

Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia

Primary resistance to Metronidazole in *Helicobacter pylori* isolates in adult patients in Bogotá, Colombia

Sandra C. Henao R., MD,¹ William Otero R., MD,² Luis Alberto Ángel A., MD,³
Julián David Martínez M., MD.⁴

RESUMEN

Objetivo. Determinación de la susceptibilidad a metronidazol en aislamientos de *Helicobacter pylori* obtenidos de pacientes colombianos durante el periodo de abril de 2006 a marzo de 2007.

Materiales y métodos. Se les realizó la prueba de susceptibilidad a metronidazol por el método de E test a 53 aislamientos de *H. pylori* obtenidos por cultivo de biopsias gástricas procedentes de pacientes adultos a quienes se les practicó una endoscopia de vías digestivas altas.

Resultados. Se obtuvieron 53 aislamientos de *H. pylori* provenientes de 26 hombres y 27 mujeres. El método de susceptibilidad antimicrobiana E test demostró que el 72% de los aislamientos de *H. pylori* fueron resistentes a metronidazol.

Conclusiones. La resistencia de *H. pylori* a MTZ en la actualidad continúa siendo alta y es comparable a la publicada hace 10 años (72% y 84% respectivamente). Por ser mayor del 40% sería recomendable no utilizar este antimicrobiano en los esquemas de erradicación en Colombia.

Palabras clave

Metronidazol, resistencia antimicrobiana, *Helicobacter pylori*.

SUMMARY

Objective. To determine susceptibility to Metronidazole when isolates *Helicobacter pylori* obtained from Colombian patients during the period April 2006 to March 2007.

Materials and methods. The susceptibility test to Metronidazole was realized using the E Test Method to 53 isolates of *H. pylori* obtained through cultures of gastric biopsies, coming from adult patients to whom endoscopies of upper gastrointestinal tracts were practiced.

Results. Fifty-three isolates of *H. pylori* were obtained from 26 men and 27 women. The antimicrobial susceptibility E Test method showed that 72% of the isolates of *H. pylori* were resistant to Metronidazole.

Conclusion. Resistance of *H. pylori* to MTZ currently continues being high and is comparable to the one published 10 years ago (73% and 84% respectively). For being greater than 40%, it is recommended not to use this antimicrobial agent in the Colombian eradication programs.

Key Words

Metronidazole, antimicrobial resistance, *Helicobacter pylori*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es el principal agente etiológico de gastritis crónica, úlceras pépticas y

cáncer gástrico no cardial (1-5). Así mismo, está etiológicamente relacionado con linfomas MALT (6), púrpura trombocitopénica inmune (7) y anemia ferropénica (8). La erradicación de la infección

¹ Profesora Asistente de Medicina, departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

² Profesor Asociado de Medicina, unidad de Gastroenterología, Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo Clínica Fundadores, Fundación Hospital San Carlos, Clínica Carlos Lleras Restrepo. Bogotá, Colombia.

³ Profesor Titular de Medicina, Unidad de gastroenterología, Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo IDIME. Bogotá, Colombia.

⁴ Profesor Asociado de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Gastroenterólogo Centro Médico Endocentro Ltda. Bogotá, Colombia.

Fecha recibido: 27-11-08/ Fecha aceptado: 29-01-09

disminuye notablemente el riesgo de recurrencia de las úlceras pépticas (9-11) y por ello, el tratamiento estándar de estas, se realiza con antibióticos dirigidos a eliminar este microorganismo. Sin embargo, después de más de dos décadas de investigar tratamientos para erradicar *H. pylori*, todavía no se dispone de un esquema ideal (12, 13). La resistencia a los antibióticos utilizados en la terapia de erradicación del *H. pylori* es el principal factor que afecta el éxito del tratamiento (12-15).

El metronidazol (MTZ) y la claritromicina son los antibióticos más frecuentemente utilizados en los esquemas de primera línea (12, 13), pero la resistencia primaria a estos está aumentando a nivel mundial (14, 15). La triple terapia aún recomendada consiste en un medicamento inhibidor de bomba de protones (IBP) combinado con amoxicilina y con claritromicina o metronidazol (12, 13). Sin embargo, por las altas tasas de resistencia, la eficacia de esta triple terapia estándar ha decaído notablemente, siendo de 57-73% con esquemas de siete días y de 67 a 79% con esquemas de 10 días (16). En Colombia, hace más de diez años, se documentó que la resistencia del *H. pylori* al MTZ era del 84% (17) y por ello algunos investigadores optaron por reemplazar este antibiótico por la furazolidona con tasas de éxito superiores al 80% (18, 19). En diferentes lugares del mundo, la prevalencia de la resistencia a MTZ varía entre el 5% y el 80% (20). Cuando hay resistencia a los nitroimidazoles, la eficacia del tratamiento disminuye en 25% (13, 21), aunque con resistencias menores al 40%, al parecer, no se afecta (22). Los principales mecanismos de resistencia al MTZ resultan de la generación de diferentes tipos de mutaciones en el gen *rdxA* el cual codifica una nitroreductasa que es necesaria para activación reductiva de un grupo nitro del metronidazol que lo convierte en su forma activa, la hidroxilamina, la cual oxida el ADN bacteriano y por lo tanto la muerte celular (22). Decidimos realizar el presente estudio con el fin de determinar cuál es la magnitud de la resistencia al MTZ en la actualidad, ya que existe gran preocupación a nivel mundial por el creciente aumento de la resistencia de *H. pylori*, tanto a MTZ, como a la claritromicina (12, 13); en nuestro país, recientemente

se ha documentado una resistencia al metronidazol del 97,6% por Yepes y cols (23), lo cual implicaría que este antibiótico no debería ser utilizado en esquemas de primera línea (13).

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes. Se incluyeron pacientes mayores de 18 años a quienes el médico de cuidado primario o los gastroenterólogos, les solicitaron endoscopias digestivas como parte del estudio de molestias digestivas altas (dispepsia no investigada, reflujo gastroesofágico). Los pacientes fueron seleccionados entre abril del 2006 a marzo del 2007. Los procedimientos fueron realizados en las unidades de endoscopia digestiva de Clínica Fundadores, Centro Médico Endocentro Ltda e Idime y firmaron el consentimiento después de leerlo y habérseles explicado y resuelto las dudas que tenían al respecto. Se excluyeron los pacientes que tuvieran cualesquiera de los siguientes criterios: haber recibido previamente tratamiento de erradicación de *H. pylori*, haber recibido tratamientos con inhibidores de la secreción de ácido (IBP o antagonistas del receptor H₂ de la histamina) o antibióticos en los doce meses previos a la inclusión del presente estudio, inmunosuprimidos (VIH/Sida, quimioterapia), cáncer, anticoagulados o que no aceptaron participar en el estudio. A los pacientes se les tomaron biopsias para histología (dos muestras del antro y dos muestras del cuerpo), una muestra del antro para prueba de ureasa rápida. Dos muestras adicionales fueron enviadas para cultivo bacteriano, tomadas del antro a una distancia de dos centímetros del píloro, una de la curvatura mayor y la otra de la curvatura menor.

Cultivo bacteriano. Las biopsias de pacientes con prueba de ureasa rápida fueron enviadas al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Colombia. Las biopsias tomadas para cultivo fueron colocadas y transportadas en 0,5 ml de caldo Brucella. Para el aislamiento de *H. pylori* se utilizó un medio de cultivo selectivo, enriquecido con suero de caballo al 7%, isovitalax (Oxoid) y suplemento selectivo para *H. pylori* (Oxoid). Las biopsias fueron maceradas y sembradas en el medio de cultivo. Las

cajas se incubaron en condiciones microaerofílicas (O_2 5%, CO_2 10%, N_2 85%) durante 3 a 10 días a $37^\circ C$. El *H. pylori* fue identificado por la morfología de las colonias, tinción de Gram, la producción de ureasa, oxidasa y catalasa. Los aislamientos se almacenaron en crioviales con caldo Brucella conteniendo glicerol al 20% v/v a $-70^\circ C$ (24, 25).

Prueba de susceptibilidad. Para la determinación de la susceptibilidad de *H. pylori* a MTZ se utilizó la técnica de epsilómetro o E test (26). El protocolo para los aislamientos y posteriores subcultivos se hicieron de acuerdo a las técnicas recomendadas. Los aislamientos de *H. pylori* fueron subcultivados en medio no selectivo (sin antibióticos), luego de 3 a 4 días de incubación, se tomó el crecimiento y se preparó una suspensión en caldo Brucella ajustada a tubo N° 3 de la escala de McFarland (aprox 1×10^8 UFC/ml), esta suspensión se sembró en agar Muller Hinton (Oxoid) suplementado con 7% de suero de caballo e isovitalex. Luego se colocó la tira de E test con MTZ (E-Test; AB Biodisk, Solna, Sweden) y se incubó bajo condiciones de microaerofilia anteriormente descritas. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue interpretada como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibía el crecimiento bacteriano después de tres a cinco días de incubación. Los aislamientos de *H. pylori* fueron considerados como resistentes al MTZ con una MIC $> 8 \mu g/ml$ y sensibles con una MIC ≤ 8 . Como control se utilizó la cepa NCTC 11637 (National Collection of Type Cultures, London) (24, 25-28).

Análisis estadístico. Los datos se digitaron en Excel 2003 y los cálculos se hicieron en el paquete estadístico Stata 9.0. Las variables categóricas nominales u ordinales, se describieron en porcentajes y frecuencias. Las variables numéricas, se expresaron con medidas de tendencia central y medidas de dispersión (desviación estándar). Las pruebas estadísticas, se evaluaron con un grado de significancia del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 76 pacientes. Todos fueron positivos para *H. pylori* por la prueba de la ureasa

rápida e histología. Se obtuvieron 53 aislamientos de *H. pylori* de los 76 pacientes con un porcentaje de recuperación de la bacteria del 69,7%. Los aislamientos obtenidos se procesaron para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para MTZ por la técnica E test.

Los 53 aislamientos de *H. pylori* se obtuvieron de 26 hombres y 27 mujeres. Con un rango de edad entre 18 y 81 años y un promedio de edad de 43,7 años. El promedio de edad para los hombres fue de 41 años y para las mujeres de 47 años. La prevalencia de la resistencia primaria al MTZ fue del 72% (38 de 53 aislamientos). Se encontraron más aislamientos resistentes a MTZ en las mujeres (57,8%) comparado con los hombres (42,2%), $p < 0,05$ (tabla 1).

Tabla 1. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para MTZ en aislamientos de *H. pylori*.

Género	Aislamientos resistentes (%) n=38	Aislamientos sensibles (%) n=15	No. aislamientos
Hombres	16 (42,2%)	10 (66,7)	26
Mujeres	22 (57,8%)	5 (33,3)	27
Total	38 (72%)	15 (28%)	53

Los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) de los 53 aislamientos probados para MTZ se muestran en la figura 1. La mayoría de los aislamientos presentaron un MIC mayor a $256 \mu g/ml$ (62,26%). Se considera un aislado de *H. pylori* resistente cuando el MIC es $> 8 \mu g/ml$.

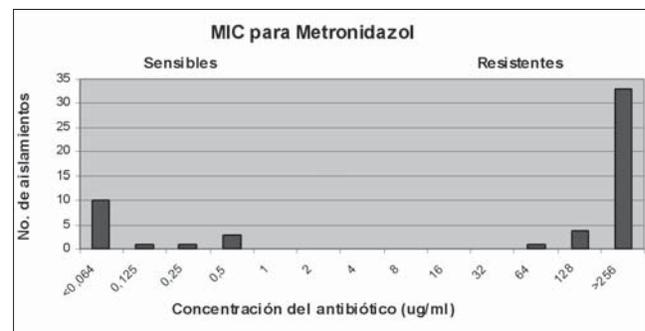


Figura 1. Distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) para MTZ en aislamientos de *H. pylori*.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra una prevalencia de resistencia a metronidazol del 72%, la cual está por encima del 40% informada en Europa y Estados Unidos (22) y similar a la encontrada en otros países en vías de desarrollo en los cuales oscila entre 50 y 80% (22), aunque en Egipto se ha encontrado que es del 100% (29). La prevalencia de resistencia encontrada en este trabajo es comparable al 84% encontrada en la década pasada (17); la diferencia eventualmente pudiera estar influida por la metodología de los estudios. Es importante destacar que más del 60% de los aislamientos presentaron un alto nivel de resistencia (MIC mayor a 256 ug/ml) y hubo más cepas resistentes en las mujeres que en los hombres, posiblemente debido al uso previo de este antimicrobiano en las mujeres como parte del tratamiento para infecciones ginecológicas. Si bien la resistencia de *H. pylori* a MTZ in vitro puede no reflejar con exactitud la susceptibilidad in vivo, el impacto de la resistencia ha sido demostrado con prevalencias mayores a 40% (13), por lo cual una recomendación sería no utilizar este antimicrobiano cuando en una región exista este grado de resistencia.

El método utilizado en el presente estudio para determinar la susceptibilidad de *H. pylori* al MTZ fue el E-test, que según algunos autores puede sobreestimar la resistencia a este antibiótico debido a la presencia de niveles intermedios de MIC, por lo cual la dilución en agar es el método recomendado como “gold standard” por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para determinar susceptibilidad de *H. pylori* al MTZ y otros antimicrobianos (30). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que *H. pylori* tiene un amplio rango de MIC al ser expuesto a metronidazol, independientemente del método utilizado, diferente a lo que ocurre con claritromicina y amoxicilina (31, 32). La amplitud del MIC sugiere que puede haber más de un sitio de acción del MTZ o que hay varias enzimas intracelulares que reducen MTZ (33). Además, ambos métodos presentan variabilidad inter e intra-test y por lo tanto ninguno de los dos es totalmente exacto probablemente por el efecto que sobre ambos

métodos tienen las manipulaciones medioambientales utilizadas para evaluar la resistencia de *H. pylori* al MTZ (33) y con cualquier método utilizado las discrepancias son del 10 al 20% (22).

Cuando el antibiótico es claritromicina o amoxicilina el E-test da resultados comparables al método de dilución en agar (21, 34, 35).

Las dificultades de las diferentes pruebas para determinar con exactitud la susceptibilidad de *H. pylori* a MTZ, tienen relación con las exigentes condiciones del microorganismo para su crecimiento, con atmósferas microaerófilas que, teóricamente, no permiten adecuado potencial reductor, que admita una completa activación de MTZ (23, 36).

Recientemente se demostró, que cuando se sigue un protocolo adecuadamente estandarizado, con base en las guías del CLSI se puede identificar correctamente la resistencia de *H. pylori* a MTZ en 93% de los casos (37, 38). Si bien está establecido que entre el método de E-test y el de dilución en agar hay discrepancias con respecto a la resistencia de MTZ, con una sobrevaloración del E-test, de por lo menos el 13,3% (32), en cuyo caso la resistencia encontrada por nosotros, eventualmente podría ser 13,3% menor a la encontrada y aun así sería una alta prevalencia de resistencia al MTZ. Además, se ha encontrado que la simple manipulación de las condiciones medioambientales utilizadas para evaluar la resistencia de *H. pylori* al MTZ tienen efectos importantes sobre el resultado de cualquiera de las pruebas (E-test y dilución en agar) (33). Y por lo tanto, ambos métodos tienen dificultades en la exactitud para la determinación de la resistencia al MTZ (32, 33). Sin embargo, si la determinación de la resistencia se realiza por el método E-test y existen dudas, sus resultados deberían confirmarse por dilución en agar.

Dada la alta tasa de resistencia encontrada, consideramos que los resultados del presente estudio sugieren que el MTZ no debería ser incluido en las terapias de erradicación de *H. pylori* ya que la prevalencia de la resistencia está por encima del 40% y ello puede afectar negativamente la eficacia del tratamiento (13).

CONCLUSIONES

La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a MTZ en Colombia continúa siendo alta y no ha cambiado en la última década. Se recomienda no utilizar esta antimicrobiano con la intención de erradicar el *H. pylori*.

REFERENCIAS

- Kuipers EJ, Thies JC, Festen HPM. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 59-7.
- Liu Y, Cirieli I, Ponsioen CIJ, Xiao S, Tytgat GNJ, Fiebo J, et al. Geographic pathology of *Helicobacter pylori* gastritis. *Helicobacter* 2005; 10: 107-113.
- Chey WD, Wong CY. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-25.
- Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 449-490.
- Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: The Immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer y gastric cancer. *Ann Rev Microbiol* 2000; 54: 615-640.
- Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* 2004; 53: 34-7.
- Jackson S, Beck PL, Pineo GF, Poon MC. *Helicobacter pylori* eradication: novel therapy for immune thrombocytopenic purpura? A review of the literature. *Am J Hematol* 2005; 78: 142-50.
- DuBois S, Kearney DJ. Iron-deficiency anemia and *Helicobacter pylori* infection: a review of the evidence. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 453-59.
- Henstchel E, Brandstatter G, Dragosics B, Hirschl AM, Nemec H, Schtze K, et al. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1993; 328: 308-12.
- Sung JJ, Chung SC, Ling TK, Lung MY, Leung VKS, Enders KW, et al. Antibacterial treatment of gastric ulcers associated with *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med* 1995; 332: 139-42.
- Marshall BJ, Warren JR, Blicow ED. Prospective double blind trial of duodenal ulcer relapses after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 1988; 332: 1447-52.
- Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.
- Malferteiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham DY, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-The Maastricht III consensus report. *Gut* 2007; 56: 772-81.
- Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
- Gerrits MM; van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Infect Lancet* 2006; 6: 699-709.
- Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.
- Gutiérrez O, Otero W. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol en Colombia. *Rev Col Gastroenterol* 1998; 12: 31-35.
- Otero W, Gutiérrez O, Sierra F. Erradicación del *H. pylori* con terapia triple: Bismuto, Furazolidona, Tetraciclina. *Acta Med Col* 1996; 21: 218, (Res).
- Segura AM, Gutiérrez O, Otero W, Ángel LA, Genta R, Graham DY. Furazolidone, Amoxicillin, Bismuth Triple Therapy for *Helicobacter Pylori* Infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 529-533.
- Albert MJ, Al-mekhaizeem K, Neil L, Dhar R, Dhar PM, Al-ali M. High prevalence and level of resistance to metronidazol, but lack of resistance to other antimicrobials in *Helicobacter pylori* isolated from a multi-racial population in Kuwait. *Alimentary Pharmacol Ther* 2006; 24: 1359-1366.
- Megraud F, Lehn L, Lind T, Bayerdorffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial. The MACH-2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2747-52.

22. Megraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
23. Yepes CA, Rodríguez A, Ruiz A, Ariza B. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Médica Colombiana*, 2008; 33: 11-14.
24. Best LM, Haldane DJM, Keelan M, Taylor DE, Thomson ABR, Loo V, et al. Multilaboratory Comparison of Proficiencies in Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* and Correlation between Agar Dilution and E Test Methods. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003; 47: 3138-3144.
25. Díaz-Regañón J, Alarcón T, López-Brea M, Domingo D. Sensibilidad de 36 aislamientos de *Helicobacter pylori* a cuatro antibióticos de primera línea y características de virulencia. *Rev Esp Quimioterap* 2006; 19: 34-38.
26. Bhatia V, Ahuja Vinet, Das Bimal, Bal C, Sharma M. Use of imidazole-based eradication regimens for *Helicobacter pylori* should be abandoned in North India regardless of in vitro antibiotic sensitivity. *J of Gastroenterol and Hepatol* 2004; 19: 619-625.
27. Perna F, Gatta L, Figura N, Ricci Ch, Tampieri A, Holton J, Miglioli M, Vaira D. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(10): 2157-2161.
28. Osato MS, Reddy R, Reddy S,G, Penland L, Malaty HM, Graham DY. Pattern of Primary Resistance of *Helicobacter pylori* to Metronidazole or Clarithromycin in the United States. *Arch Intern Med* 2001; 161(14): 1217-1220.
29. Sherif M, Mohran Z, Fathy H, Rockabrand M, Rozmajzl J, Frenk RW. Universal high level primary metronidazol resistance in *Helicobacter pylori* isolated from children in Egypt. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4832-4.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing for infrequently isolated or fastidious bacteria 2006; 26(5). M2-M7. Penn. USA.
31. Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R, Flamm R, Evans DG, Tanaka SK, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin and metronidazol. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 37-41.
32. Osato MS, Reddy R, Graham DY. Metronidazole and clarithromycin resistance amongst *Helicobacter pylori* isolates from a large metropolitan hospital in the United States. *Intern J Antimicrob Ag* 1999; 12: 341-7.
33. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Siddharta G, Penland RL, Graham DY. Comparison of the E-test and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Ag* 2001; 17: 39-44.
34. Henriksen TH, Lerang F, Lia A, Schoyen R, Thoresen TB, Ragnhildstveit Y, et al. laboratory handling of *Helicobacter pylori* critically influences the results of in-vitro metronidazole resistance determination. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 315-21.
35. Piccolomini R, di Bonaventura G, Catao G, Carbone F, Neri ML. Comparative evaluation of the E-test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1842-6.
36. Smith MA, Edwards DI. The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemoter* 1995; 36: 453-61.
37. Cederbrandt G, Kahlmeter G, Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemoter* 1992; 29: 115-20.
38. Von Recklinghausen G, Asorg R. Metronidazole susceptibility testing of *Helicobacter pylori* with the PDM epsilometer test (E-test). *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1995; 282: 83-85.