

## Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana

Cristian Vallejos M<sup>1,a</sup>, Leonardo Garrido O<sup>1,b</sup>, Dante Cáceres L<sup>3</sup>, Ana María Madrid<sup>2</sup>, Claudia Defilippi<sup>2</sup>, Carlos Defilippi C<sup>2</sup>, Héctor Toledo A<sup>1</sup>.

*Prevalence of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance in Helicobacter pylori isolated from Chilean patients*

**Background:** *Helicobacter pylori* is a pathogenic bacterium that infects a significant number of individuals. At present, therapeutic strategies to eradicate this bacterium depend on our knowledge of its resistance to antimicrobials. **Aims:** To evaluate the primary resistance of *H pylori* to metronidazole (Mtz), clarithromycin (Cla), and tetracycline (Tet) in symptomatic out-patients. **Material and Methods:** Fifty independent isolates of *H pylori* were obtained by endoscopy-assisted gastric biopsy from patients attending the University of Chile Clinical Hospital, that previously had not been treated with an eradication regime against this bacterium. The minimal inhibitory concentration of each antimicrobial was determined by agar dilution method. **Results:** Forty five and 27% of the isolates were found to be resistant to Mtz and Tet, respectively; the majority of these resistant isolates were from patients older than 21 years. Twenty percent of isolates were resistant to Cla; these were distributed evenly among different ages. Thirty two percent of the isolates were resistant to two or more of the antimicrobials. **Conclusions:** The high frequency of naturally occurring, antimicrobial-resistant strains of *H pylori* poses a national and world-wide problem for public health (Rev Méd Chile 2007; 135: 287-93).

**(Key words:** Clarithromycin; Drug resistance, microbial; *Helicobacter pylori*; Metronidazole; Tetracycline)

Recibido el 5 de junio, 2006. Aceptado el 28 de agosto, 2006.

Trabajo financiado por el Proyecto AMAYOR 02/4-2 del D.I., Universidad de Chile.

<sup>1</sup>Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Unidad de Gastroenterología, Hospital Clínico Universidad de Chile. <sup>3</sup>División de Epidemiología, Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

<sup>a</sup>Tesista de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

<sup>b</sup>Tesista de la carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

*Correspondencia a:* Dr. Héctor Toledo A. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70086, Santiago-7, Chile. Teléfono: (562) 9786053. Fax: (562) 7355580. E mail: htoledo@med.uchile.cl.

*Helicobacter pylori* es uno de los acompañantes más antiguos y cercanos a la historia evolutiva del hombre<sup>1</sup>. La colonización del estómago por *H pylori* se asocia a un mayor riesgo de desarrollar úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma del estómago<sup>2,3</sup>. La prevalencia de la infección varía entre 80% y 90% en los países en desarrollo y menos de 40% en los desarrollados<sup>4</sup>. En Chile, la prevalencia de infección oscila entre 60% y 79%, dependiendo de la condición socioeconómica, de la educación y a las condiciones sanitarias de la población estudiada<sup>5-7</sup>.

Las diferentes terapias antibióticas, frecuentemente, erradican la bacteria y su resultado en la recidiva de la úlcera péptica es notorio<sup>8,9</sup>. Para alcanzar el éxito en la erradicación de la bacteria ha sido necesario combinar al menos dos antibióticos y una droga que disminuya la secreción gástrica, ya sea un inhibidor de la bomba de protones o un antagonista de los receptores H2. El metronidazol (Mtz) es uno de los antibióticos utilizados en el tratamiento de la erradicación de *H pylori*<sup>10</sup>. Tasas altas de resistencia a Mtz se han observado en aislados clínicos a nivel mundial, 90% en India, 50% o más en Estados Unidos y Europa Occidental y 40,6% en Corea<sup>10-12</sup>, la cual puede variar en grupos de pacientes de acuerdo a la edad, sexo, enfermedades y lugares de residencia, lo que afecta negativamente en la eficiencia del tratamiento<sup>10,13,14</sup>. En Chile, específicamente en la VIII región, la resistencia a Mtz alcanza 41,8%<sup>15</sup>.

Este antibiótico se convierte en una forma activa, mediante la reducción de un grupo nitro, lo que genera una hidroxilamina altamente mutagénica<sup>16,17</sup>. El principal mecanismo de la resistencia a Mtz en *H pylori* se relaciona a la presencia de mutaciones nulas en el gen *rdxA*, que codifica una nitroreductasa NADPH insensible a oxígeno<sup>17</sup>.

Otro antibiótico ampliamente utilizado es la claritromicina (Cla). La resistencia a este antibiótico se debe a la aparición de diversas mutaciones puntuales en el dominio V del gen del ARN ribosomal de 23S que afectan la actividad peptidil transferasa<sup>10,18,19</sup>. La creciente tasa de resistencia a Cla observada en diversas regiones, 5,9% en Corea, 7% en Brasil, 42,9% en los niños y 11,1% en los adultos de Tokio<sup>10,12,14,20,21</sup>, es una alerta para estudiar la realidad nacional.

Un tercer antibiótico utilizado en el tratamiento de la erradicación de *H pylori* es tetraciclina

(Tet), cuya resistencia adquirida por la bacteria es un fenómeno de importancia<sup>15,20,22</sup>. La resistencia a Tet se debe a mutaciones por sustitución (AGA 926-928 TTC) en el gen que codifica el ARN ribosomal de 16S, lo que impide la unión del antibiótico al ribosoma<sup>23</sup> y con ello el efecto farmacológico de la droga.

El propósito de este estudio fue evaluar la prevalencia de la resistencia primaria a Mtz, Cla y Tet en aislados clínicos de *Helicobacter pylori* obtenidos de un grupo de pacientes con patologías gastroduodenales de la Región Metropolitana, durante octubre de 2002 y mayo de 2005.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

*Selección de los pacientes.* El marco muestral correspondió a pacientes que concurren a la Unidad de Gastroenterología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, para someterse a endoscopia digestiva alta por síntomas digestivos y cuyos resultados principales fueron gastritis erosiva, hiperplasia nodular linfoide, esofagitis por reflujo, hernia hiatal, úlcera gástrica y duodenitis, entre otras condiciones. Los pacientes aceptaron participar voluntariamente una vez que conocieron los objetivos y firmaron el consentimiento informado, aprobado previamente por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El grupo en estudio estuvo constituido por 36 personas de sexo femenino y 20 de sexo masculino, entre 11 y 81 años de edad con un promedio de 40,5 años, sin tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses antes de participar en el estudio. A cada uno se les tomó tres biopsias, dos en antro a 2 cm del píloro y una en el tercio superior del cuerpo, en la curvatura mayor. Una de las muestras antrales fue sometida al ensayo de la ureasa en la sala de endoscopia.

*Tamaño de la muestra estudiada.* La prevalencia de resistencia a Mtz desarrollada por *H pylori* es de aproximadamente 40% en Chile<sup>5</sup>, por lo que la inferencia estadística sugiere que un tamaño de muestra de 50 pacientes es suficiente para observar diferencias estadísticamente significativas<sup>24</sup>.

*Protocolo de aislamiento y crecimiento de H pylori.* Las muestras fueron transportadas al laborato-

rio, sin indicación del resultado del ensayo de la ureasa, en caldo soya triptona suplementado con 20% de glicerol. Las biopsias fueron maceradas y la suspensión resultante se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Los homogenizados de las biopsias fueron sembrados sobre placas de agar-soya triptona (TSA), tal como se describe en la literatura<sup>25,26</sup>. Después de tres a cinco días de incubación, cuando fue posible, se aisló diez colonias de *H pylori*, las que se diseminaron sembrándolas en placas TSA.

**Determinación de la resistencia primaria a Mtz, Cla y Tet.** La resistencia primaria se definió como la resistencia observada en los aislados clínicos de *H pylori* obtenidos de pacientes que no habían sido sometidos previamente a terapia de erradicación de la bacteria. En los aislados, se estudió la resistencia a Mtz y Cla (Laboratorios Chile S.A.). La sensibilidad de los aislados a los antibióticos se determinó mediante el método de la dilución antibiótica, utilizando una serie de diluciones de los antibióticos entre 0 y 64 µg/ml<sup>27</sup> (Tabla 1). Las bacterias colectadas desde un cultivo fresco fueron resuspendidas en solución amortiguadora fosfato-salino y alícuotas de 10 µl de una dilución seriada (100 a 10<sup>-8</sup>) fueron sembradas en placas TSA. Para el estudio de la resistencia a Tet (Sigma), se utilizaron diluciones de 0 a 2 µg/ml<sup>20</sup>. El punto de corte para definir

la resistencia al antibiótico se fijó en 8 µg/ml para Mtz, 1 µg/ml para Cla y en 2 µg/ml para Tet<sup>12,17,20</sup>.

**Análisis estadístico.** Los datos se presentan en tablas con estadísticas descriptivas de posición y de frecuencia estratificada por grupo de edad. Estos resultados representan el valor promedio y el de frecuencia de tres experimentos independientes y cuyos resultados fueron analizados mediante el ensayo estadístico t de Student. Para el análisis de riesgo, se calcularon las razones de prevalencia (RP), tomando como referencia a los pacientes del grupo de 61 años y más. Para evaluar la precisión se calcularon los intervalos de confianza de 95%. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Stata 8.0.

RESULTADOS

Los resultados de susceptibilidad a Mtz mostraron que existe un amplio rango de sensibilidad al antibiótico, el que se determinó entre 0,5 y 64 µg/ml. De acuerdo al punto de corte fijado, la tasa de prevalencia de la resistencia al antibiótico fue de 44,9%. Por otra parte, la resistencia a Cla alcanzó 20,0%, observándose también un amplio rango de sensibilidad (0,5 a 64 µg/ml). Para Tet, la tasa de prevalencia de la resistencia fue de 26,8% (Tabla 1).

**Tabla 1. Tasa de resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori***

Edad	Metronidazol		Claritromicina		Tetraciclina	
	S	R	S	R	S	R
11-20	8	2	8	1	6	2
21-30	5	9	13	2	9	4
31-40	1	2	4	-	2	1
41-50	3	4	6	1	5	1
51-60	4	3	5	2	3	1
61-70	3	2	2	3	3	1
71-80	2	-	1	1	2	-
81-90	1	-	1	-	-	1
Total	27	22	40	10	30	11
(%)	(55,1)	(44,9)	(80,0)	(20,0)	(73,2)	(26,8)

En la tabla se indica el número de cepas aisladas que presentaron el fenotipo sensible o resistente para cada antibiótico y en la columna total se señala en paréntesis el porcentaje que representa en dicha población el respectivo fenotipo. S: sensible; R: resistente.

El análisis del riesgo de presentar resistencia primaria a los antibióticos estudiados por estrato de edad (Tabla 2), muestra que la población menor de 20 años presenta una resistencia primaria adquirida a Mtz significativamente menor que los individuos mayores de 61 años. Por su parte, el riesgo de presentar resistencia primaria a Tet es menor en la población joven, comparada con los individuos entre 21 y 40 años, en tanto, el riesgo de presentar resistencia a Cla es menor que en el grupo control, mayores de 60 años, en todos los rangos de edad y, no presentó un patrón definido de resistencia.

Con el propósito de evaluar la resistencia múltiple adquirida, se analizó la triple resistencia (Mtz-Cla-Tet) y la resistencia doble a Mtz-Cla, Mtz-Tet y Cla-Tet en un grupo de 38 muestras que aleatoriamente se utilizaron para este objetivo. Entre ellas se observó que 2 muestras presentaron resistencia a Mtz-Cla-Tet; 5 a Mtz-Cla; 5 a Mtz-Tet, estas últimas no incluyen las dos muestras que presentaron la triple resistencia. Por su parte, la resistencia a Cla-Tet sólo se observó en las dos muestras que presentaron la resistencia triple.

DISCUSIÓN

Las evidencias indican que la resistencia a antibióticos en *H pylori* son esencialmente debidas a mutaciones cromosomales<sup>10,17-19,23</sup>. Una consecuencia importante de este hecho es que la transmisión de la resistencia ocurre fundamentalmente desde un microorganismo a otro en forma vertical, en que las mutaciones aparecen en la descendencia y, por lo tanto, se observa un progresivo incremento en la resistencia debido a la

presión impuesta por el uso de los antibióticos. La resistencia a Mtz en los aislados clínicos chilenos, como en otras regiones del mundo, se debe a mutaciones que inactivan el gen *rdxA*<sup>29</sup>. Sin embargo, esta resistencia no sólo es un reflejo de las mutaciones acumuladas en el gen *rdxA*, sino que también se puede deber a mutaciones presentes en otras nitrorreductasas, como FrxA<sup>30,31</sup>.

La resistencia a Mtz observada en este estudio alcanzó 44,9% (Tabla 1), cifra que concuerda con lo observado en la VIII región del país (41,8%)<sup>15</sup>. Es interesante observar que entre los pacientes menores de 20 años, la tasa de resistencia a Mtz es menor que en los mayores de 21 años (Tabla 1). Esta observación se corrobora al analizar el riesgo de presentar la resistencia al antibiótico (Tabla 2)<sup>32</sup>. El estrato de 11 a 20 años no presenta un riesgo significativo de resistencia a Mtz comparado con el estrato de individuos mayores de 60 años. En cambio, los estratos de 21 a 40 y 41 a 60 años, mostraron un riesgo de resistencia a Mtz que es 5,5 y 3,0 veces mayor que el observado en el grupo control (mayores de 60 años). Esto puede deberse a que el uso de este antibiótico es menos frecuente en la población joven. En los pacientes mayores de 21 años, la alta tasa de resistencia al antibiótico podría deberse al mayor uso de nitroimidazoles usados en el tratamiento de enfermedades odontológicas, ginecológicas y gastrointestinales, entre otras, y no aumentaría en edades mayores. La resistencia observada en la población más joven podría deberse, además, a la transmisión intrafamiliar de las bacterias resistentes seleccionadas por el historial farmacológico de la población adulta que seleccionaría cepas mutantes.

Es importante consignar que los datos de riesgo presentados en este estudio son prelimina-

**Tabla 2. Riesgo de presentar resistencia a los antibióticos Mtz, Cla y Tet estratificado según rango de edad**

Edad Años	Metronidazol			Claritromicina				Tetraciclina			
	R	S	OR (IC 95%)	R	S	OR (IC 95%)	R	S	OR (IC 95%)		
11-20	2	8	0,8 (0,05-10,9)	1	8	0,13 (0,08-2,08)	2	6	1,7 (0,07-64,4)		
21-40	11	6	5,5 (0,6-57,6)	2	17	0,12 (0,01-0,19)	5	11	2,3 (0,16-66,13)		
41-60	7	7	3,0 (0,3-31,3)	3	11	0,27 (0,03-2,48)	2	8	1,3 (0,06-46,3)		
> 60	2	6	1,0	4	4	1,0	1	5	1,0		

Resistente =R; Sensible =S; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confianza.

res y deben ser confirmados con una muestra de mayor tamaño, que permita aumentar el poder estadístico de tales diferencias de riesgo<sup>32</sup>.

La resistencia a Cla observada en el grupo en estudio corresponde a una tasa de 20,0% (Tabla 1), valor bastante mayor al 2,0% encontrado previamente en la VIII región<sup>15</sup>. Si bien los datos de la literatura muestran que la resistencia a Cla puede alcanzar hasta 50,0%<sup>20,32,33</sup>, no está del todo clara la causa de esta variación entre las diferentes poblaciones y regiones, pudiendo en nuestro medio encontrarse explicación en el efecto mutagénico de Mtz<sup>34</sup>, al ser éste un medicamento de amplio uso. Otro factor de riesgo para la resistencia a Cla es el consumo previo de macrólidos, derivado de un aumento en la prescripción de estas drogas. Sin embargo, el estudio de riesgo para Cla no presentó un patrón definido de resistencia (Tabla 2). La alta resistencia observada a Cla es un dato de gran importancia, ya que en la toma de decisión, para definir un tratamiento que incluya la Cla en las regiones en que la resistencia es alta, se sugiere que este antibiótico sea reemplazado por Mtz, ya que se estima que la resistencia a Mtz tendría una relevancia clínica limitada<sup>35</sup>.

Se ha informado que, en algunos países, la resistencia a Tet es muy baja, 0,7% en España, 0,5% en el Reino Unido y 0,5% en Hong Kong, aunque también se ha observado una elevada tasa en Corea, 5,3%<sup>12,20,33</sup>. Nuestros datos muestran que la resistencia primaria adquirida a Tet alcanzó 26,8% en el grupo en estudio (Tabla 1). La resistencia a Tet, al igual que con otros antibióticos, aumenta con el uso de la droga debido a una presión selectiva, aunque también puede encontrarse explicación en el efecto mutagénico derivado de otros agentes terapéuticos. Es interesante observar que Tet también mostró un patrón similar de resistencia en la medida que los

individuos incrementan su edad. Al igual que en el caso de Mtz, el estrato joven mostró menor riesgo de presentar resistencia respecto de los individuos comprendidos entre los 21 y 40 años. Sin embargo, estos individuos (21 y 40 años) mostraron 2,3 veces mayor resistencia que los mayores de 60 años.

El tratamiento de erradicación puede fallar por varias razones. De hecho, la principal razón del fracaso se encuentra en la resistencia desarrollada a los antibióticos utilizados y, más aún, a la resistencia múltiple. En este estudio, al comparar la resistencia primaria adquirida en los aislados locales para cada antibiótico estudiado, detectamos que la resistencia múltiple se presentó en 12 de 38 aislados analizados para este propósito (31,6%). Entre ellos, se observó resistencia triple en 2 aislados (5,3%).

Como Mtz y Cla son los antibióticos más frecuentemente utilizados en las terapias de erradicación, fue interesante ver si ambos presentaban resistencia doble. Ésta estuvo presente en 5 muestras (13,2%), las que no incluyen las muestras de la resistencia triple. Por otra parte, la resistencia primaria entre Mtz-Tet estuvo presente en 5 muestras (13,2%) que no incluyen las dos muestras que presentaron la resistencia triple, mientras que la resistencia a Cla-Tet sólo se presentó en las dos muestras (5,3%) que presentaron la resistencia triple.

En conclusión, existe un gran consenso respecto de cuándo instaurar una terapia de erradicación frente a la infección por *H pylori*. Sin embargo, aun cuando hay esquemas terapéuticos bien establecidos, la alta resistencia observada en este estudio a Mtz (44,89%), Cla (20%), Tet (26,8%) y el desarrollo de la resistencia múltiple (31,58%), deben estar presentes en la toma de decisión al momento de plantear los esquemas de tratamiento primario.

#### REFERENCIAS

1. AHMED N, SECHI LA. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathology: New threats of the old friend. *Annals Clinical Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 1-10.
2. WARREN JR, MARSHALL B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1273-5.
3. UEMURA N, OKAMOTO S, YAMAMOTO S, MATSUMURA M, YAMAGUCHI S, YAMAKIDO N ET AL. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-9.

4. PÉREZ-PÉREZ G, ROTHENBACHER D, BRENNER H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9 (Suppl. 1): 1-6.
5. MARTÍNEZ A, KAWAGUCHI F, MADARIAGA J, GONZÁLEZ C, GARCÍA A, SÁNCHEZ M ET AL. Estudio de infección por *H pylori* en 200 pacientes de la octava región. *Gastroenterol Latinoam* 1999; 10: 316.
6. FERNÁNDEZ H, IBARRA H, LEÓN J, TOLEDO C. Aislamiento de *Campylobacter pylori* en biopsias gástricas en habitantes del sur de Chile. *Rev Méd Chile* 1989; 117: 1180-1.
7. CALVO A, GABRIELLI L, PRUYAS M, VILLARROEL L, SOSA A, ROLLÁN A ET AL. Frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastrointestinal benigna. *Gastroenterol Latinoam* 2005; 16: 336.
8. FORBES G, GLASER M, CULLEN DJ, WARREN JR, CHRISTIANSEN KJ, MARSHALL BJ ET AL. Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven-year follow-up. *Lancet* 1994; 343: 258-60.
9. HUANG G, SHEU B, TSAO C, LIN X, SUI J. Eradication of *H pylori* results in regression of B-cell low grade gastric MALToma with evident B-symptoms. *Hepato-gastroenterology* 1998; 45: 2464-7.
10. VALLEJOS C, CERDA O, VALENZUELA M, TOLEDO H. Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: Aspectos clínicos y moleculares. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1313-20.
11. HUANG AH, SHEU BS, YANG HB, HUANG CC, WU JJ, LIN XZ. Impact of *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance on the outcome of 1-week lansoprazol-based triple therapy. *J Formos Med Assoc* 2000; 99: 704-9.
12. KIM JJ, REDDY R, LEE M, KIM JM, OSATO MS, GRAHAM DY ET AL. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolate from Korea. *J Antimicrob Chemoter* 2001; 47: 459-61.
13. MEYER JM, SILLIMAN NP, WANG W, SIEPMAN NY, SUGG JE, MORRIS D ET AL. Risk factors for *Helicobacter* resistance in the United States: the surveillance of *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med* 2002; 136: 13-24.
14. QUEIROZ D, BARBOSA D, RODRA E, MENDES A, OLIVEIRA P, MAGALHAES T ET AL. Evaluation of factors associated to *Helicobacter pylori* resistance to drugs. *Gut* 1999; 45: A113 (14/29).
15. GONZÁLEZ C, GARCÍA A, DAROCH F, KAWAGUCHI F, SOLAR H, RIVERA N ET AL. Susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Helicobacter pylori*: aislamiento de cepas resistentes a claritromicina. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 643-6.
16. EDWARDS DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemoter* 1997; 31: 9-20.
17. GOODWIN A, KERSULYTE P, SISSON G, DEVELDHUYZEN VAN ZANTEN, BERG D, HOFFMAN P. Metronidazole resistant in *Helicobacter pylori* is due to null mutation in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998; 28: 383-93.
18. VERSALOVIC J, SHORTRIDGE D, KIBLER K, GRIFFY MV, BEYER J, FLAMM RK ET AL. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1996; 40: 477-80.
19. VANDOORN LJ, DEBETS-OSENKOPP YJ, MARAIS A, SANNA R, MÉGRAUD F ET AL. Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemoter* 1999; 43: 1779-82.
20. MENDONCA S, ECCLISSATO C, SARTORI MS, ORTIZ AP, DEGGER M, PEDRAZZOLI J ET AL. Prevalence of *H pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 2000; 5: 79-83.
21. IKUE T, SATOSHI G, YUKIKO T, NORIKO W-S, NORIKO M, AZUSA Y ET AL. Emergence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* (CRHP) with a high prevalence in children compared with their parents. *Helicobacter* 2002; 7: 297-305.
22. WU H, SHI XD, WANG HT, LIU JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. *J Antimicrob Chemoter* 2000; 46: 121-3.
23. GERRITS MM, BERNING M, VAN VLIET AHM, KUIPERS EJ, KUSTER JG. Effects of 16S rRNA gene mutations on tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agent Chemoter* 2003; 47: 2984-6.
24. FLEISS JL. *Statistical methods for rates and proportions*, New York, Wiley, 2<sup>nd</sup> Edition, 1981; 320.
25. TOLEDO H, VALENZUELA M, RIVAS A, JEREZ C. Acid stress response in *Helicobacter pylori*. *Fems Microbiol Letters* 2002; 213: 67-72.
26. CERDA O, RIVAS A, TOLEDO H. *Helicobacter pylori* strain ATCC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate. *FEMS Microbiol Letters* 2003; 224: 175-81.

27. JEONG J-Y, MUKHOPADHYAY AK, DAILIDIENE D, WANG Y, VELAPATINO B, GILMAN RH ET AL. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2000; 182: 5082-90.
28. VERSALOVIC J, OSATO M, SPAKOVSKY K, DORE MP, REDDY R, STONE GC ET AL. Point mutations in the 23S *rRNA* gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 283-6.
29. TOLEDO H, VALLEJOS C, CERDA O, VALENZUELA M, DEFILIPPI C, MADRID A ET AL. La resistencia a Metronidazol en cepas chilenas de *Helicobacter pylori* se debe a mutaciones en el gen *rdxA*. *Gastroenterol Latinoam* 2003; 14: 423.
30. KWON D, FOUAD A, EL-ZAATARI, KATO M, OSATO M, REDDY R ET AL. Analysis of *rdxA* and involvement of additional gene encoding NADPH flavin oxidoreductase (*frxA*) and ferredoxin-like protein (*fdxB*) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agent Chemotherapy* 2000; 44: 2133-42.
31. KWON D, FOUAD A, EL-ZAATARI, KATO M, OSATO M, REDDY R ET AL. Frame-shift mutation in NADPH flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *Fems Microbiol Lett* 2000; 188: 197-202.
32. RABBEE N, COULL BA, MEHTA CR, PATEL N, SENCHAUDHURI P. Power and sample size for ordered categorical data. *Stat Methods Med Res* 2003; 12(1): 73-84.
33. MEGRAUD F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
34. SISSON G, JEONG J, GOODWIN A, BRYDEN L, ROSSLER N, MORRISON S ET AL. Metronidazole activation is mutagenic and *Escherichia coli* contains a cloned *H pylori rdxA*<sup>+</sup> (nitroreductase) Gene. *J Bacteriology* 2000; 182: 5091-6.
35. MEGRAUD F. Update on therapeutic options for *Helicobacter pylori*-related diseases. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7: 115-20.

#### *Agradecimientos*

Al Dr. Remigio López por sus valiosos comentarios durante la preparación de este manuscrito. Del mismo modo, agradecemos a Laboratorios Chile S.A. por facilitarnos el metronidazol y la claritromicina.