Original Article

Co-Existence of Heterogene and Heteroresistance *Helicobacter Pylori* Strains in a Single Host

Parastoo Saniee [1,*], Marzieh Raoofimanesh [1], Farideh Siavoshi [2], Sara Kadkhodaee [2], Gelareh Poostizadeh [2]

[1] Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[2] Department of Microbiology, School of Biology, University College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background:
Helicobacter pylori (*H. pylori*) exhibits considerable genetic diversity, which contributes to adaptation to the new host, wide spread, and its ability to cause various gastrointestinal diseases. In this study, the possibility of the presence of *H. pylori* strains with different genetic and antibiotic resistance patterns in a single host was investigated.

Materials and Methods:
Gastric biopsy samples of 10 *H. pylori*-positive patients were cultured on selective brucella agar and incubated microaerobically. Four single colonies per patient were picked from the primary culture and sub-cultured to obtain pure *H. pylori* isolates. Antibiotic susceptibility/resistance of primary culture, as well as pure *H. pylori*, isolates to nine common antibiotics in eradication (in MIC) was assessed by agar dilution method. Genotyping was performed by amplification of cagA and signal (s1 and s2) and middle (m1 and m2) regions of vacA genes.

Results:
Heteroresistance was observed in seven patients to tetracycline, in five patients to levofloxacin, in five patients to metronidazole, in three patients to ofloxacin, in five patients to rifampin, in two patients to furazolidone, in one patient to amoxicillin, and in one patient to clarithromycin. Considering the cagA gene and vacA s and vacA m alleles, four patients carried *H. pylori* isolates with two different genotypes and three patients carried the isolates with three different genotypes.

Conclusion:
The presence of heterogeneous and heteroresistance *H. pylori* strains in a single host can have a direct impact on the treatment outcome of the infection. In this regard, in order to have accurate information on *H. pylori* infection in each individual, sampling of several gastric areas along with examining of 3-10 single colonies from the primary culture is recommended.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Antibiotic resistance, Genetic diversity

please cite this paper as:
Saniee P, Raoofimanesh M, Siavoshi F, Kadkhodaee S, poostizadeh G. Co-Existence of Heterogene and Heteroresistance Helicobacter Pylori Strains in a Single Host. *Govaresh* 2020;25:179-187.

Corresponding author:
Parastoo Saniee, PhD
Shahid Beheshti University, Velenjak, Tehran, Iran

Tel: + 98 21 29905940
Fax: + 98 21 22431664
E-mail: p_saniee@sbu.ac.ir

Received: 08 Apr. 2020
Edited: 01 Aug. 2020
Accepted: 02 Aug. 2020

مقاله پژوهشی

وجود سویه های *هلیکوباکتر پیلوری* با خصوصیات ژنتیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی مختلف در یک میزبان منفرد

پرستو صنیعی[۱،*]، مرضیه رئوفی منش[۱]، فریده سیاوشی[۲]، سارا کدخدایی[۲]، گلاره پوستی زاده[۲]

[۱] بخش میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فن آوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران ، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
هلیکوباکتر پیلوری[1] دارای ناهمگونی ژنتیکی بالایی است که در سازگاری با میزبان جدید، انتشار وسیع و توانایی آن برای ایجاد بیماری های گوارشی مختلف نقش دارد. در این مطالعه امکان حضور سویه های *H. pylori* با ژنتیک و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مختلف در معده یک فرد بررسی می شود.

روش بررسی:
نمونه بیوپسی معده گرفته شده از ۱۰ بیمار *H. pylori* مثبت بر روی محیط بروسلا آگار خون دار انتخابی کشت داده و در شرایط کم هوازی گرمخانه گذاری شد. از کشت اولیه هر بیمار چهار تک کلونی برداشته و کشت مجدد داده شد. کشت اولیه و چهار تک کلونی به دست آمده از هر بیمار برای تعیین حساسیت/ مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به نه آنتی بیوتیک رایج در ریشه کنی (در غلظت MIC) به روش رقت سازی در آگار استفاده شدند. تعیین ژنوتیپ سویه های *H. pylori* با تکثیر ژن cagA و ناحیه نشانه (s1 و s2) و میانی (m1 و m2) ژن vacA انجام شد.

یافته ها:
در هفت بیمار نسبت به تتراسیکلین، پنج بیمار لووفلوکساسین، پنج بیمار مترونیدازول، سه بیمار اوفلوکساسین، پنج بیمار ریفامپین، دو بیمار فورازولیدون، یک بیمار آموکسی سیلین و یک بیمار کلاریترومایسین مقاومت نامتجانس مشاهده شد. با در نظر گرفتن همزمان ژن cagA و الل های vacA s و vacA m در چهار بیمار دو ژنوتیپ متفاوت و در سه بیمار سه ژنوتیپ متفاوت *H. pylori* دیده شد.

نتیجه گیری:
وجود سویه های *H. pylori* دارای تنوع ژنتیکی و مقاومت نامتجانس در معده یک فرد می تواند بر نتایج درمان عفونت تاثیر مستقیم داشته باشد. به همین دلیل جهت بررسی دقیق و داشتن اطلاعات صحیح از عفونت *H. pylori*، نمونه گیری از چند ناحیه معده به همراه بررسی تعداد ۱۰-۳ تک کلونی از کشت اولیه پیشنهاد می شود.

کلید واژه: *هلیکوباکتر پیلوری*، مقاومت آنتی بیوتیکی، تنوع ژنتیکی

گوارش/ دوره ۲۵، شماره ۳/ پاییز ۱۷۹-۱۸۷/۱۳۹۹

1. *Helicobacter pylori*

*نویسنده مسئول: پرستو صنیعی
ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فن آوری زیستی، بخش میکروبیولوژی

تلفن: ۰۲۱-۲۹۹۰۵۹۴۰
نمابر: ۰۲۱-۲۲۴۳۱۶۶۴
پست الکترونیک: p_saniee@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۲۰
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۹/۰۵/۱۱
تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۲

زمینه و هدف:

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری بیماریزای موفق است که به طور طبیعی تنها در معده انسان مستقر شده و با التهاب مزمن معده، زخم های معده و دوازدهه، سرطان معده و لنفومای مالت در ارتباط است.(۱) بررسی ها نشان می دهد که شانس ایجاد بیماری توسط *H. pylori* با میانکنش ژنتیک میزبان انسانی و عوامل محیطی و همچنین فاکتورهای بیماریزای باکتری که مهمترین انها vacuolating cytotoxin A (vacA) و cytotoxic-associated gene A (cagA) می باشند مرتبط است.(۲ و۳) با وجودی که به نظر می رسد شیوع عفونت *H. pylori* در برخی مناطق دنیا کاهش یافته است، شیوع عفونت در مطالعات مختلف ۸۶-۲۵٪ گزارش شده است و بر اساس آمار مرکز کنترل بیماری ها در آمریکا حدود ۵۰٪ افراد در دنیا به *H. pylori* آلوده هستند.(۴ و ۵) در ایران عفونت *H. pylori* در نزدیک به ۹۰٪ از جمعیت افراد بزرگسال وجود دارد که این

عفونت در سال های اولیه زندگی اتفاق می افتد و بیش از ۵۰٪ از کودکان قبل از سن ۱۵ سالگی دچار این عفونت می شوند.(۶) آنچه مورد توافق همه دانشمندان است این است که عفونت *H. pylori* در نبود درمان مناسب معمولا برای طول عمر باقی می ماند که نشان دهنده این است که پاسخ های ایمنی میزبان درحذف عفونت موفق نیستند .(۷) به همین دلیل مطابق استانداردهای جهانی، ریشه کنی عفونت *H. pylori* در بیماران مبتلا به زخم های گوارشی، گاستریت آتروفیک و لنفومای مالت معده با درجه کم و همچنین افرادی که خویشاوندان درجه یک آنها به سرطان معده مبتلا هستند ضروری است.(۸) با این وجود یک رژیم درمانی ایده آل که نرخ ریشه کنی بالاتر از ۹۰٪ داشته باشد تاکنون به دست نیامده است که پیامد آن افزایش جمعیت های مقاوم به آنتی بیوتیک و در نتیجه کاهش کارایی درمان های ریشه کنی می باشد .(۹ و ۱۰)

به دنبال کشف *H. pylori*، مطالعات صورت گرفته بر روی ژنوم باکتری نشان داد که *H. pylori* از ناهمگونی ژنتیکی و تنوع اللی بسیار بالایی برخوردار است و این سطح تنوع در هیچ باکتری دیگری مشاهده نشده است.(۱۱ و ۱۲) به نظر می رسد که این سرعت بالای تنوع و ایجاد جهش، در سازگاری با میزبان جدید و انتشار وسیع و همچنین توانایی *H. pylori* برای ایجاد بیماری های گوارشی مختلف نقش دارد.(۱۳، ۱۴) مطالعات صورت گرفته نشان می دهد که سویه های *H. pylori* آلوده کننده افراد مختلف با یکدیگر متفاوت بوده و *H. pylori* هر فرد از لحاظ خصوصات ژنتیکی مانند اثر انگشت منحصر به خود او است.(۱۵) محققین صاحب نظر معتقدند که میزان تنوع ژنتیکی *H. pylori* تا حدی است که به نظر می رسد در طول تاریخ تکامل با میزبان انسانی خود هم تکامل بوده و الگوی پراکندگی ژنتیکی آن با الگوی مهاجرت جوامع بشری منطبق است.(۱۶) از مهمترین علل این تنوع اللی می توان به بالا بودن میزان جهش در *H. pylori* نسبت به باکتری های دیگر، به علت تکامل نیافتن سیستم های ترمیم اشاره کرد.(۱۱، ۱۷) در یک مطالعه نرخ جهش نقطه ای در ژنوم *H. pylori* در حدود ۳۰ جهش در سال تخمین زده شده است (۱۸) که این رقم در برابر نرخ جهش در سایر باکتری ها به عنوان مثال) اشریشیا کولی[1] (یک جهش در سال)(۱۹) و مایکوباکتریوم توبرکولوزیس[2] (۰/۵جهش در سال) (۲۰) بسیار بالا است. همچنین شایستگی بالای *H. pylori* برای دریافت DNA خارجی از طریق ترانسفورماسیون و بالا بودن میزان نوترکیبی از دیگر عوامل تنوع ژنتیکی و اللی در سویه های مختلف *H. pylori* هستند.(۱۶، ۲۱)

تحقیقات صورت گرفته اخیر نشان می دهد که تنوع ژنتیکی میان جمعیت *H. pylori* تا حدی است که در معده یک فرد نیز امکان حضور همزمان سویه های با ژنتیک مختلف وجود دارد. نرخ شیوع عفونت مخلوط *H. pylori* در مطالعات مختلف بین ۱۰۰-۰٪ تخمین زده شده که تفاوت روش بررسی از مهمترین دلایل این اختلاف می باشد.(۲۲) همچنین برخی مطالعات نشان می دهد حتی در صورتی که سویه های جدا شده از معده یک فرد از لحاظ ژنتیکی یکسان باشند، می توانند دارای الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوت باشند. در این صورت به نظر می رسد سویه های مقاوم و حساس از یک سویه حساس اولیه در معده یک فرد و تحت فشار انتخابی حضور آنتی بیوتیک تکامل یافته باشند.(۲۴،۲۳) این پدیده که تحت عنوان مقاومت نامتجانس شناخته می شود اولین بار در سال ۱۹۴۷ در باکتری هموفیلوس انفلوانزا[3] مشاهده (۲۵) و پس از آن در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس[4] (۲۶) و مایکوباکتریوم توبرکولوزیس نیز گزارش شد.(۲۷) بررسی ها نشان می دهد که شیوع سویه های با مقاومت نامتجانس در مناطقی که مصرف آنتی بیوتیک بیشتر است بالاتر می باشد.(۲۸)

تا کنون چندین مطالعه به وجود همزمان سویه های متفاوت *H. pylori* در معده یک فرد اشاره کرده اند ولی نتایج در این زمینه متفاوت است. در ایران تا کنون مطالعه ای که وجود سویه های با ژنتیک و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مختلف را در معده یک فرد بررسی کند صورت نگرفته است. در این مطالعه بیوپسی معده ۱۰ بیمار *H. pylori* مثبت کشت داده شد. از کشت بیوپسی معده هر بیمار چهار کلونی باکتری جدا و خالص سازی شدند. کشت خالص هر کلونی برای تعیین ژنوتیپ و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی (به ۹ آنتی بیوتیک رایج در ریشه کنی) استفاده شد. سپس نتایج در مورد کشت اولیه بیوپسی ها و چهار کلونی جدا شده از هر بیمار مقایسه و تفاوت ها و شباهت ها بررسی شد.

روش بررسی:

بیماران

در این مطالعه از ۱۰ بیمار مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی پژوهشگاه گوارش و کبد بیمارستان شریعتی که تست اوره آز سریع وجود عفونت *H. pylori* را در آنها تایید کرده بود استفاده شد. این بیماران از میان ۱۶۰ بیمار *H. pylori* مثبت شرکت کننده در طرح دیگر پژوهشی انتخاب شدند. از این ۱۰ بیمار ۴ بیمار زن و ۶ بیمار مرد با محدوده سنی ۲۵ تا ۶۰ سال و همگی مبتلا به گاستریت معده بودند. پیش از نمونه گیری از همه بیماران رضایت نامه گرفته شد و مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران تایید شد.

کشت و جدا سازی باکتری ها

بیوپسی گرفته شده از هر بیمار بر روی محیط انتخابی بروسلا آگار حاوی ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند و آنتی بیوتیک های ونکومایسین (mg/ 10 L)، پلی میکسین (50 µg/L) و تری متوپریم، (5 mg/L) کشت داده و به مدت ۷-۵ روز در شرایط کم هوازی (۱۰-۵٪ دی اکسید کربن) در دمای ۳۷ C° گرمخانه گذاری شد. سپس کلونی های شفاف و سر سوزنی و براق *H. pylori* از محیط جداسازی و هویت آنها با رنگ آمیزی گرم و انجام تست های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز و اوره آز تایید شد.

1. *Escherichia coli*
2. *Mycobacterium tuberculosis*
3. *Haemophilus influenzae*
4. *Staphylococcus aureus*

جدول ۱: توالی پرایمرها جهت تعیین ژنوتیپ سویه های *H. pylori* و اندازه محصول تکثیر شده

ژن	پرایمر	توالی	اندازه محصول PCR (bp)	رفرنس
cagA	D008	ATAATGCTAAATTAGACAACTTGAGCGA	۲۹۸	(۳۲)
	R008	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		
VacA (s1, s2)	VA1F	ATGGAAATACAAGAAACACACC	s1 : ۲۵۹ s2 : ۲۸۶	(۳۳)
	VA1R	CTGCTTGAATGCGCCAAACTTTAATC		
VacA (m1, m2)	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	m1 : ۵۷۰ m2 : ۶۴۵	(۳۳)
	VAG-R	GCGTCAAAATAATTCCAAGG		

جداسازی تک کلونی های باکتری

از کشت اولیه بدست آمده از هر کدام از بیماران سوسپانسیون معادل استاندارد ۲ مک فارلند (۳×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر) در سرم فیزیولوژی تهیه شد. سپس به منظور جداسازی کلونی های تک، 50 µl از سوسپانسیون باکتری بر روی پلیت بروسلا آگار انتخابی خون دار کشت انبوه داده شد. پس از ۱۵-۱۰ روز گرمخانه گذاری در شرایط کم هوازی، چهار تک کلونی از هر بیمار با استفاده از سر سمپلر برداشته و به محیط Brain Heart Infusion Broth حاوی ۱۰٪ سرم اسب تلقیح و مجددا گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، 100 µl از محیط کشت به صورت نقطه ای بر روی محیط بروسلا آگار خون دار غیر انتخابی کشت داده شد.کلونی های رشد کرده جدا سازی و با انجام ۱۵-۱۰ کشت مجدد با فاصله های زمانی ۳ تا ۵ روز تکثیر و جهت انجام تست آنتی بیوگرام و استخراج DNA در فریزر °C ۸۰- نگهداری شدند.

تایید هویت سویه های *H. pylori*

به منظور تایید باکتری های جداشده در مرحله اول و همچنین تک کلونی ها تکثیر 16S rRNA اختصاصی *H. pylori* در آنها به روش PCR انجام شد. به این منظور کشت تازه باکتری ها به محلول بافر فسفات نمکی منتقل شد و استخراج DNA ژنومی آنها با استفاده از روش فنل کلروفورم انجام گرفت.(۲۹) سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی-HP ´5 :GCAATCAGCGTCAGTAATGTTC´-3 -HP-R:´5GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3´ تکثیر ژن 16S rRNA مربوط به *H. pylori* در این سویه ها بررسی شد. برنامه PCR طی ۴۵ سیکل به این صورت بود: سه دقیقه واسرشتی اولیه در°C ۹۴، یک دقیقه واسرشتی در °C ۹۴، یک دقیقه اتصال پرایمرها در °C ۵۶، یک دقیقه مرحله تکثیر در °C ۷۲ و ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در °C ۷۲. محصولات PCR با استفاده از آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. از یک سویه *H. pylori* که پیش از این ژن 16S rRNA آن تعیین ترادف شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تست آنتی بیوگرام

H. pylori های بدست آمده از هر بیمار شامل کشت اولیه و همچنین ۴ تک کلونی برای تعیین حساسیت مقاومت آنتی بیوتیکی به روش رقت سازی در آگار و مطابق روش استاندارد CLSI استفاده شدند.(۳۰) به این منظور از ۹ آنتی بیوتیک رایج در ریشه کنی *H. pylori* با غلظت MIC (µgr/ml) به دست آمده در مطالعات قبلی (۳۱) استفاه شد: لووفلوکساسین (۱)، کلاریترومایسین (۲)، اوفلوکساسین (۱)، تتراسایکلین (۰/۵)، آموکسی سیلین (۱)، سیپروفلوکساسین (۱)، ریفامپین (۴)، فورازولیدون (۰/۵) و مترونیدازول(۸). محلول آنتی بیوتیک ها در دی متیل سولفوکساید تهیه و به محیط کشت بروسلا آگار غیر انتخابی حاوی ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند، اضافه شد. مقدار ۱۰ lµ از سوسپانسیون معادل ۲ مک فارلند هر یک از باکتری ها بر روی محیط به صورت نقطه ای کشت داده شد. پس از ۷-۵ روز گرمخانه گذاری رشد و عدم رشد باکتری ها در حضور آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

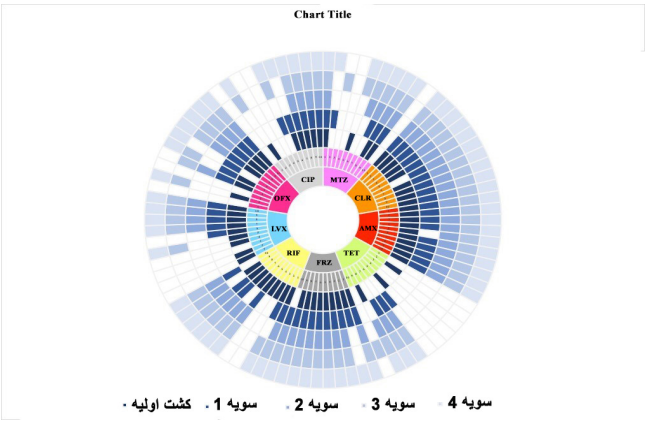
تعیین ژنوتیپ سویه های *H. pylori* جدا شده از هر بیمار

به منظور تعیین ژنوتیپ سویه های *H. pylori* جدا شده، از تکثیر ژن cagA و ناحیه نشانه (s1 و s2) و میانی (m1 و m2) ژن vacA استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده و همچنین اندازه محصول تکثیر شده در جدول یک آمده است. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ µl حاوی ۱۲/۵ µl از master mix PCR (Bio Fact, Korea), 1 1µ از هر پرایمر رفتی و برگشتی و DNA 2µ 1 باکتری تهیه شد. PCR به صورت سه دقیقه واسرشتی اولیه در C ۹۴°، یک دقیقه واسرشتی در C ۹۴°، یک دقیقه اتصال پرایمرها در ۵۶°C (cagA) و 5/53°C (vacA m و vacA s)، یک دقیقه مرحله تکثیر در °C ۷۲ و ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در °C ۷۲ انجام گرفت. محصولات PCR با استفاده از آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. از یک سویه *H. pylori* که پیش از این ژن های cagA و vacA آن تعیین ترادف شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته ها:

تست آنتی بیوگرام

بررسی نتایج آنتی بیوگرام در کشت اولیه *H. pylori* به دست آمده از بیوپسی معده ۱۰ بیمار مورد مطالعه نشان داد که هفت نمونه به تتراسیکلین، شش نمونه به مترونیدازول، چهار نمونه به سیپروفلوکساسین،



شکل ۱: مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در کشت اولیه با الگوی مقاومت بدست امده از چهار تک کلونی بدست آمده از ده بیمار مورد مطالعه. هفت دایره رسم شده به ترتیب از داخل به خارج: نام آنتی بیوتیک های تست شده، شماره بیماران، نتایج تست آنتی بیوگرام در کشت اولیه، نتایج آنتی بیوگرام در سویه یک، نتایج آنتی بیوگرام در سویه دو، نتایج آنتی بیوگرام در سویه سه و نتایج آنتی بیوگرام در سویه چهار را نشان می دهند. خانه های سفید نشان دهنده مقاومت و خانه های آبی رنگ نشان دهنده حساسیت به آنتی بیوتیک مورد بررسی است. هر ده بیمار مورد مطالعه حداقل در مورد یک آنتی بیوتیک دارای کلونی های با الگوی مقاومت متفاوت نسبت به کشت اولیه بودند. MTZ: مترونیدازول، CLR: کلاریترومایسین، AMX: آموکسی سیلین، TET: تتراسیکلین، FRZ: فورازولیدن، RIF: ریفامپین، LVX: لووفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CIP: سیپروفلوکساسین

سه نمونه به افلوکساسین، یک نمونه به کلاریترومایسین، یک نمونه به ریفامپین و یک نمونه به لووفلوکساین مقاوم بودند. هر ده کشت اولیه به دو آنتی بیوتیک آموکسی سیلین و فورازولیدون حساس بودند. کلونی های حاصل از کشت اولیه هر ده بیمار در مقاومت به حداقل یک انتی بیوتیک نسبت به کشت اولیه تفاوت(مقاومت نامتجانس) نشان دادند. مقاومت نامتجانس در بیمار شماره یک نسبت به آنتی بیوتیک لووفلوکساسین، بیمار دو: سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، تتراسیکلین، فورازولیدون، ریفامپین، لووفلوکساسین و افلوکساین، بیمار سه: مترونیدازول و ریفامپین، بیمار چهار: ریفامپین و لووفلوکساسین، بیمار پنج: سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، آموکسی سیلین، تتراسیکلین، لووفلوکساسین و افلوکساسین، بیمار شش: سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، کلاریترومایسین، تتراسیکلین، ریفامپین، لووفلوکساسین و افلوکساین، بیمار هفت: مترونیدازول و تتراسیکلین، بیمار هشت و نه: تتراسیکلین و بیمار ده: تتراسیکلین ، فورازولیدن و ریفامپین مشاهده شد. در مجموع، الگوی مقاومت سویه ها در کشت اولیه بیماران با حد اقل یکی از تک کلنی ها، به شرح زیر تفاوت نشان داد: هفت بیمار نسبت به تتراسیکلین، پنج بیمار لووفلوکساسین، پنج بیمار مترونیدازول، سه بیمار اوفلوکساسین، پنج بیمار ریفامپین، دو بیمار فورازولیدون، یک بیمار آموکسی سیلین و یک بیمار کلاریترومایسین (شکل ۱).

تعیین ژنوتیپ سویه های *H. pylori* جدا شده از هر بیمار

در سه بیمار از ده بیمار مورد مطالعه، هیچگونه تنوعی در ژن vacA و cagA دیده نشد؛ دربیمار اول ژنوتیپ هر چهار تک کلونی cagA +/ vacA s1m2، بیمار دوم cagA +/ vacA s2m2 و بیمار سوم cagA +/ vacA s2m1 به دست آمد. در میان هفت بیمار باقیمانده، در دو بیمار بین سویه های *H. pylori* از نظر دارا بودن ژن cagA تفاوت وجود داشت. در بیمار اول دو سویه cagA مثبت و دو سویه cagA منفی و در بیمار دوم یک سویه cagA مثبت و سه سویه cagA منفی بود. تنوع اللی در vacA s در چهار بیمار دیده شد; در دو بیمار تنها یک کلونی با بقیه متفاوت بود و در دو بیمار دو کلونی s1 و دو کلونی s2 بودند. تنوع اللی در vacA m در پنج بیمار دیده شد; در سه بیمار تنها یک تک کلونی با بقیه متفاوت بود و در دو بیمار دو کلونی m1 و دو کلونی m2 بودند. در مجموع و با در نظر گرفتن وجود همزمان اللهای vacA s و vacA m در شش بیمار دو ژنوتیپ متفاوت و در یک بیمار سه ژنوتیپ متفاوت از vacA s/m دیده شد. همچنین با در نظر گرفتن همزمان ژن cagA و الل های vacA s و vacA m در چهار بیمار دو ژنوتیپ متفاوت و در سه بیمار سه ژنوتیپ متفاوت *H. pylori* دیده شد (جدول ۲). علاوه بر این، در هیچکدام از بیماران ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و وجود مقاومت نامتجانس در سویه های *H. pylori* مشاهده نشد.

بحث:

مقاومت نامتجانس[1] زمانی در یک جمعیت باکتریایی اتفاق می افتد که زیر مجموعه ای از آن پاسخ (حساسیت / مقاومت) متفاوتی به آنتی بیوتیک ها نشان دهند.(۳۴) در این مطالعه کلونی های حاصل از کشت اولیه هر ده بیمار در مقاومت به حداقل یک آنتی بیوتیک نسبت به کشت اولیه تفاوت (مقاومت نامتجانس) نشان دادند. بیشترین تفاوت در الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی کشت اولیه با تک کلونی ها مربوط به تتراسیکلین بود (هفت بیمار). بعد از آن الگوی مقاومت به لووفلوکساسین، مترونیدازول و ریفامپین در پنج بیمار، اوفلوکساسین، در سه بیمار، فورازولیدون در دو بیمار و آموکسی سیلین و کلاریترومایسین در یک بیمار، در کشت اولیه و حداقل یکی از تک کلونی ها متفاوت بود. ماتئوو[2] و همکاران مشاهده کردند که دو سویه *H. pylori* جدا شده از ناحیه آنتروم یک بیمار دارای دو الگوی متفاوت مقاومت آنتی بیوتیکی بودند. کمترین غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در این دو سویه ۲ g/mlμ و ۰/۰۶ به دست آمد که نشان دهنده اهمیت وجود سویه های با مقاومت نامتجانس و نیاز به ردیابی و تشخیص آنها پیش از تجویزآنتی بیوتیک است.(۳۵) در مقاله دیگری از کره جنوبی ۷۰٪ از بیماران دارای باکتری های با الگوی متفاوت مقاومت آنتی بیوتیکی در آنتروم و بادی بودند.(۳۶) در بررسی های مختلف اختلاف زیادی میان روش های سنجش حساسیت انتی بیوتیکی *H. pylori* در in vitro و in vivo وجود دارد. این احتمال هست که یکی از دلایل اصلی وجود سویه های با مقاومت نامتجانس در جمعیت باکتریایی موجود در معده باشد. کیم[3] و همکاران در یک مطالعه وسیع سویه های جدا شده از ناحیه آنتروم و کورپوس ۱۰۹ بیمار را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که در ۴۱ (۳۸٪) مورد سویه های جدا شده از این دو ناحیه از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی نامتجانس بودند و اگر تنها مانند اکثر مطالعات صورت گرفته بیوپسی های ناحیه آنتروم مورد بررسی قرار می گرفت ۳۴٪ از نمونه های مقاوم اشتباها در گروه حساس طبقه بندی می شدند.(۳۷) دیلا اوبرا[4] وهمکاران در ۱۰٪ بیماران

1. Heteroreistance
2. Matteo
3. Kim
4. De la Obra

جدول ۲: ژنوتیپ چهار تک کلونی *H. pylori* (۱-۲-۳-۴) به دست آمده از هفت بیمار که ناهمگونی ژنتیکی در آنها مشاهده شده است

بیماران	تک کلونی	vacA (s)	vacA (m)	cagA
۱	۱	s۱	m۱	+
	۲	s۱	m۱	+
	۳	s۲	m۱	+
	۴	s۲	m۲	+
۲	۱	s۲	m۱	+
	۲	s۲	m۲	–
	۳	s۲	m۲	+
	۴	s۲	m۲	–
۳	۱	s۱	m۱	+
	۲	s۱	m۲	–
	۳	s۱	m۱	–
	۴	s۱	m۱	–
۴	۱	s۲	m۲	+
	۲	s۱	m۱	+
	۳	s۱	m۱	+
	۴	s۲	m۲	+
۵	۱	s۱	m۱	+
	۲	s۱	m۱	+
	۳	s۲	m۱	+
	۴	s۱	m۱	+
۶	۱	s۲	m۲	+
	۲	s۲	m۱	+
	۳	s۲	m۱	+
	۴	s۲	m۲	+
۷	۱	s۲	m۱	+
	۲	s۱	m۱	+
	۳	s۱	m۱	+
	۴	s۱	m۱	+

مطالعه شده وجود سویه های مقاوم و حساس به مترونیدازول را گزارش کردند.(۳۸) در مطالعه ای دیگر سویه های *H. pylori* مقاوم و حساس به مترونیداوزل و لووفلوکساسین و کلاریترومایسین در باکتری های جدا شده از یک بیمار مشاهده شد.(۲۴) در مطالعه ای در سال ۲۰۱۷ ایزوله های جدا شده از معده چهار بیمار، با وجود داشتن ژنوتیپ یکسان از نظر ژن cagA والل های vacA، نسبت به آنتی بیوتیک های مترونیدازول، کلاریترومایسین و آموکسی سیلین دارای مقاومت نامتجانس بودند که نشان دهنده تفاوت حساسیت آنتی بیوتیکی علی رغم شباهت ژنتیکی بین سویه های موجود در معده این افراد بود .(۳۹) در مطالعه حاضر در یک بیمار هر چهار تک کلونی نسبت به فورازولیدن و ریفامپین و در یک بیمار نسبت به کلاریترومایسن حساس بودند، با این وجود کشت اولیه نسبت به این آنتی بیوتیک ها مقاوم بود. گزارش شده است که این امکان وجود دارد که جمعیت با مقاومت بیشتر نسبت به یک آنتی بیوتیک از یک فرد جداسازی شوند ولی در کشت های مجدد مثلا بعد پنج تا ده بار در محیط فاقد آنتی بیوتیک، زیر جمعیتی از باکتری ها با فنوتیپ اولیه حساس رشد کنند.(۴۱,۴۰)

در چند مطالعات صورت گرفته بر روی تک کلونی های *H. pylori* جدا شده از نواحی مختلف معده مشاهده شده است که سویه های موجود در معده یک فرد می توانند ژنوتیپ متفاوت داشته باشند که تحت عنوان عفونت چندگانه از آن نام برده می شود.(۲۴,۱۸) در مطالعه حاضر در دو بیمار بین سویه های *H. pylori* از نظر دارا بودن ژن cagA، در چهار بیمار از نظر الل های vacA s و در پنج بیمار از نظر الل های vacA m تنوع وجود داشت. در مجموع و با در نظر گرفتن همزمان ژن cagA و الل های vacA s و vacA m در چهار بیمار دو ژنوتیپ متفاوت و در سه بیمار سه ژنوتیپ متفاوت *H. pylori* دیده شد. مطالعه ای در سال ۲۰۱۹، با بررسی فاکتور های ویرولانس *H. pylori* نشان داد ۴۰٪ بیماران با سویه های دارای الل های متفاوتvacA s و ۲۰٪ با سویه های دارای اللهای متفاوت vacA m و vacA i آلوده بودند. در این مطالعه وجود همزمان سویه های با الگوی ژنتیکی متفاوت به روش RAPD در ۱۲٪ بیماران دیده شد. همچنین در مجموع در ۵۰٪ بیماران سویه های *H. pylori* متفاوت از نظر فاکتورهای ویرولانس و مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شدند.(۳۶) مطالعات نشان می دهد که در مناطقی که *H. pylori* شیوع بالاتری دارد احتمال بروز عفونت چندگانه با سویه های متفاوت نیز بالاتر است.(۲۲) میزان شیوع عفونت چندگانه *H. pylori* در کشورهای پیشرفته پایین تر (۱۰-۰٪) و در کشورهای در حال توسعه بالاتر و در حدود ۳۵-۲۰٪ است.(۴۵-۴۳) سوالی که مطرح می شود این است که وجود این سویه های متفاوت از نظر ژنتیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی به طور همزمان در معده چه تاثیری بر نتیجه عفونت و بیماری در فرد دارد. مطالعات نشان می دهد که وجود مقاومت نامتجانس در باکتری ها با شکست درمان (۴۶)، باقی ماندن عفونت باکتری (۴۷) و افزایش میزان مرگ و میر (۴۸) مرتبط است. از علل عمده می توان به جایگزینی جمعیت حساس به آنتی بیوتیک با جمعیت مقاوم تحت فشار انتخابی حضور آنتی بیوتیک اشاره کرد. دیده شده است که شکست درمان مننژیت ناشی از عفونت اسینوباکتر بائومانی[1] با کلیستسین[2] ناشی از وجود مقاومت نامتجانس و انتخاب سویه های مقاوم به این ترکیب است.(۴۹) مطالعه ای که به بررسی تغییرات پاتولوژیک معده در اثر عفونت *H. pylori* پرداخته بود نشان داد که وجود مقاومت نامتجانس ارتباط معنی داری با بروز متلاپلازیای روده ای دارد.(۴۵) در مطالعه دیگر میزان مقاومت نامتجانس در افراد مبتلا به زخم های گوارشی به طور واضحی از افراد مبتلا به گاستریت مزمن بالاتر بود.(۵۰) در رابطه با علت ایجاد تنوع ژنتیکی *H. pylori* در معده یک فرد نظریه های مختلفی وجود دارد. محققین معتقدند که تغییرات درون معده میزبان به عنوان یک

1. *Acinetobacter baumannii*
2. Colistin

نیروی فشار انتخابی عمل کرده و *H. pylori* با استفاده از تنوع ژنتیکی بالای خود و ایجاد زیرگونه های جدید می تواند به سرعت خود را با این تغییرات سازگار کند. مشاهده شده است که تفاوت pH بین نواحی مختلف معده می تواند باعث به وجود آمدن الل های مختلف فاکتورهای چسبندگی BabA وابسته به pH شود.(۵۱) با این وجود به نظر می رسد که مصرف آنتی بیوتیک برای ریشه کنی *H. pylori* و یا درمان عفونت های دیگر تاثیر مهمتری را بر بروز تغییرات ژنتیکی *H. pylori* در معده میزبان انسانی می گذارد.(۱۲)

نتیجه گیری:

شواهد محکمی وجود دارد که نشان می دهد درمان عفونت *H. pylori* باعث بهبود گاستریت، به تاخیر انداختن و یا پیشگیری از عوارض طولانی مدت و یا ممانعت از برگشت بیماری می شود.(۳۶) به همین منظور رژیم های درمانی مختلفی متشکل از آنتی بیوتیک ها و داروهای کاهنده اسید مختلف جهت ریشه کنی عفونت *H. pylori* طراحی شده است که در بسیاری موارد کارایی لازم جهت ریشه کنی عفونت را ندارند. کاهش نرخ ریشه کنی عفونت*H. pylori* و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی لزوم انجام تست های سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی در محیط in vitro و طراحی رژیم های درمانی با توجه به الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در هر فرد را نشان می دهد. وجود سویه های مقاوم و حساس به طور همزمان در معده یک فرد، تفسیر نتایج آنتی بیوگرام در محیط کشت و به دنبال آن طراحی یک راهکار صحیح درمانی را با چالش مواجه می کند .(۵۲،۲۴)

به علاوه، این احتمال وجود دارد که دلیل شکست درمان های معمول آنتی بیوتیکی در بسیاری از مواقع وجود سویه های با ژنوتیپ و یا مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوت باشد. به نظر می رسد که این باکتری ها می توانند در طول دوره درمان انتی بیوتیکی بقا خود را حفظ کنند و پس از اتمام دوره مجددا تکثیر شده و افزایش جمعیت داشته باشند.(۵۳)

امروزه کشت *H. pylori* از بیوپسی معده به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص عفونت شناخته می شود. به طور معمول، یک بیوپسی گرفته شده از ناحیه آنتروم کشت داده شده و مجموع کلونی های رشد کرده و یا یک کلونی از سطح پلیت برداشته شده و جهت آنتی بیوگرام و یا بررسی های ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد. با این روش وجود مقاومت آنتی بیوتیکی نامتجانس و یا عفونت چندگانه ممکن است نادیده گرفته شود .(۵۴) با توجه به این که وجود تنوع ژنتیکی و مقاومت نامتجانس می تواند بر نتایج درمان عفونت تاثیر مستقیم داشته باشد، جهت بررسی دقیق و داشتن اطلاعات صحیح از عفونت *H. pylori*، نمونه گیری از چند ناحیه معده به همراه بررسی تعداد ۱۰-۳ تک کلونی از کشت اولیه پیشنهاد می شود. علاوه براین، انجام مطالعات تکمیلی جهت بررسی ارتباط وجود سویه های ناهمگون *H. pylori* در معده و یافته های بالینی مانند زخم و سرطان معده ضروری به نظر می رسد.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارضی در میان نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES:

1. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Ann Rev Microbiol* 2000;54:615-40.
2. Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* 2014;15:306-16.
3. Foegeding NJ, Caston R, McClain M, Ohi M, Cover T. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins* 2016;8:173.
4. Goh KL, Chan WK, Shiota S, Yamaoka Y. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications. *Helicobacter* 2011;16:1-9.
5. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2014; 19:1-5.
6. Hosseini E, Poursina F, de Wiele TV, Ghasemian Safaei H, Adibi P. Helicobacter pylori in Iran: A systematic review on the association of genotypes and gastroduodenal diseases. *J Res Med Sci* 2012;17:280-92.
7. Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M , Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in Helicobacter pylori infection. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11:2209-20.
8. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D,et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56:772-81.
9. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 2010;59:1143-53.
10. Zagari RM, Rabitti S, Henry Eusebi L, Bazzoli F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: A clinical practice update. *Eur J Clin Invest* 2018;48:e12857.
11. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:441-52.
12. Ailloud F, Didelot X, Woltemate S, Pfaffinger G, Overmann J, Bader RC, et al. Within-host evolution of *Helicobacter pylori* shaped by niche-specific adaptation, intragastric migrations and selective sweeps. *Nat Commun* 2019;10:2273.
13. Logan RP, Berg DE. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1996;348:1462-3.
14. Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:150-62.
15. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5137-42.
16. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd

M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003;299:1582-5.

17. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD,et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-47.
18. Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, Kuhn S, Drescher B, Droege M, Et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5033-8.
19. Reeves PR, Liu B, Zhou Z, Li D, Guo D, Ren Y, et al. Rates of mutation and host transmission for an Escherichia coli clone over 3 years. *PloS One* 2011;6:e26907.
20. Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, et al. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of Mycobacterium tuberculosis during latent infection. *Nat Genet* 2011;43:482-6.
21. Dorer MS, Sessler TH, Salama NR. Recombination and DNA repair in Helicobacter pylori. *Ann Rev Microbiol* 2011;65:329-48.
22. Ben Mansour K, Fendri C, Battikh H, Garnier M, Zribi M, Jlizi A, et al. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. *Infect Genet Evol* 2016;37:43-8.
23. Garcia M, Raymond J, Garnier M, Cremniter J, Burucoa C. Distribution of spontaneous gyrA mutations in 97 fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* isolates collected in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:550-1.
24. Kao CY, Lee AY, Huang AH, Song PY, Yang YJ, Sheu SM, et al. Heteroresistance of Helicobacter pylori from the same patient prior to antibiotic treatment. *Infect Genet Evol* 2014;23:196-202.
25. Alexander HE, Leidy G. Mode of action of streptomycin on type b h. influenzae: i. origin of resistant organisms. *J Exp Med* 1947;85:329-38.
26. Sutherland R, Rolinson GN. Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. *J Bacteriol* 1964;87:887-99.
27. Eilertson B, Maruri F, Blackman A, Herrera M, Samuels DC, Sterling TR. High proportion of heteroresistance in gyrA and gyrB in fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3270-5.
28. Raymond J, Lamarque D, Kalach N, Chaussade S, Burucoa C. High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter* 2010;15:21-7.
29. Sambrook J,Russell DW. Molecular cloning: A Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2001;1:6.31-2.
30. Institute, C.a.L.S., CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth edition. *CLSI Documents* M02-A12. 2015. p. 29-50.
31. Saniee P, Hosseini F, Kadkhodaei S, Siavoshi F, Khalili-Samani S. Helicobacter pylori Multidrug Resistance Due to Misuse of Antibiotics in Iran. *Arch Iran Med* 2018;21:283-8.
32. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:5791-5.
33. Atherton JC, Cao P, Peek Jr RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-7.
34. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:191-207.
35. Matteo MJ, Granados G, Olmos M, Wonaga A, Catalano M. *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:474-7.
36. Seo JW, Park JY, Shin TS, Kim JG. The analysis of virulence factors and antibiotic resistance between *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric antrum and body. *BMC Gastroenterol* 2019;19:140.
37. Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter* 2003;8:202-6.
38. de la Obra P, Alarcon T, Domingo D, Garcia J, Lopez-brea M. Heteroresistance to metronidazole and genetic relationship of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Gut* 2001;49:A4-A4.
39. Van der Ende A, van Doorn LJ, Rooijakkers S, Feller M, Tytgat GN, Dankert J. Clarithromycin-Susceptible and-Resistant *Helicobacter pylori* Isolates with Identical Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR Genotypes Cultured from Single Gastric Biopsy Specimens Prior to Antibiotic Therapy. *J Clin Microbiol* 2001;39:2648-51.
40. De Lencastre H, Figueiredo AM, Tomasz A. Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistantStaphylococcus aureus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:13-8.
41. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, et al. Characteristics of meropenem heteroresistance in Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of K. pneumoniae. *J Clin Microbiol* 2010;48:2601-4.
42. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, et al. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 2000;181:273-82.
43. Norazah A, Rasinah WZ, Zaili Z, Aminuddin A, Ramelah M. Analysis of PCR-RAPD DNA and antibiotic susceptibility profiles of antrum and corpus isolates of *Helicobacter pylori* from Malaysian patients. *Malays J Pathol* 2009;31:29-34.
44. Hua J, Ng HC, Yeoh KG, Ho B. Predominance of a single strain of *Helicobacter pylori* in gastric antrum. *Helicobacter* 1999;4:28-32.

45. Sheu SM, Sheu BS, Lu CC, Yang HB, Wu JJ. Mixed infections of *Helicobacter pylori*: tissue tropism and histological significance. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:253-9.

46. Fusco DN, Alexander EL, Weisenberg SA, Mediavilla JR, Kreiswirth BN, Schuetz AN, et al. Clinical failure of vancomycin in a dialysis patient with methicillin-susceptible vancomycin-heteroresistant S. aureus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:180-3.

47. van Hal SJ, Jones M, Gosbell IB, Paterson DL. Vancomycin heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus blood stream infections. *PloS One* 2011;6:e21217.

48. Lin SY, Chen TC, Chen FJ, Chen YH, Lin YI, Siu LK, et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus* aureus bacteremia in a Taiwan Medical Center. *J Microbiol Immunol Infect* 2012;45:435-41.

49. Hernan RC, Bombicino K, Granados G, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. Selection of colistin-resistant Acinetobacter baumannii isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:188-91.

50. Lai CH, Huang JC, Chiang-Ni C, Li JP, Wu LT, Wu HS, et al. Mixed infections of *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastrointestinal diseases in Taiwan. *Gastroenterol Res Pract* 2016;2016:7521913.

51. Bugaytsova JA, Björnham O, Chernov YA, Gideonsson P, Henriksson S, Mendez M, et al. Helicobacter pylori adapts to chronic infection and gastric disease via pH-responsive BabA-mediated adherence. *Cell Host Microbe* 2017;21:376-89.

52. Lee YC, Lee SY, Pyo JH, Kwon DH, Rhee JC, Kim JJ. Isogenic variation of *Helicobacter pylori* strain resulting in heteroresistant antibacterial phenotypes in a single host in vivo. *Helicobacter* 2005;10:240-8.

53. Wang X, Kang Y, Luo C, Zhao T, Liu L, Jiang X, et al. Heteroresistance at the single-cell level: adapting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination. *mBio* 2014;5: e00942-13.

54. Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Tytgat GN, van der Ende A, Dankert J. Heterogeneity in susceptibility to metronidazole among *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis or peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 1996;34:2158-62.