عزل وتشخيص بكتريا *Gardnerella vaginalis* ودراسة حساسيتها الدوائية ومحتواها من البلازميدات

ريا عزت السعدي[1]، د.زهير نعمان العاني[1]، ماجد حسين الجيلاوي[2]

[1] كلية التقنيات الطبية، هيئة المعاهد الفنية

[2] كلية العلوم، جامعة الفيوم

الخلاصة

عزلت وشخصت (12) عزلة من بكتريا *Gardnerella vaginalis* من مجموع العينات البالغة (100)عينة والتي كانت عبارة عن إفرازات مهبلية لنساء يعانين من أعراض واضحة للالتهابات المهبل وكانت الإفرازات ذات ألوان مختلفة، ولوحظ ان اكبر عدد من العزلات (7 عزلات) عزلت من الإفرازات الصفراء و(3 عزلات) من الإفرازات البيضاء وعزلة واحدة من كل من الإفرازات البنية والرمادية.وتراوحت الأرقام الهيدروجينية للافرازات المهبلية التي عزلت منها البكتريا بين(5-6.8) وتميزت (9) من العينات التي عزلت منها البكتريا برائحة تشبه رائحة السمك، كما لوحظ وجود الخلايا الملتاحية (clue cell) في (11 عينة) من العينات التي عزلت منها البكتريا. أظهرت البكتريا حساسية لمضادات السيفاتاكسيم، جنتامايسين، ازيثرومايسين، ريفامبيسين، كلوكساسلين، ليفوفلوكساسين، امبيسلين، وكلورامفينيكول، بينما كانت جميع العزلات مقاومة للميترونيدازول . في حين ظهرت العزلات تفاوتاً في حساسيتها لمضادات البنسلين والستربتومايسين والنتروفيورانتين والتيومايسين والكوتريماكسازول والتتراسايكلين. حدد التركيز الحظر الأدنى لتسعة مضادات حيوية وكانت جميع العزلات حساسة للامبيسلين والبنسلين في حين أظهرت جميع العزلات تفاوتا في حساسيتها تجاه مضادات الحيوية الأخرى. أظهرت نتائج عزل الدنا البلازميدي من بكتريا *G. vaginalis* ختو جميع العزلات من البلازميدات إذ لم تظهر اي حزمة دنا بلازميدية رغم استخدام عدد من طرق عزل الدنا البلازميدي القياسية.

المقدمة

عزلت بكتريا *G. vaginalis* لأول مرة عام 1953 من الرجال المصابين بالتهاب الاحليل (Urethritis) والتهاب البروستات (Prostatitis) ومن النساء المصابات بالتهاب عنق الرحم (Cervicitis) (1). بعدها عزلت من حالات التهابات المهبل اللانوعية (Non-Specific Vaginalis) (2). وتكون *G. vaginalis* سالبة إلى متغايرة لصبغة كرام وذات أشكال متغايرة (حصوية إلى حصوية دائرية) وهي لا هوائية اختيارية وذات متطلبات معقدة لكنها لا تحتاج إلى عاملي (V, X) إذ تنمو على وسط Vaginalis agar (V agar) الذي يتكون من وسط كولومبيا مضاف له دم الخروف بنسبة 5% (3). تتمثل البكتريا بالجلوكوز لا هوائيا وذلك بتوفير ثاني اوكسيد الكربون 10% في Candlejar. وتكون بكتريا *G. vaginalis* مستعمرات صغيرة معتمة، مقعرة، ذات حافات دائرية محاطة بمنطقة من التحلل الكامل لكريات الدم الحمراء (4). وتشمل بكتريا ال *G. vaginalis* عدد من الكاربوهيدرات مثل الكلوكوز والنشا والسكروز ماعدا حامض بدون غاز وهي محللة للهيبورات وغير مخزلة للنترات كما إنها غير منتجة لأنزيم الكتاليز والاوكسيديز (3، 5).

إن دور بكتريا *G. vaginalis* في التهاب المهبل البكتيري لازال موضع شك من قبل عدد من الباحثين إذ يرى بعض الباحثين إنها من مسببات التهاب المهبل البكتيري (8، 7، 6) بينما يبقى الآخرون في شك من دورها المسرطن (11، 10، 9) وعلى العموم توجد ثلاثة مجاميع من البكتريا يمكن تشخيصها في مسحة المهبل

1 المجموعة الأولى: طبيعية (normal)

وتتضمن سيادة بكتريا Lactobacillus حيث يعتقد أن لها دورا في حماية الجهاز التناسلي النسوي ضد الإصابة بالمسرطنات (12).

2 المجموعة الثانية: الوسطى (Intermediate)

وفيها تتقلل أعداد Lactobacillus وتظهر مع بكتريا أخرى.

3- المجموعة الثالثة: غير طبيعية (abnormal)

وفيها يكون أعداد بكتريا Lactobacillus قليلا أو معدوما مع زيادة كبيرة لأعداد البكتريا العرضية الأخرى.

وتسكن بكتريا *G. vaginalis* نسبة 72% من عزلات المجموعة الثالثة وتكون البكتريا المسؤولة الرئيسية (8) أو إحدى المسببات للمهبل بشكل مزمن في التهاب المهبل البكتيري والمسؤولة عن إصابات المهبل الخارجية (13).

المواد وطرائق العمل

الأوساط الزراعية:

1- وسط كولومبيا (Oxoid)

استخدم كوسط انتقالي لعزل بكتريا (G. vaginalis) بعد أن أضيف له دم بشري صنف (O) وبنسبة 5% والمضاد الحيوي (حامض النالديكسيك) بتركيز 15 مايكروغرام/ملليتر.

2- وسط ماكانكي (Mast)

استخدم لتنمية البكتريا بعد أن أضيف له حامض النالديكسيك (15 مايكروغرام/ مايلتر)

3- استخدم وسط البروسيلا(Difco) ووسط تفيح الدماغ والقلب لتنمية البكتريا بعد أن أضيف لهما مصل او بلازما بنسبة 5%. كما استخدم الوسطان لحفظ البكتريا بعد أن أضيف الكلسيرول (15%) إلى مزارع البكتريا.

جمع النماذج

جمعت 100 مسحة من منطقة المهبل العليا (Upper Vagina) لنساء راجعن المجمع الطبي في مدينة الشعب ومستشفى مدينة صدام الطبية/الاستشارية النسائية خلال الفترة من 1999/12/1 إلى 2000/3/1 وكانت النساء يعانين من الحكة والإفرازات مهبلية. وتتراوح اعمارهن بين 18-50 سنة. نقلت المسحات إلى المختبر بعد أن وضعت في وسط ناقل.

عزل البكتريا

أجريت للمسحات الاختبارات التالية:-

1- زرعت على أطباق من الوسط الانتقائي (كولومبيا).

2- عملت تحضيرات ملونة وفحصت مباشرة المجهري عن Clue cell وحساب عدد كريات الدم البيضاء متعددة الأنوية.

3- إجراء فحص ويف (Whiff test): ظهور رائحة تشبه رائحة السمك وذلك لتحرر حلقة البروتينية امينية بعد مزج الافرازات المهبلية مع محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (10%) (4).

4- قياس الرقم الهيدروجيني للافرازات باستخدام أوراق قياس الرقم الهيدروجيني.

الفحوصات المظهرية والزراعية والبايوكيميائية

أخضعت البكتريا المعزولة إلى عدد من الفحوصات المظهرية والزراعية والفسلجية والبايوكيميائية وكما يلي:-

أ- الصفات المظهرية والزراعية:

زرعت عزلات البكتريا على وسط كولومبيا أكار المضاف له دم بشري (5%) وحضنت الأطباق بوجود 5-10% ثاني اوكسيد الكاربون (10%) بدرجة حرارة 37م مدة 24 ساعة وبعد ذلك أشكال المستعمرات الناتجة كما شخصت مسحات من تلك المستعمرات بصبغة كرام لدراسة أشكال الخلايا وتصبغها بصبغة كرام.

ب- الحركة:-

استخدمت طريقة القطرة المعلقة لاختبار حركة البكتريا بعد تنميتها على سائل تفيح الدماغ والقلب (BHI). (15)

ج- الاختبارات الكيموحيوية:-

عينت عزلات البكتريا المختلفة على سائل تفيح الدماغ والقلب مضافا له مصل أو بلازما وحضنت بدرجة حرارة 37م مدة 48 ساعة واستخدمت كنقاح في معظم الاختبارات الكيموحيوية:-

1- اختبار إنزيم الاوكسيز (16).

2- اختبار إنزيم الكاتاليز(16).

3- اختبار قابلية البكتريا على تخمر سكري اللاكتوز والسكروز وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) (15).

4- اختبار اختزال النترات (15).

5- اختبار تكون الاندول (16).

7- اختبار تحلل كريات الدم الحمراء (15).

8- اختبار المثيل الأحمر والفوغس بروسكاور (16)

9- اختبار أكسدة وتخمر السكريات (16).

10- الحرارة المثلى للنمو.

11- اختبار تحلل الهيبورات (17).

بعد أن تم تشخيص البكتريا والتأكد من إنها تعود لجنس Gardnerella تم إجراء الاختبارات الآتية:

- اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية:-

اختبرت حساسية عزلات بكتريا *G.vaginalis* لعدد من المضادات الحيوية بطريقة Kirby- Bauer method (18).

- تحديد التركيز المثبط الأدنى

باستخدام طريقة التخفيف في مرق مايكرو (bacteal broth dilution method) والمذكورة في (19).

- استخلاص الدنا

تم عزل الدنا من خلايا البكتريا باستخدام طريقة الفينول الكلوروفورم المذكورة من قبل Rodriguez & Tait (20) التي تستخدم لاستخلاص الدنا البلازميدي بصورة تقنية بتراكيز كبيرة تجري الترحيل الكهربائي للناتج من الدنا المستخلص على هلام الاكاروز بتركيز (0.7%) بفرق جهد مقداره 5 فولت/سم مدة 2-3 ساعات بعدها فحص الهلام بالأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 340 نانوميتر لتحديد حزم الدنا التي تم تصويرها بكاميرا polaroid.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج (الجدول 1) أن بكتريا *G. vaginalis* عزلت من 12 عينة فقط من مجموع 100 عينة لنساء غير حوامل يعانين من أعراض واضحة لالتهابات السبيل

البكتيري. وصنفت عينات البحث تبعا لألوان الافرازات المهبلية وأرقامها الهيدروجينية ورائحتها ووجود الخلايا المفتاحية باعتماد طريقة Sweet & Gibbs(21).

جدول (1) أعداد العينات ونسبها المئوية التي اعطت نتيجة موجبة لبكتريا *G. vaginalis* حسب ألوانها والرقم الهيدروجيني والرائحة والخلايا المفتاحية

أوضحت النتائج (الجدول 1) أن وجود بكتريا *G.vaginalis* ارتبط بالافرازات الصفراء إذ شكلت 58.3% تليها من الافرازات البيضاء 28% ثم بقية الافرازات. كما أظهرت النتائج أن الرقم الهيدروجيني لعينات البحث التي عزلت منها بكتريا *G. vaginalis* تراوحت بين 5-6.8 وتراوحت بين (7-8.5) للعينات التي لم تعزل مما يشير إلى وجود عدد من العينات ذات رقم هيدروجيني مرتفع ولم تعزل منها البكتريا، وهذا معناه أن الاصابة متسببه عن ممرض آخر (21).

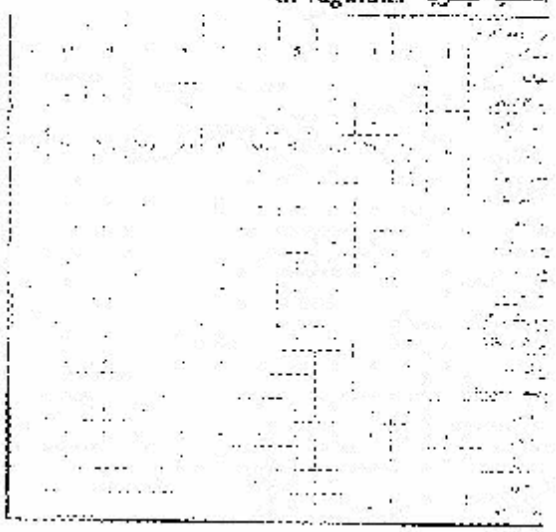
كما أوضحت النتائج أن نسبة العينات التي أعطت رائحة الرائحة بعد إضافة KOH كانت 29% و 9% من هذه العينات فقط عزلت منها بكتريا *G. vaginalis* (9) عزلات، مما سبق يمكن الاستنتاج انه لايمكن الاعتماد على أن الافرازات المهبلية ذات تداخل ألوان الافرازات كما أن تغير الرقم الهيدروجيني قد يعزى إلى نشاط الطفيليات مثل *Trichomonas vaginalis* والفطريات مثل *Candida* sp. كذلك لايمكن الاعتماد على رائحة الافرازات كصفة تشخيصية فقط تعزى الرائحة فضلا عن وجود بكتريا *G. vaginalis* إلى وجود الطفيل *T. vaginalis* ووجود الحراش في الافرازات المهبلية التي يمكن أن تحرر حلقة أروماتية عند تفاعلها مع هيدروكسيد البوتاسيوم (10%) مما يؤدي إلى تداخلها مع تشخيص بكتريا *G. vaginalis* (14).

بينت آراء الباحثين حول اختبار وجود الخلايا المفتاحية كصفة أساسية في الاستدلال على وجود بكتريا *G. vaginalis* أن نتائج الدراسة الحالية تدعم العلاقات مابين ظهور الخلايا المفتاحية ووجود بكتريا *G. vaginalis* في الافرازات المهبلية إذ أظهرت النتائج (الجدول 1) أن بكتريا *G. vaginalis* عزلت حوالي 92% من العينات التي ظهرت فيها الخلايا المفتاحية.

الصفات البايوكيميائية والفسلجية

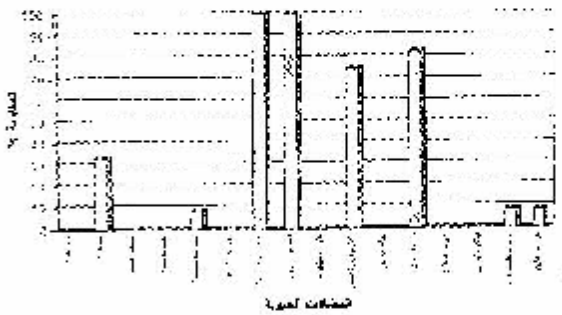
يوضح الجدول (2) الاختبارات البايوكيميائية والفسلجية التي استخدمت في تشخيص بكتريا *G. vaginalis* وأظهرت نتائج هذه الاختبارات أن كافة العزلات أعطت نتيجة موجبة لفحص هيبوريت الصوديوم وفحص المثيل الأحمر كما كانت جميع العزلات مخمرة لسكري اللاكتوز والمالتوز وهذه النتائج متطابقة مع نتائج الاختبارات في (3) باستثناء نتائج تخمر سكري الرافينوز والمانيتول إذ خمرت ثلاثة عزلات سكر الرافينوز (25%) في حين خمرت عزلتي سكر المانيتول (16.6%) علما أن بكتريا *G. vaginalis* لاتخمر سكري الرافينوز والمانيتول وقد يعزى ذلك إلى إمكانية حدوث بعض الشواذ في الخصوصيات البايوكيميائية أو قد تعزى إلى كون العزلات التي أظهرت الشواذ في تخمر سكر الرافينوز (للعزلة 6,1,2) هي بكتريا مشابهة لبكتريا *G. vaginalis* (*G. vaginalis* like isolate) (22) وتبعا للصفات البايوكيميائية يمكن التأكد بأنها تعود لبكتريا *G. vaginalis*.

جدول (2) نتائج الاختبارات الكيموحيوية والزرعية للعزلات المحلية لبكتريا *G. vaginalis*



حساسية البكتريا لمضادات الحيوية

درست حساسية عزلات بكتريا *G. vaginalis* لعدد من مضادات الحيوية المختلفة ولقد اظهرت النتائج (الشكل 1) أن جميع عزلات البكتريا كانت حساسة (100%) لمضادات لينكومايسين، جنتامايسين، سيفالوسبورين، اريثرومايسين، كلورامفينيكول، امبسلين، ريفامبيسين وكلوكساسلين ومقاومة (0:00%) لمضادي حامض النالديكسيك والميترونيدازول فضلا عن تباينها تجاه مضادات الحيوية الأخرى. ولقد أشارت بعض الدراسات المتعلقة باستجابة بكتريا *G. vaginalis* لمضادات الحيوية إلى أن هذه البكتريا تتفاوت في استجابتها لمضادات الحيوية (24,23) وهذا ما لوحظ عن مقاومتها لمضاد الميترونيدازول. إذ أشارت بعض الدراسات إلى أن بكتريا *G. vaginalis* مقاومة في حساسيتها لهذا المضاد، ففي الوقت الذي أشار فيه Ralph & Amanickes (25) إلى أن بكتريا *G. vaginalis* حساسة لمضاد الميترونيدازول وان هذا المضاد يساهم بشكل فعال في القضاء على هذه البكتريا، أشار (Jones,etal) (24) إلى مقاومة بكتريا *G. vaginalis* لمضاد الميترانيدازول وقد عزيت مقاومتها إلى وجود العلاقة التعايشية بين بكتريا *G. vaginalis* وأنواع بكتريا Bacteroid opp في النهابات المهبل اللاتخصصية حيث أن بكتريا Bacteriod حساسة جدا لهذا المضاد ومحتمل أن هذه البكتريا اللاهوائية تقتل بسرعة وتترك *G. vaginalis* تنمو بشكل اتي دفاع أخرى للمضيف. أن المقاومة الكبيرة (100%) لبكتريا *G. vaginalis* المعزولة في هذه الدراسة لمضاد الميترونيدازول قد تعزى للعلاقة التعايشية بين هذه البكتريا وأنواع بكتريا *Bacteroid* (24) وقد يعزى إلى انواع وطرق استخدام هذا المضاد في علاج الأمراض النفلية مثل الترايكوموناس المنتشرة بصورة واسعة في العراق. وتجدر الإشارة إلى إن مضاد الميترونيدازول خارج الجسم كان غير مؤثر على البكتريا لذا أظهرت البكتريا مقاومة عالية لهذا المضاد.

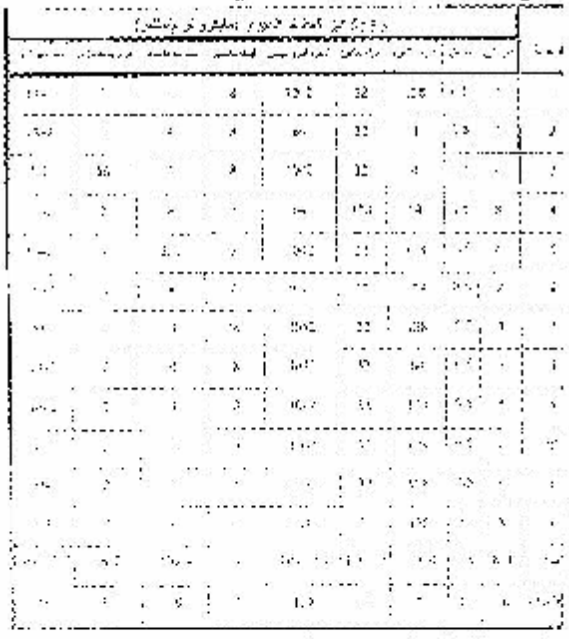


شكل (1) النسبة المئوية لمقاومة عزلات بكتريا *G. vaginalis* لمضادات حيوية

تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)

حدد التركيز المثبط الأدنى MIC لبعض مضادات الحيوية التي اختيرت كونه المضادات الأكثر استعمالا (Drug of Choice) لمعالجة إصابات الجهاز التناسلي الأنثوي المتسببة بفعل بكتريا *G. vaginalis*. وتعذر المصادر الخاصة بتحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمضادات الحيوية ضد بكتريا *G. vaginalis* على مستوى القطر على وجه الخصوص كانت هناك محاولة للتعرف على هذه التراكيز والمضادات المختلفة، والجدول (3) يوضح التركيز المثبط الأدنى المستخدمة من مضادات الحيوية ولجميع العزلات البكتيرية، ولعدم توفر عزلة قياسية لغرض المقارنة اعتمدت نقطة الانقطاع (Break Point) الموضحة من قبل (26) Kahn لأصناف الاستجابة والتي تمثل التركيز الأدنى الذي يصله المضاد في الميزم بحيث يوفر أعلى فعالية ضد الجراثيم، وعد الكائن مستجيبا عندما تكون مقادير MIC المحسوبة أقل من نقطة الانقطاع.

جدول (3) التركيز الادنى المثبط لبعض المضادات المستخدمة في علاج اصابات المهبل ببكتريا *G. vaginalis*.



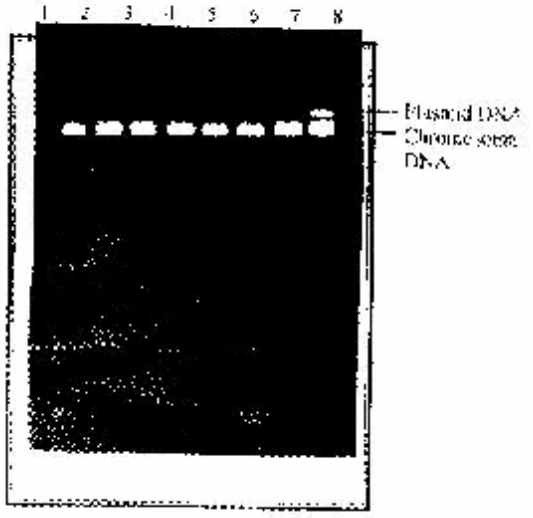
حدد التركيز المثبط الأدنى بطريقة تخفيف الشريط البكتيري وعند مقارنة النتائج بجدول (3) مع قيم نقطة التوقف نلاحظ أن جميع العزلات أظهرت قيم ل MIC مماثلة لمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة وهي الامبسلين، الجنتامايسين، الكلوكساسلين، الفراميسيتين، الكوتريمكسازول، النتروفيتوراتين، والستربتومايسين، إذ سجلت جميع العزلات قيما متقاربة لل MIC. نتائج مماثلة لوحظت من قبل Mc Carthy (23). بالنسبة للكوتريمكسازول حيث إن معدلات الحساسية 95 %

(2064) مايكروغرام/ملليتر فيما كانت نتائج الباحث المذكور مختلفة فيما يخص التراسيكلين إذ كانت قيم MIC في دراسته(0.5 64) مايكروغرام/ملليتر في حين سجلت عزلاتنا قيم بين (32-128) مايكروغرام/ملليتر.

أظهرت النتائج إن هناك اختلافا بين قيم MIC ونتائج الحساسية باستخدام أقراص المضادات حيوية فمثلا العزلات (1،3،4،2) كانت مقاومة للبنسلين باستخدام الأقراص في حين قبلت هذه العزلات بتركيز (0.5) مايكروغرام/ملليتر بطريقة MIC ويعزى ذلك إلى إن طريقة MIC أدق من استخدام الأقراص. على العموم إن الاستخدام غير المبرمج للمضادات الحيوية قد يؤدي في المدى البعيد أو القريب إلى ظهور سلالات من بكتريا *G. vaginalis* مقاومة لتراكيز أعلى من المضادات الحيوية أو مقاومة لأنواع جديدة من المضادات لم تكن مقاومة أصلا. فضلا عن أن ذلك قد يؤدي أيضا إلى اكتساب بكتريا إلى عوامل ضراوة (محمولة على عناصر متنقلة) من بكتريا أخرى موجودة معها في منطقة المهبل.

عزل الدنا

أشارت النتائج (الشكل 2) إلى عدم الحصول على أي حزمة بلازميدية عند استخلاص الدنا البلازميدي لجميع من عزلات *G. vaginalis* فضلا عن المحتوى البلازميدي لسلالة E. coli حاوية على البلازميد RP4 ذي الوزن الجزيئي 60 (كيلو زوج قاعدي)- إن عدم الحصول على أي حزمة بلازميدية على الرغم من استخدام عدد من الطرق الفيزيائية يمكن أن تعزى إلى عدم كفاءة الطرق المستخدمة، إذ كانت الطريقة المستخدمة (20) كفوءة جدا في عزل البلازميدات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة ومن سلالات مختلفة من بكتريا E. coli مثل البلازميد pPBR ذي الوزن الجزيئي الصغير (4.3 كيلو زوج قاعدي) (نتائج غير موضحة) والبلازميد RP4 ذي الوزن الجزيئي الكبير (60 كيلو زوج قاعدي) (الشكل 2) وبتركيز جيد مما يشير إلى كفاءة هذه الطريقة في عزل البلازميدات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة وعليه يمكن الجزم بان جميع عزلات بكتريا *G. vaginalis* كانت خالية من البلازميدات وقد أشارت بعض الدراسات إلى خلو هذه البكتريا من البلازميدات (26). إن خلو بكتريا *G. vaginalis* من البلازميدات يشير إلى أن الجينات المسؤولة عن مقاومة بعض عزلات هذه البكتريا لعدد من مضادات الحيوية المستخدمة تكون محمولة على الكروموسوم (ذات طبيعة كروموسومية) وقد تكون بعض هذه الجينات محمولة على عناصر متنقلة Transposable (elements) كما هو الحال في المقاومة لمضادات التراسيكلين (27).



الشكل (2)

إن خلو البكتريا المعزولة من البلازميدات يمكن أن يدعم كون جميع هذه العزلات قريبة من بعضها تصنيفيا ويدعم كونها بكتريا *G. vaginalis*.

المصادر

1. Leopold, S. (1953). Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. U.S. Armed Forces Med. g.4: 263-266
2. Chattopadhyay. B. (1984). The role of *Gardnerella vaginalis* non-specific Vaginitis. g. infect. 9: 113-125.
3. Holt, J. G.; Krig, N. R. ; Sneath, P.H.A.; Staley, J. t. and Williams, S.T. (1994) Bergeys manual of determinative bacteriology, 9th edition Williams & Wilkins Baltimore U.S.A.
4. Krieg, N.R; Holt, J.G.; etal. (1984). Bergeys manual of systematic bacteriology. Vol 1. Williams & Wilkins Baltimore/London
5. Robinson. J.D. (1984). The bacteriology of *Gardnerella vaginal*. Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl. 86: 41-55
6. Dunkelberg, W.E. (1977). *Corynbacterium vaginal*. Sex. Trans Dis. 4: 69-75
7. Pheifer, T.A; Forsyth, P.S.; Durfee, M.A.; Pollock, H.M.; and Holmes, K.K. (1978) Non-specific Vaginitis: role of Haemophilus Vaginalis and treatment with Metronidazole. E Engl. J. Med. 298: 1429-14340.
8. Rosenstein, I.J.; Morgan. D.J.; Sheehan. M., Lamont, R.F., and Robinson, D.T. (1996). Bacterial Vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram stains categories of the Vaginal flora. J. Med. Microbiol. 45. 120-126.
9. Holti', A. and Takgham. (1959). Non-specific Vaginal infection acritical evaluation of

Bacternides associated Veginitis. Eur. J. clin. Microbiol. Oct. 1(5); 320-325.

25. Ralph, E.D. and Amatnicks, Y.e. (1980). Relative susceptibility of *Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis) Neisseria gonorrhoeae* and *Bacteroides fragilis* to Metronidazole and tow magor metabolites. Sex. Trans. Dis. 7: 157- 160.
26. Neels (1991) National Committee for clinical Laboratory standards. 11(17).
27. Catlin, B.W. (1992). *Gardnerella vaginalis*. characteristic, clinical considerations and controversies. clin. Micro. Rew. 5(3): 213-237

Abstract

One hundred sample of Vaginal secretion with different colour were collected from females suffering from obvious Vaginosis, twelve isolate of *Gardnerella vaginalis* were identified. Most of isolates (7) were isolate from yellow secretion. However, (3) isolates were isolate from white secretion. While, only one isolate was isolate from Brownish and gray secretion. The pH of Vaginal secretion of positive sample rangec from (5 - 6.8). Nine of positive sample characterized with fishy odour. Our result showed that the presence of clue cell was of great important, since. (11) of all positive cases appeared the presence of such cell. Antibiogram result showed that all isolate were sensitive to Ampicillin, Gentamycin , Cefotaxime, Erythromycin, Rifampsin, Chloramphenicol, Cloxacillin and Lincomycin while Metronidazole and Nalidixic acid were incompitant against all isolates However, *G. vaginalis* Showed variable response against Penicillin, Streptomycin, Nitrofurnation, Neomycin, Co-trimaxazole & Tetracycline. MIC for nine antibiotics was determined. All isolate were sensitive to Ampicillin & Penicillin, while they were variable in their sensitivity to other antibiotics. Plasmid DNA extraction for *G. vaginalis* isolates demonstrate clearly, that all isolates were free of Plasmids. Never the less different methods of Plasmid DNA extraction were employed.

Haemophilus Vaginal, A.M.J. obstet. Gyne 77. 144 148.

10. Frampton, J. and Lee, (1964). Is Haemophilus Vaginalis apathogen in the female genital tract? J. obstet. Gyne. Br. Commonw. 71: 436-444.
11. Mc Cormack, W.M.; Evrand, J.R; Laughlin, C.F.; Rosner, B.; Alpert, S ; Crockett, C.A; Mc comb, D. and Zinner, S.H.(1981). Sexually transmitted conditions among women collage student. Am. J. obstet. Gyne. 139(2): 130-133
12. Reid , G.; Bruce, A.W.; Mc Grnarry, J.A; Cheng, K.J. and Costerton, J.W. (1990). Is there arole for Lactobacilli in prevention of Urogenitted and intestinal infections? Clin. Microbiol. Rev. 3: 335-344
13. Cauci , S.; Monte; R.; Driussi, S.; Lanzafame, P and Quadrifoglio, F. (1998). Impairment of the Mucosal Immune system: IgA and IgM cleavage detected in Vaginal Washing of asub group of patients with bacterial Vaginosis. J. inf. Dis. 178: 1698-1706.
14. Blackwell , A. & Barlow, D. (1982). Clinic diagnosis of anaerobic Vaginosis (Non-specific Vaginitis) Br. J. vender. Dis. 85(6): 387-393
15. Collins, C. H. and Lyne, P.M. (1987). Microbiological methods. 5th edition. Ed. Butterworths and Co. (publishers) Ltd., London.
16. Cruickshank , R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P and swaing R.H.A. (1975). Medical microbiology. Vol 2 12th ed. Churchill living stone London.
17. Cowan, S. T. (1974). Cowan and steels. Identification of Medical bacteria, 2nd ed. Cambridge University Press. London, New York
18. Stockes, E.J. and Ridgway, G.L. (1980). Clinical bacteriology 5th edition. Edward Arnold.
19. Baron , E.J. and Finegold, S.M. (1980). Diagnostic Microbiology, Bailey and Scottes, 8th ed. The C. Vinosby Company.
20. Rodriguez, R.L. and Tait, R.C. (1983). Recombinant DNA techniques an introduction Addition - Wesley.
21. Sweet, R.L. and Gibbs, R.S. (1990). Infections disease of the female genital tract, 2nd edition. Williams and Wilkins, London.
22. Yong, D.C.T. and Thampson, S. (1982). Rapid microbiochemical method for Identification of *Gardnerella (Haemophilus) vaginal*. J. clin. microbial. 169(1): 30-33.
23. Mc Carthy, L.R.; Mickelsen, P.A. and Smith, E.G. (1979). Antibiotic susceptibility of *Haemophilus vaginalis (Corynbacterium vaginale)* to 21 Antibiotics. Antibacterial Agent and Chamotherapy. 16(2): 186-189.
24. Jones , B. M.; Kingborn, G.R. and Duerden, B. I. (1982). An overview of the diagnosis and treatment of *Gardnerella vaginalis* and