

Dedication

To my parents
soul

Acknowledgment

I would like to thank every body who contributed to the success of this work.

I am deeply indebted to my supervisor Asso-Proff.Ahmed Ibrahim Shomo, co-supervisors Prof..Dr.Amel Omer Bakhiet, Dr.Magdi Salih Mansour and to Dr Hussain Gad El-kareim for their guidance and valuable assistance,to achieve optimum outcome of this research.

Also my sincere thanks to A.Abdallah Hasab El-nabi for his assistance in cytological investigation, and Prof..Dr Adel Sayed Amin ,Dr Tahany Salama Behour Hieba, Dr Samah Fekari Darweish (Animal Reproductive Research Institute, Cairo, Egypt) for their assistance in molecular investigation, also Dr Humodi Ahmed Saeed, Head department of Medical Laboratory Sience, Ustaz Hussan Siddig, Head department of histopathology, and all Teaching staff. Special thanks to Ustaz .Abuelgassim Abass for his assistance in statistical analysis, Histopathology members , Sharafeldin, Mohammed, Elham, Nafeisa, Abobakar,and Mogtaba, Also to laboratory research members, Sohair and Egbal for their supporting to complete this research.

Further I thank all Gynaecological Doctors in hospitals (Khartoum Hospital, Khartoum North Hospital (Bahri), and Elneelin Clinic Center) who assisted me in sample collection.

ملخص الاطروحة

أجريت هذه الدراسة في ولاية الخرطوم خلال الفترة من يوليو 2007 الى يوليو 2009. هذا البحث يهدف إلى مسح سرطان عنق الرحم بين النساء في ولاية الخرطوم باستخدام صبغة بابانيكولاو لكشف وتحديد الانواع الوراثية (الجينية) المختلفة لفيروس الورم الحليمي البشري ((Human Papilloma Virus).

تم أخذ اربعمائة عينة من المرضى الذين حضروا إلى مختلف المستشفيات في ولاية الخرطوم (مستشفى الخرطوم، مستشفى الخرطوم شمال (بحري)، وعيادة مركز النيلين). وتمت معالجة العيّنات وفحصها تحت المجهر بالنسبة لصبغة بابانيكولاو، والهيما توكسليين والايوسين (في المرضى الذين أخضعوا لفحص الانسجة المريضة، وأنها لا تمثل سوى ست نساء) وتم الكشف عن فيروس الورم الحليمي البشري باستخدام طريقة Jacobs ولتحديد الأنواع الوراثية للفيروس أتبعنا تعليمات الشركة المصنعة. وجدت الخلايا قبل السرطانية في 30 (7.5%) عينة كما يلي: التبديل النووي البسيط في 18 (4.5%) و التبديل النووي المتوسط في 5 (1.3%)، و التبديل النووي الحاد في 6 (1.5%) من المرضى، وفيروس الورم الحليمي البشري وجد في 6 (1.5%) من المرضى، الذين يعانون من تبديل نووي بسيط. وجدت المشعره المهبليه ((*Trichomonus.vaginalis* في 8 (2.0%) من الحالات، فقط (0.3%) مصابة بالتبديل النووي البسيط البسيط، لوحظت كذلك مسببات الاصابات الأخرى مثل المبيضات (*Candida.spp*) الأكثر عددا، الشعيات (*Actinomyces.spp*)، مكورات البنية (*GonoCocci spp*)، الرشاشيات الدخنية (*Aspergillus fumigatus*) ومونيللا. من الستة نساء التي أخضعت إلى فحص الأنسجة المريضة، واحدة (0.3%) ظهرت مصابة بسرطان الخلايا المفلطحة (الحرشفية) سئ التفريق، 3 (0.8%) بسرطان الخلايا المفلطحة معتدل التفريق و 2 (0.5%) كانت مصابة بسرطان الخلايا المفلطحة جيد التفريق.

وجد فيروس الورم الحليمي البشري في 144 (36.0%)، الاصابة بنوع واحد من فيروس الورم الحليمي البشري وجدت في 37.2%. (من النساء الإيجابية لفيروس الورم الحليمي البشري) الاصابة بانواع متعددة لوحظت في (50.3%) من المرضى وإيجابية لفيروس الورم الحليمي البشري لأنواع وراثية أخرى (خلاف ال 14 أنواع التي تم الكشف عنها) في 12.5% من الحالات. فيروس الورم الحليمي البشري ذو الخطر العالى كان أعلى (

81.9% من فيروس الورم الحليمي البشري ذو الخطر المنخفض (0.7%)، في حين تم العثور على الإصابة المختلطة (فيروس الورم الحليمي البشري العالى والمنخفض المخاطر) فى (4.9%) المرضى. الأنواع الوراثة الفرعية للخطر العالى لفيروس الورم الحليمي البشري HPV 16 هو أعلى واحد، حيث وجد فى 49 (34.0%) من الحالات، يليه HPV 39 فى 41 (28.5%)، ثم 35 فى 26 (18.0%)، 59 فى 20 (13.9%)، 56 فى 18 (12.5%)، 58 فى 14 (9.7%)، 18 فى 10 (6.9%)، 66 فى 9 (6.2%)، 52 فى 6 (4.2%)، 45 فى 4 (3.5%)، 33 فى 4 (2.8%)، 31 فى 2 (2.8%) ومنخفضة المخاطر (6,11)، 11 وجدت فى 7 (4.9%)، و 6 فى 4 (2.8%) من الحالات، و (12.5%) إيجابية أنواع غير معروفة.

الانواع الوراثة الفرعية لفيروس الورم الحليمي البشري التى وجدت مرتبطة مع التغييرات الخلوية تتضمن، HPV 16 الذى وجد فى (13.3%) HPV 18.4 فى (6.7%)، HPV 58 فى (3.3%) HPV 56.1 فى (6.7%)، HPV 35 فى (3.3%)، HPV 16,18 فى (6.7%)، HPV 16,35 فى (13.3%)، HPV 31,16 فى (1%)، HPV 16,39 فى (10%)، HPV 16,39,56 فى (3.3%)، HPV 16,56 فى (3.3%)، HPV 45 in 2 (6.7%) فى (6.7%)، HPV 45, 35,39 فى (3.3%)، HPV 39,59,56 فى (3.3%)، HPV 35,11 فى (3.3%) من المرضى و فيروس الورم الحليمي البشري غير معروف الانواع فى 1 (3.3% من المرضى).

وخلصت الدراسة إلى أن معدل انتشار الإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري مرتفع في المرأة السودانية. معدل انتشار الإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري (36%)، فى حالات الخلايا الساذجة للسرطان فى (96.6%) وفى (83.3%) من المرضى المصابون بسرطان عنق الرحم.

فيروس الورم الحليمي البشري العالى المخاطر أكبر من المنخفض

المخاطر، مع ارتفاع عدد الاصابات بالانواع الوراثة المتعددة ل فيروس الورم الحليمي البشري . HPV 16 أعلى نوع وراثى حيث وجد (34%)، دائما مرتبط بتكوين نسيج جديد بالخلايا الطلائية الداخلية لعنق الرحم فى النساء صغيرات السن والنساء المصابة بسرطان عنق الرحم ذوالخلايا المفلحة.

على الرغم أن أعلى معدل انتشار للإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري وجد فى النساء ذات الاعمار 30-39 سنة، أن أعلى معدل انتشار للإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري ايضا وجد فى النساء ذات الاعمار من 15-20 سنة، و النساء أكبر من 50 سنة اعتمادا على عدد المرضى فى هذه المجموعات من الاعمار.

بناءً على مختلف القبائل السودانية، أعلى معدل إنتشار للخلايا قبل السرطانية والخلايا السرطانية ووجود فيروس الورم الحليمى البشرى ، وجد فى قبائل وسط السودان، القبائل الغربية، والقبائل الشمالية.

المسح عن سرطان عنق الرحم بواسطة الكشف عن وجود بفيروس الورم الحليمى البشرى وجد أكثر فعالية من المسح بالتشخيص الخلوى (تقنية بابنيكولاو).
التعليم، وسائل منع الحمل ، عن طريق الفم والدقن ،ومن خلال الرحم (IUCD) ، لا يبدو أنه يزيد عامل الخطر. الانجابية العالية ذات ارتباط معدوى مع وجود الاثنين الاصابة بفيروس الورم الحليمى البشرى (P value 0.027) والتغيرات الخلوية (P value 0.011)

ABSTRACT

This study was carried out in Khartoum State during a period from July 2007 to July 2009. This research aimed to screen the cervical cancer among women in Khartoum State using Papanicolaou (Pap) stain and to detect and identify human papilloma virus (HPV) different genotypes.

Four hundred samples were taken from patients who attended different hospitals in Khartoum State; Khartoum Hospital, Khartoum-North Hospital (Bahri) and Al Neelain Clinic Center. The specimens were processed and examined under the light microscope for pap.stain and H&E (in six patients who were subjected to histopathological examination) and for HPV detection; JACOBS procedure was used, and the instruction of the manufacturer was followed in genotypes identification. The pre-cancer cells were detected in 30(7.5%) samples, as follows: mild dyskaryosis was present in 18 (4.5%), moderate dyskaryosis in 5(1.3%), severe dyskaryosis 6 (1.5%) patients. HPV infection was found in 6 (1.5%) patients, who had mild dyskaryosis, *Trichomonus.vaginalis* was present in 8 (2.0%)cases, only 1(.3%) with dyskaryosis. Other infectious agents were also observed such as *Candida.spp* (the most accounted), *Actinomyces.spp*, *GonoCocci spp*, *Aspergillus fumigatus* and *Monilia*. From 6 women, who were subjected to histopathological examination ,one (0.3%) appeared to have poorly differentiated squamous cell carcinoma, 3 (0.8%) moderately differentiated squamous cell and 2 (0.5%), a well differentiated squamous cell carcinoma. HPV was detected in 144 (36.0%) samples. Single HPV infection was detected in 37.2% of positive HPV women. Multiple infection(infection by more than one HPV type) was observed in 50.3% of patients and positive HPV for other genotypes (other than the 14 types demonstrated) in 12.5%, the high risk HPV was higher (84.9%) than low

risk HPV (0.7%) and mixed infection (high and low risk HPV) were found in (4.9%) of patients. The high risk HPV subtypes mostly encountered are HPV 16 detected in 49 (34.0%) cases, followed by HPV 39 (41, 28.5%), HPV 35 (26, 18.0%), HPV 59 (20, 13.9%), HPV 56 (18, 12.5%), HPV 58 (14, 9.7%), HPV 18 (10, 6.9%), HPV 66 (9, 6.2%), HPV 52 (6, 4.2%), HPV 45 (5, 3.5%), HPV 33 (4, 2.8%), HPV 31 (4, 2.8%) and the low risk (6, 11), HPV 11 were found in 7 (4.9%) and HPV 6 in 4 (2.8%), cases, and 18 (12.5%) positive of other types.

The HPV subtypes detected in association with cytological changes, include, HPV 16 which was detected in 4 (13.3%) of the 30 patients, HPV 18 in 2 (6.7%), HPV 58 in 1 (3.3%), HPV 56 in 2 (6.7%), HPV 35 in 1 (3.3%), HPV 16, 18 in 2 (6.7%), HPV 16, 35 in 4 (13.3%), HPV 31, 16 in 1 (3.3%), HPV 16, 39 in 3 (10%), HPV 16, 39, 56 in 1 (3.3%), HPV 16, 56 in 2 (6.7%), HPV 45 in 2 (6.7%), HPV 45, 35, 39 in 1 (3.3%), HPV 39, 59, 56 in 1 (3.3%), HPV 35, 11 in 1 (3.3%), HPV of unknown types (other than 14 types) in 1 (3.3%) patients.

The study concluded that the prevalence of HPV infection is high in Sudanese women. The prevalence of HPV was 36%, in pre-cancer cases (96.6%), and (83.3%) in cervical cancer patients. The high risk HPV is greater than low risk, with high account of multiple HPV genotypes infections. HPV 16 was genotypically mostly detected (34%) and always in association with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young women and women with cervical squamous carcinoma. Although the highest HPV prevalence was detected in women aged 30-39, high HPV prevalence were also found in age group 15-20 year and in patients more than 50 year old.

According to Sudanese different tribes, the high prevalence of pre-cancer and cancer cells, and HPV occurrence were present in central Sudan tribes, western tribes, and northern tribes.

Screening of cervical cancer by HPV detection was found to be more effective than screening by cytological examination (Pap. technique) to detect women at risk. The education, uses of contraceptives, and intra uterine contraceptive devices (IUCD), did not appear to influence the risk factor. High statistically was significantly associated to occurrence of both, HPV (P value 0.027) and cytological changes (P value 0.011).

List of CONTENTS

Dedication	I
Acknowledgment	II
خلاصة البحث	III
Abstract	IV
Contents	IX
List of Tables	XI
List of Figures	XI
List of Plates	XIII
Chapter One	
1. Introduction	1
Chapter Two	
2. Literature Review	5
2.1 The Cervix: anatomy, histology and physiology	5
2-2 Infection of vagina	5
2-2-1 Bacterial vaginosis (BV)	5
2-2-2 Cytolytic vaginosis and Lactobacillosis	5
2-2-3 vaginitis	6
2-2-3-1 Bacterial vaginitis	6
2-2-3-2 Candidiasis (<i>Candida vaginitis</i>)	6
2-2-4 Trichomoniasis	7
2-3 Cervix disorders	7
2-3-1 Cervicitis	7
2-3-1-1 Human immunodeficiency virus (HIV) infection	7
2-3-1-2 Herpes simplex virus infection	8
2-3-1-3 Human papilloma virus (HPV) infection	8
2-3-1-3-1 Role of HPV	14
2-3-1-3-2 Molecular basis of oncogenesis	15
2-3-2 Cervical tumors	16
2-3-2 -1 Classification	16
1-3-2-1-1 Benign proliferative changes	16
2-3-2-1-2 Atypical squamous cells – ASC	17
2-3-2-1-3 Condyloma acuminatum	17
2-3-2-1-4 Squamous intraepithelial lesions	17
2-3-2-1-5 Squamous cell carcinomas	18
2-3-2-2 Presentation	19
2-3-2-3 Classic risk factors	19

2-3-2-4 Prevention	21
2-3-2-4 -1 Primary prevention	21
2-3-2-4 -2 Secondary prevention	24
2-3-2-5 Epidemiology	25
2-3-2-6 Methods for demonstration	27
2-3-2-6-1 Conventional cytology	27
Visual inspection to detect pre cancer or cancer	30
2-3-2-6-2 Histopathology	30
2-3-2-6-3 HPV DNA detection	32
2-3-2-6-3-1 Type-specific PCR	32
2-3-2-6-3-2 Liquid hybridization	33
Chapter Three	
Materials and Methods	
3-1 Study design	35
3-2 study population	35
3-3 Materials	35
3-4 Methodology	35
3-4-1 Specimen collection	35
3-4-2 Sample processing	36
3-4-3 Ethical consideration	41
3-4-4 Assessment of results	41
3-4-5 Statistical analysis	41
Chapter Four	
Results	42
Chapter Five	
Discussion	92
Conclusions and Recommendations	99
References	101
Appendix	
Appendix :1	123
Appendix :2	124

LIST OF TABLES

Table	Description	Page
Table (1):	Clinical history of the study groups (400 patients)	53
Table (2):	Description of HPV results in relation to age among 400 patients	59
Table(3):	Description of cytological results according to the Sudanese different tribes	60
Table(4):	Description of cytology results in relation to parity number in 400patients	61
Table (5):	Description of Cytology result in relation to grossly Visible Lesions in 400 patients	61
Table (6):	Correlation of cytology results and discharge color	62
Table (7):	Description of cytology results in relation to smoker husband	62
Table (8):	Correlation of cytology results and the use of contraceptives among 400patients	63
Table (9):	Correlation of cytology results and contraceptives duration in months among user- patients	64
Table(10):	Description of cytology results in relation to circumcision	65
Table (11):	Description of Cytology result by the use of IUCD	65
Table (12):	Correlation of cytology results and education level among 400 patients	66
Table (13):	The description of cytological findings in relation to Occupation among 400 patients	67
Table (14):	Description of HPV results in relation to age among 400 patients	70
Table (15):	Description of HPV presence according to the Sudanese different tribes	70
Table (16):	Description of HPV occurrence in relation to circumcision	71
Table (17):	Description of HPV occurrence in relation to parity among 400 examined patients	71
Table(18):	Correlation of the occurrence of HPV with the color of the discharge among the examined 400 patients	72
Table (19):	Description of HPV result by infection other than HPV among 400 patients	72
Table (20)	Co-relation of HPV occurrence and cytological finding	73
Table (21)	Description of HPV result in relation to education level among 400	73
Table Table (2	Description of HPV occurrence in relation to occupation	74

LIST OF FIGURES

Figure	Description	Page
Figure (1)	Distribution of age among the study group	44
Figure (2)	The description of the cases percentage among the different tribes	45
Figure(3)	The description of patient's education level among the study group (400)	46
Figure (4)	The description of the types of occupation Among the study group	47
Figure(5)	Description of parity incidence among the study group	48
Figure(6)	Description of the types of contraceptives used by the study group	49
Figure(7)	Contraceptives duration among the users	50
Figure (8)	Description of intra uterine contraceptives devices (IUCD) duration among users group	51
Figure(9)	Description of the various discharge color recorded among the study group (400)	52
Figure(10)	Description of cytological finding among 400 patients.	57
Figure(11)	Description of the occurrence of infection other than HPV among 400 patients	58
Figure(12)	The incidence of HPV Genotypes among positive HPV cases	77
Figure(13)	The incidence of HPV genotypes among cases with cytological changes	78

LIST OF PLATES

Plate	Description	Page
Plate 1	General HPV	83

Plate 2	High risk HPV genotype	88
Plate 3	High risk HPV genotype	89
Plate 4	High risk HPV genotype	90
Plate 5	High risk HPV genotype	91
Plate 6	Low risk HPV genotype	92
Plate 7	Low risk HPV genotype(negative)	93
Plate 8	Cervical smear with normal cervical smear	94
Plate 9	Cervical smear with HPV infection	95
Plate 10	Cervical smear with mild dyskaryosis	96
Plate 11	Cervical smear with moderate dyskaryosis	97
Plate 12	Cervical smear with sever dyskaryosis	98
Plate 13	Cervical smear with sever dyskaryosis	99