوع papillary neoplasm of low malignant است که نسبت به سایر گریدها بیشترین فراوانی را داشتند. P=۰/۸۶ نشان می‌دهد که بین گرید بیماری و مثبت بودن نمونه از نظر EBV ارتباط آماری معناداری وجود ندارد.

جدول ۲) نتایج آماری بدست آمده از مطالعه نمونه‌ها بیوپسی سرطان مثانه از نظر وجود ویروس EBV با آزمون PCR در استان بوشهر

	تعداد کل بیماران مبتلا به سرطان مثانه (٪): (۱۰۰ ٪) ۱۸۱	تعداد بیماران با نتایج PCR مثبت EBV DNA (٪): (۳/۹ ٪) ۷	تعداد بیماران با نتایج PCR منفی EBV DNA (٪): (۹۶/۱ ٪) ۱۷۴	P-value
گروه‌های سنی (سال)				
۳۰-۳۹	۷ (٪ ۳/۹)	۱ (٪ ۱۴/۳)	۶ (٪ ۸۵/۷)	۰/۶۶
۴۰-۴۹	۱۵ (٪ ۸/۳)	۰ (٪ ۰)	۱۵ (٪ ۱۰۰)	
۵۰-۵۹	۴۶ (٪ ۲۵/۴)	۱ (٪ ۲/۲)	۴۵ (٪ ۹۷/۸)	
۶۰-۶۹	۴۵ (٪ ۲۴/۹)	۲ (٪ ۴/۴)	۴۳ (٪ ۹۵/۶)	
۷۰-۷۹	۳۹ (٪ ۲۱/۵)	۲ (٪ ۵/۱)	۳۷ (٪ ۹۴/۹)	
≥۸۰	۲۹ (٪ ۱۶)	۱ (٪ ۳/۴)	۲۸ (٪ ۹۶/۶)	
جنسیت				۰/۵۴
مرد	۱۳۸ (٪ ۷۶/۲)	۶ (٪ ۴/۳)	۱۳۲ (٪ ۹۵/۷)	
زن	۴۳ (٪ ۲۳/۸)	۱ (٪ ۲/۳)	۴۲ (٪ ۹۷/۷)	
شهر				۰/۸۵
بوشهر	۶۳ (٪ ۳۴/۸)	۴ (٪ ۶/۳)	۵۹ (٪ ۹۳/۷)	
اهرم	۱۱ (٪ ۶/۱)	۰ (٪ ۰)	۱۱ (٪ ۱۰۰)	
دلوار	۱۶ (٪ ۸/۸)	۱ (٪ ۶/۲)	۱۵ (٪ ۹۳/۸)	
برازجان	۲۶ (٪ ۱۴/۴)	۰ (٪ ۰)	۲۶ (٪ ۱۰۰)	
آبپخش	۹ (٪ ۵)	۰ (٪ ۰)	۹ (٪ ۱۰۰)	
شبانکاره	۳ (٪ ۱/۷)	۰ (٪ ۰)	۳ (٪ ۱۰۰)	
خورموج	۲۲ (٪ ۱۲/۲)	۱ (٪ ۴/۵)	۲۱ (٪ ۹۵/۵)	
کاکی	۳ (٪ ۱/۷)	۰ (٪ ۰)	۳ (٪ ۱۰۰)	
دیر	۹ (٪ ۵)	۰ (٪ ۰)	۹ (٪ ۱۰۰)	
بردخون	۲ (٪ ۱/۱)	۰ (٪ ۰)	۲ (٪ ۱۰۰)	
دیلم	۳ (٪ ۱/۷)	۰ (٪ ۰)	۳ (٪ ۱۰۰)	
کنگان	۵ (٪ ۲/۸)	۱ (٪ ۲۰)	۴ (٪ ۸۰)	
گناوه	۸ (٪ ۴/۴)	۰ (٪ ۰)	۸ (٪ ۱۰۰)	
جم	۱ (٪ ۰/۶)	۰ (٪ ۰)	۱ (٪ ۱۰۰)	
مرحله تومور				۰/۴۲
Ta-T1 stage	۱۶۶ (٪ ۹۱/۷)	۷ (٪ ۴/۲)	۱۵۹ (٪ ۹۵/۶)	
T2-T3 stage	۱۵ (٪ ۸/۳)	۰ (٪ ۰)	۱۵ (٪ ۱۰۰)	
درجه تومور				۰/۸۶
یوروتلیال پاپیلوما	۴ (٪ ۲/۲)	۰ (٪ ۰)	۴ (٪ ۱۰۰)	
نئوپلازی یوروتلیال پاپیلاری با بدخیمی پایین	۶۲ (٪ ۳۴/۳)	۳ (٪ ۴/۸)	۵۹ (٪ ۹۵/۲)	
کارسینوما یوروتلیال پاپیلاری با درجه پایین	۶۸ (٪ ۳۷/۶)	۳ (٪ ۴/۴)	۶۵ (٪ ۹۵/۶)	
کارسینوما یوروتلیال پاپیلاری با درجه بالا	۴۷ (٪ ۲۶)	۱ (٪ ۲/۱)	۴۶ (٪ ۹۷/۹)	

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

بحث

سرطان مثانه دهمین سرطان شایع در دنیا و ششمین سرطان شایع در مردان می‌باشد و ۳ درصد کل بدخیمی‌ها را شامل می‌شود که در مردان ۴ برابر شایع‌تر از زنان است (۱). در پژوهش ما نیز فراوانی سرطان مثانه در استان بوشهر در مردان ۳/۲ برابر شایع‌تر از زنان بود. تاکنون در منابع علمی در مورد ریسک فاکتورهای ابتلا به تومور مثانه عوامل متعددی همانند استعمال طولانی مدت دخانیات، تماس با مواد شیمیایی در رنگ‌ها، لاستیک‌ها، چرم‌ها و سایر ترکیبات صنعتی، شیستوزومیازیس، التهاب مزمن مثانه، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی ذکر شده است (۴ و ۲۳). نقش EBV در لنفوم بورکیت و کارسینوما نازوفارنکس شناخته شده است، همچنین احتمالاً ویروس EBV به‌عنوان کوکارسینوژن در بدخیمی‌های دیگری شامل لنفوماهای هوچکین و غیرهوچکین، لوزه، زبان، حنجره، غده بنا گوشی، معده‌ای و ریوی درگیر می‌باشد (۱۲-۱۰ و ۲۴). گرچه راه اصلی انتقال ویروس EBV ترشحات دهانی (بزاق) است ولی احتمال انتقال از طریق تماس جنسی نیز وجود دارد و بدلیل نزدیکی مثانه به سطح مخاطی مجاری ادراری تناسلی، ویروس EBV ممکن است نقش مهمی در آلودگی مثانه داشته باشد (۹). در مطالعه حاضر که هدف آن در خصوص جستجوی رابطه احتمالی ویروس EBV با سرطان مثانه می‌باشد، آزمون‌های ملکولی جهت تشخیص ژنوم این ویروس، برروی بافت پارافینهٔ مربوط به ۱۸۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و تعداد ۳۰ نمونه غیرسرطانی انجام گرفت. در مطالعه ما از ۱۸۱ نمونه سرطانی، تعداد ۷ مورد (۳/۹ درصد) از نظر EBV DNA مثبت و ۱۷۴ مورد (۹۶/۱ درصد) منفی بودند. همچنین در ۳۰ مورد از نمونه‌های گروه کنترل، ویروس EBV یافت نشد.

نخستین بار بررسی ویروس EBV در بافت سرطان مثانه بیش از دو دهه پیش صورت گرفت، از آن زمان تاکنون ارتباط بین سرطان مثانه و عفونت ویروس اپشتن بار در مطالعات محدودی مورد بررسی قرار گرفته است به‌طوریکه در برخی مطالعات شیوع پایین (۱۴ و ۱۵) و در برخی دیگر شیوع نسبتاً بالایی (۲۵ و ۲۶) از ویروس EBV را گزارش نمودند.

گازانیگا و همکاران در کشور ایتالیا با استفاده از تکنیک PCR ویروس EBV را در ۳۵ نمونه بافت سرطان مثانه بررسی نمودند که ژنوم ویروس EBV در ۱۲ نمونه (۳۴ درصد) از نمونه سرطانی تشخیص داده شد در حالی‌که در هیچ‌یک از نمونه‌های بافت مثانه نرمال ویروس EBV یافت نشد (۱۴). در مطالعه‌ای کیم (Kim) و همکاران در کشور کره جنوبی با استفاده از تکنیک هیبریدیزاسیون درجا و PCR ویروس EBV را در ۷۳ نمونه بافت سرطان کلیه و ۱۸ بافت غیرسرطانی بررسی نمودند که ژنوم ویروس EBV ژنوتایپ ۱ در ۶/۸ درصد از نمونه‌های سرطانی تشخیص داده شد در حالی که در هیچیک از نمونه‌های بافت غیرسرطانی ویروس EBV یافت نشد. محققان با توجه به درصد پایین عفونت نتیجه گرفتند که EBV نمی‌تواند مستقیماً در سرطان کلیه نقش داشته باشد (۲۷). در مطالعه ما نیز شیوع پایین از ژنوم ویروس EBV در بافت‌های سرطان مثانه شناسایی گردید، همچنین توالی ژنوم ویروس EBV شناسایی شده در مطالعه ما نشان داد که همانند مطالعه کیم و همکاران، ژنوتایپ ۱ بود. براساس تفاوت در ژن‌های نهفته EBNA-2، EBNA-3A، EBNA-3B و EBNA-3C ویروس EBV به دو ژنوتایپ اصلی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

شامل تایپ ۱ و تایپ ۲ طبقه‌بندی می‌شود. همچنین بعضی از طبقه‌بندی‌ها براساس تغییرات در ژن‌های LMP-1 و EBNA-1 انجام شده است (۲۸). گرچه ژنوتایپ‌های ویروس EBV توزیع جغرافیایی مختلفی دارند ولی تایپ ۱ در جاودان کردن لنفوسیت‌های B مؤثرتر از تایپ ۲ عمل می‌کند (۲۸).

دیر (Dere) و همکاران، در ترکیه در ۴۴ بافت کارسینوما یوروتلیال مجاری فوقانی ادراری، RNAهای کوچک ویروس EBV (EBER) را با تکنیک هیبریدیزاسیون درجا در ۱۳ بیمار (۲۹/۵ درصد) از نمونه‌ها شناسایی نمودند، محققان پیشنهاد نمودند که EBV ممکن است در پاتوژنز کارسینوما یوروتلیال نقش داشته باشد در هر صورت این یافته‌ها نیازمند تأیید توسط مطالعات با حجم نمونه بزرگ می‌باشد (۲۹).

علی‌نژاد و همکاران در همدان نشان دادند که در ۴۰ نمونه کارسینوم مثانه، تعداد ۲۹ نمونه (۷۲/۵ درصد) با ویروس EBV آلوده بودند اما همانند مطالعه ما بین شیوع بالای ویروس EBV و متغییرهای سن بیماران و مرحله تومور ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (۲۶). در مطالعه حاضر جهت کاهش خطا و بالابردن کیفیت مطالعه، از گروه کنترل استفاده شده است در صورتی که در مطالعه علی‌نژاد (۲۶) از گروه کنترل استفاده نشده است و این شیوع بالا ممکن است تحت تأثیر شیوع بالا جمعیت عموم آن منطقه باشد.

در تحقیقاتی که چانگ (chuang) و همکاران، در تایوان، بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان مثانه انجام دادند، RNAهای کوچک ویروس EBV (EBER) را با تکنیک هیبریدیزاسیون درجا در ۳۱ درصد از بیماران شناسایی نمودند، این تحقیق نشان می‌دهد که ارتباط بین عفونت EBV و بخشی از تومورهای اوروتلیال اولیه وجود دارد (۱۵). در مطالعه‌ای پاناگیوتاکیس (Panagiotakis) و همکاران در کشور یونان در تعداد ۳۰ نمونه بیوپسی مثانه مربوط به گروه سرطانی و ۳۰ نمونه بیوپسی بافت سالم (گروه کنترل)، ویروس EBV شیوع بالاتری (۵۰ درصد) در نمونه‌های بیوپسی سرطانی نسبت به بافت سالم (۱۳/۳ درصد) را داشت، در حالی‌که در مطالعه ما در گروه کنترل ویروس EBV شناسایی نگردید (۳۰). در مطالعه آبه (Abe) و همکاران، مشاهده گردید که از ۳۹ نمونه سرطان مثانه ۲۶ نمونه (۶۶/۷ درصد) به ویروس EBV آلوده بودند. همچنین در این مطالعه همانند مطالعه ما در هیچ‌کدام از نمونه‌های کنترل، ویروس EBV شناسایی نشد (۲۵).

در مقایسه با مطالعات قبلی انجام شده در این باره (۱۴، ۲۵، ۲۶، ۲۹ و ۳۰)، حجم نمونه در مطالعه ما نسبت به سایرین بیشتر بوده که خود سبب ایجاد اطلاعات دقیق‌تر و وسیع‌تر می‌شود و امکان وجود خطا در این حجم نمونه کمتر بوده و نتایج قابل اعتمادتر می‌باشد. در مطالعه ما، از روش Nested PCR که تکنیکی دقیق‌تر و حساس‌تر از آزمون PCR یک مرحله‌ای می‌باشد استفاده گردید و این خود دقت مطالعه را بالاتر می‌برد. همچنین در مطالعه حاضر جهت اطمینان از صحت نتایج، آزمون nested PCR مجدداً برای نمونه‌های EBV مثبت تکرار گردید. از فرضیات دیگر این مطالعه، بررسی ارتباط بین سن، جنس، مرحله و درجه تومور با میزان مثبت شدن نمونه از نظر EBV بود که در این مطالعه ارتباط معناداری میان متغیرهای فوق و شیوع عفونت EBV در بیماران مبتلا به سرطان مثانه یافت نگردید که مشابه با نتیجهٔ مطالعهٔ پاناگیوتاکیس (۳۰) و علی‌نژاد (۲۶) می‌باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

برخی از مطالعات شیوع تقریباً ۷۰ درصدی از ویروس EBV را در کارسینوما مثانه گزارش نمودند (۲۵ و ۲۶) که بایستی احتمال آلودگی متقاطع میان نمونه‌ها در طی مراحل کاری را نیز در نظر گرفت. در تکنیک PCR در صورت عدم تجربه لازم و عدم رعایت اصول علمی بروز آلودگی و ایجاد نتایج مثبت کاذب اجتناب‌ناپذیر است. در این پژوهش بمنظور کنترل و اجتناب از آلودگی میان نمونه‌ها، در حین برش با میکروتوم برای هر نمونه تیغ یکبار مصرف و دستکش پلاستیکی یکبار مصرف استفاده گردید. بمنظور جلوگیری از آلودگی احتمالی در مراحل کار، آماده‌سازی نمونه و تخلیص DNA، آماده‌سازی معرف‌های PCR یا مخلوط واکنش PCR و انجام مرحله اول و مرحله دوم PCR و آنالیز محصول PCR با الکتروفورزیس ژل آگاروز (post-PCR analyses) در فضاهای جداگانه صورت گرفت. همچنین تمام فضاها و هودها قبل از کار UV تابانده شد و در تمام مراحل کاری از سمپلرهای مجزا و نوک سمپلرهای فیلتردار استریل استفاده گردید.

نتیجه‌گیری

سرطان مثانه دارای ریسک فاکتورهای متعددی است. علیرغم شناسایی ویروس EBV در تقریباً ۴ درصد از نمونه‌های بیوپسی مثانه سرطانی، براساس یافته‌های مطالعه حاضر، بعید است که ویروس EBV عامل مؤثری در ایجاد سرطان مثانه در استان بوشهر باشد و احتمالاً در جمعیت مورد مطالعه ما عوامل خطر دیگری در اتیولوژی تومور مثانه نقش دارد. از دیگر نتایج به‌دست آمده این بود که بین سن، جنس، مرحله و درجه تومور و مثبت شدن نمونه از نظر ویروس EBV ارتباط آماری معناداری وجود ندارد. با توجه به شیوع بالای سرطان مثانه در بین مردم استان بوشهر و با توجه به آلودگی روز افزون هوا در این منطقه، وجود مشاغل پرخطر و مصرف سیگار و قلیان، احتمال می‌رود نقش سایر عوامل خطر پررنگ‌تر از نقش ویروس EBV در ایجاد سرطان مثانه باشد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر نبود شرح حال کامل بیماران در پرونده آن‌ها بود زیرا با توجه به ریسک فاکتورهای محیطی متعدد دخیل در ایجاد سرطان مثانه، گرفتن شرح حال دقیق همانند نوع شغل، وضعیت مصرف دخانیات، وضعیت رژیم تغذیه‌ای و سابقه فامیلی می‌تواند بسیار کمک کننده باشد. لذا اخذ شرح حال کامل و دقیق از بیماران و درج آن در پرونده بیماران توسط دانشجویان، پزشکان و پرسنل توصیه می‌شود.

سپاس و قدردانی

این پژوهش با کد اخلاق ۱۹-۱۶-۹۳ B و شماره گرنت ۱۱۰-۲-۹۳ تحت حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر صورت گرفت. محققان این مقاله بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری صمیمانه ریاست محترم مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس اعلام می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

1.Richters A, Aben KKH, Kiemeney LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. World J Urol 2020; 38(8): 1895-904. doi: 10.1007/s00345-019-02984-4.

2.Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin 2022; 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

3.Ploeg M, Aben KK, Kiemeney LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. World J Urol 2009; 27(3): 289-93. doi: 10.1007/s00345-009-0383-3.
4.Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. Lancet 2009; 374(9685): 239-49. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60491-8.
5.Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, et al. Epidemiology of Bladder Cancer. Med Sci (Basel) 2020; 8(1): 15. doi: 10.3390/medsci8010015.
6.Dianatinasab M, Forozani E, Akbari A, et al. Dietary patterns and risk of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. BMC Public Health 2022; 22: 73. doi: 10.1186/s12889-022-12516-2.
7.Wilson VG. Viral Cancer. Viruses: Intimate Invaders. 1st ed. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2022, 341. https://www.bookdepository.com/Viruses-Intimate-Invaders-Van-G-Wilson/9783030854867
8.Alibek K, Baiken Y, Kakpenova A, et al. Implication of human herpesviruses in oncogenesis through immune evasion and supression. Infect Agents Cancer 2014; 9: 3. doi: 10.1186/1750-9378-9-3.
9.Pagano JS. Is Epstein-Barr virus transmitted sexually? J Infect Dis 2007; 195(4): 469-70. doi: 10.1086/510861.
10.Roulston JE, Bartlett JMS. Molecular Diagnosis of Cancer Methods and Protocols. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2004, 394. https://doi.org/10.1385/1592597602
11.Knipe DM, Howley P. Fields Virology. 6th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2013, 2664. https://www.wolterskluwer.com/en/solutions/ovid/fields-virology-6th-edition-15514?
12.Landers RJ, O'Leary JJ, Crowley M, et al. Epstein-Barr virus in normal, pre-malignant, and malignant lesions of the uterine cervix. J Clin Pathol 1993; 46(10): 931-5. doi: 10.1136/jcp.46.10.931.
13.Israele V, Shirley P, Sixbey JW. Excretion of the Epstein-Barr virus from the genital tract of men. J Infect Dis 1991; 163(6): 1341-3. doi: 10.1093/infdis/163.6.1341.
14.Gazzaniga P, Vercillo R, Gradilone A, et al. Prevalence of papillomavirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 2 in urinary bladder cancer. J Med Virol 1998; 55(4): 262-7. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199808)55:4<262::aid-jmv2>3.0.co;2-z.
15.Chuang CK, Liao SK. Epstein-Barr virus infection in urothelial transitional cell carcinoma tissues. BJU Int 2004; 93(4): 495-8. doi: 10.1111/j.1464-410x.2003.04687.x.
16.Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339(6221): 237-8. doi: 10.1038/339237a0.
17.Victor T, Jordaan A, Du Toit R, et al. Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993; 31(8): 531-5. doi: 10.1515/cclm.1993.31.8.531.
18.Bacich DJ, Sobek KM, Cummings JL, et al. False negative results from using common PCR reagents. BMC Res Notes 2011; 4: 457. doi: 10.1186/1756-0500-4-457.
19.Taherkhani R, Farshadpour F, Makvandi M, et al. Determination of cytomegalovirus prevalence and glycoprotein B genotypes among ulcerative colitis patients in ahvaz, iran. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(2): e17458. doi: 10.5812/jjm.17458.
20.Broccolo F, Bossolasco S, Careddu AM, et al. Detection of DNA of lymphotropic herpesviruses in plasma of human immunodeficiency virus-infected patients: frequency and clinical significance. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9(6): 1222-8. doi: 10.1128/cdli.9.6.1222-1228.2002.
21.Lo YM, Chan KC. Setting up a polymerase chain reaction laboratory. Methods Mol Biol 2006; 336: 11-8. doi: 10.1385/1-59745-074-X:11.
22.Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74(12): 5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

23.Zarzour AH, Selim M, Abd-Elsayed AA, et al. Muscle invasive bladder cancer in Upper Egypt: the shift in risk factors and tumor characteristics. BMC Cancer 2008; 8: 250. doi: 10.1186/1471-2407-8-250.
24.Taherkhani R, Farshadpour F, Mirjalili A, et al. Determination of the association between Epstein-Barr virus (EBV) infection and Multiple sclerosis (MS) disease. Iran South Med J 2014; 17(4): 666-75. URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-583-en.html
25.Abe T, Shinohara N, Tada M, et al. Infiltration of Epstein-Barr virus-harboring lymphocytes occurs in a large subset of bladder cancers. Int J Urol 2008; 15(5): 429-34. doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02030.x.
26.Alinezhad Z, Ghane M, Kaboosi H. Detection and Evaluate the Frequency of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Bladder Tumor Samples in Hamedan Province, 1392. Iran J Med Microbiol 2015; 9(1): 22-8. (Persian) URL: http://ijmm.ir/article-1-410-en.html
27.Kim KH, Han EM, Lee ES, et al. Epstein-Barr virus infection in sarcomatoid renal cell carcinoma tissues. BJU Int 2005; 96(4): 547-52. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05682.x.
28.Zanella L, Riquelme I, Buchegger K, et al. A reliable Epstein-Barr Virus classification based on phylogenomic and population analyses. Sci Rep 2019; 9: 9829. doi: 10.1038/s41598-019-45986-3.
29.Dere Y, Ekmekçi S, Akarken İ, et al. Can Epstein-Barr virus play a role in upper urinary tract urothelial carcinomas? Ann R Coll Surg Engl 2020; 102(8): 616-20. doi: 10.1308/rcsann.2020.0138.
30.Panagiotakis GI, Papadogianni D, Chatziioannou MN, et al. Association of human herpes, papilloma and polyoma virus families with bladder cancer. Tumour Biol 2013; 34(1): 71-9. doi: 10.1007/s13277-012-0512-2.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]

Original Article

Molecular Detection of Epstein-Barr virus in Biopsy Samples of Patients Suffering from Bladder Cancer in Bushehr Province, Iran

R. Taherkhani (PhD)[1,2], MR. Farzaneh (MD)[3], S. Taherkhani (PhD)[4], A. Amini (MD)[2], F. Keshtkar (MD)[1], M. Aghasipour (MD)[1], A. Badri (MD)[1], Z. Anaei (MD)[1], F. Farshadpour (PhD)[1,2**]*

[1] *Department of Virology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*
[2] *The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*
[3] *Department of Pathology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*
[4] *Department of Midwifery, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*

(Received 20 Aug, 2021 Accepted 23 Oct, 2022)

Abstract

Background: Bladder cancer is the sixth most common cancer in men and the tenth most common cancer in women. The role of viral infections in the development of urinary bladder cancer has been discussed a lot in recent years. The role of Epstein-Barr Virus (EBV) as a cocarcinogen has been proven in some human cancers. Therefore, the aim of this research is the molecular investigation of EBV in bladder masses in Bushehr province.

Materials and Methods: The current research is a descriptive-analytical study. The study population includes bladder tissue biopsies of people diagnosed with bladder cancer referred to Persian Gulf Martyrs Hospital in Bushehr. The paraffin-embedded bladder biopsy tissue of 181 patients with bladder cancer with an average age of 64.52±13.78 as well as 30 non-cancerous bladder tissue samples as the control group were examined for molecular tests after deparaffinization and nucleic acid purification. In order to ensure the absence of PCR inhibitors, human beta globin gene was first detected as an internal control, and then the BKRF1 gene of EBV was detected by nested PCR method. Finally, SPSS software version 26 was used to analyze the data and perform statistical tests.

Results: Out of 181 bladder carcinoma samples, 7 cases (3.9%) were infected with EBV, but no statistically significant relationship was found for age, sex, and stage and grade of tumor with EBV positive samples (P>0.05). In addition, EBV was not detected in any of the non-cancerous control samples; however, the difference in the prevalence of EBV between the bladder cancer patients' group and the control group was not statistically significant (P=0.33). In addition, the sequencing of the nested PCR products of the BKRF1 gene and the phylogenetic analysis indicate the presence of EBV type 1 in the positive samples.

Conclusion: Based on the findings of the present study and despite the fact that the percentage of EBV infection in cancerous samples was higher than in non-cancerous samples, it is unlikely that EBV is an effective factor in causing bladder cancer in Bushehr province, and other risk factors are probably involved in the etiology of bladder tumors in our study population, such as increasing air pollution in this region of the country, high-risk occupations, smoking, and other carcinogenic viral factors.

Keywords: Bladder Cancer, Epstein-Barr Virus, Nested PCR, Bushehr Province.

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Taherkhani R, Farzaneh MR, Taherkhani S, Amini A, Keshtkar F, Aghasipour M, Badri A, Anaei Z, Farshadpour F. Molecular Detection of Epstein-Barr virus in Biopsy Samples of Patients Suffering from Bladder Cancer in Bushehr Province, Iran. Iran South Med J 2022; 25(4): 326-339

[**] *Address for correspondence*: Department of Virology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. E.mail: F.Farshadpour@yahoo.com

[*]ORCID: 0000-0001-6499-0531

[**]ORCID: 0000-0002-8317-9573

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/ismj.25.4.326]