

Original

Actividad *in vitro* de la furazolidona y la nitrofurantoína en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* y estudio de la tasa de mutación

T. Alarcón, P. de la Obra, D. Domingo, J.A. García-Campos, J. Díaz-Regañón y M. López-Brea

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid

RESUMEN

Claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y metronidazol son los antimicrobianos más utilizados en las infecciones por *Helicobacter pylori*. La resistencia a la tetraciclina y a la amoxicilina es poco frecuente, pero la resistencia a la claritromicina y al metronidazol depende de la población estudiada y es un importante marcador de fallo terapéutico. El objetivo de este estudio era determinar la actividad *in vitro* de furazolidona y nitrofurantoína en 164 aislamientos clínicos de *H. pylori* mediante dilución en agar, y determinar la tasa de mutación espontánea en ocho cepas. La resistencia al metronidazol fue del 23,77% (IC95%: 18,96-29,14) y a la claritromicina del 16,78% (IC95%: 12,64-21,62); además, un 1,4% (IC95%: 0,38-3,54) mostraron resistencia intermedia a la claritromicina. Todas las cepas fueron sensibles a la amoxicilina y a la tetraciclina. El porcentaje de resistencia a la furazolidona y la nitrofurantoína fue del 1,82% (IC95%: 0,37-5,25) y el 0,6% (IC95%: 0-3,35), respectivamente. Las tres cepas resistentes a la furazolidona fueron sensibles a la nitrofurantoína (CMI = 4 mg/l para furazolidona y 2 mg/l para nitrofurantoína), y la única cepa resistente a la nitrofurantoína fue sensible a la furazolidona (CMI = 4 mg/l para nitrofurantoína y 1 mg/l para furazolidona). Estas cuatro cepas eran resistentes al metronidazol (CMI = 16 mg/l). No se detectó mutación espontánea que confiriera resistencia a furazolidona ni a nitrofurantoína en las ocho cepas de *H. pylori* estudiadas; sin embargo, sí se detectaron mutantes resistentes a metronidazol en las ocho cepas, con una tasa de mutación de $7,4 \times 10^{-10}$ a $9,4 \times 10^{-10}$. La furazolidona y la nitrofurantoína mostraron una excelente actividad *in vitro*, lo que puede ratificar la utilidad de la furazolidona como antimicrobiano de segunda línea cuando ha fallado el tratamiento, o como tratamiento de primera línea en poblaciones con pocos recursos económicos.

Palabras clave: *Helicobacter pylori* - Furazolidona - Nitrofurantoína - Resistencia

In vitro activity of furazolidone and nitrofurantoin in *Helicobacter pylori* clinical isolates and study of mutation rate

SUMMARY

Clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and metronidazole are the most frequently used antimicrobials for *Helicobacter pylori* infection treatment. While tetracycline and amoxicillin resistance are rare, clarithromycin and metronidazole resistance vary in different populations and are considered factors for treatment failure. The aim of this study was to determine the *in vitro* activity of furazolidone and nitrofurantoin in 164 *H. pylori* clinical isolates by agar dilution and to determine the spontaneous mutation rate. Metronidazole and clarithromycin resistance were 23.77% (CI95%: 18.96-29.14) and 16.78% (CI95%: 12.64-21.62), respectively; moreover, 1.4% (CI95%: 0.38-3.54) were intermediate to clarithromycin. All the isolates were susceptible to amoxicillin and tetracycline. Furazolidone and nitrofurantoin resistance rates were 1.82% (CI95%: 0.37-5.25) and 0.6% (CI95%: 0-3.35), respectively. The three furazolidone-resistant strains were nitrofurantoin-susceptible (MIC 4 mg/l for furazolidone and 2 mg/l for nitrofurantoin) and the nitrofurantoin-resistant strains were furazolidone-susceptible (MIC 4 mg/l for nitrofurantoin and 1 mg/l for furazolidone). These four strains were metronidazole-resistant (MIC 16 mg/l). Furazolidone or nitrofurantoin spontaneous mutants were not detected in the eight *H. pylori* strains tested. However, mutants with resistance to metronidazole were found with all the strains with a mutation rate of 7.4×10^{-10} to 9.4×10^{-10} . Furazolidone and nitrofurantoin showed an excellent *in vitro* activity against the *H. pylori* clinical isolates included herein, supporting the usefulness of furazolidone as second-line antimicrobial after treatment failure or as first-line therapy in populations with low economical resources.

Key words: *Helicobacter pylori* - Furazolidone - Nitrofurantoin - Resistance

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo gramnegativo que se encuentra en la mucosa gástrica humana asociado a enfermedades digestivas, como gastritis, úlcera duodenal o gástrica y linfomas tipo MALT, y es considerado un factor de riesgo en el desarrollo del cáncer gástrico (1, 2). Los antibióticos más utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por *H. pylori* son claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y metronidazol (3-5). Mientras la resistencia a la tetraciclina y a la amoxicilina es muy poco frecuente, la resistencia a la claritromicina y al metronidazol es un problema creciente, depende de la población estudiada (6, 7) y es un importante factor relacionado con el fallo del tratamiento (8-10). Se han utilizado diversos antimicrobianos como posibles alternativas a las terapias convencionales, como la furazolidona y la rifabutinina (11). Además, la resistencia a la furazolidona o a la nitrofurantoína parece ser poco frecuente en la mayoría de los estudios (12). El objetivo de este estudio fue determinar la actividad *in vitro* de la furazolidona y la nitrofurantoína en aislamientos clínicos de *H. pylori*, y determinar la tasa de mutación espontánea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se obtuvieron 164 aislamientos clínicos de *H. pylori*, entre los años 1999 y 2001, procedentes de muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante endoscopia digestiva. Las muestras se transportaron en un tubo estéril con 1 ml de solución salina fisiológica al Servicio de Microbiología, se sembraron en medios selectivos y no selectivos, y se incubaron 7 a 10 días en atmósfera microaerófila. Los aislamientos se identificaron mediante la morfología de la colonia, la tinción de Gram y las pruebas positivas de catalasa, oxidasa y ureasa. Las cepas se conservaron a -80°C hasta la determinación de su sensibilidad. Se utilizó la cepa *Helicobacter pylori* NCTC 11638 y TIGR 26695 (*The Institute for Genome Research*) como control de las pruebas de sensibilidad.

Antimicrobianos

Se estudiaron los antimicrobianos amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, nitrofurantoína y furazolidona, obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich, y claritromicina por gentileza de Abbott Laboratorios. Los antimicrobianos se emplearon como sustancia valorada con potencia conocida, y se disolvieron y diluyeron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante o del NCCLS (13).

Determinación de la CMI por dilución en agar

Se prepararon diluciones dobles seriadas de cada antimicrobiano (128 a 0,008 mg/l), que se incluyeron en agar Mueller-Hinton suplementado con un 7% a 10% de sangre de caballo. Se preparó un inóculo de 10^8 UFC/ml a partir de cultivos de 48 horas de los microorganismos. Las placas se inocularon con un inoculador automático y se incubaron durante tres a cinco días en atmósfera microaerófila. Se determinó la CMI como la concentración más baja del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible.

Criterios de sensibilidad de *Helicobacter pylori*

Se utilizó el criterio recomendado por el NCCLS para la claritromicina (sensible si CMI $\leq 0,25$ mg/l, intermedio si CMI = 0,5 mg/l y resistente si CMI ≥ 1 mg/l) (13). Para los demás antimicrobianos se utilizaron los siguientes criterios, basados en publicaciones previas: metronidazol, sensible si CMI < 8 mg/l y resistente si CMI ≥ 8 mg/l (7); amoxicilina, sensible si CMI $\leq 0,5$ mg/l y resistente si CMI $> 0,5$ mg/l (14); tetraciclina, sensible si CMI ≤ 2 mg/l y resistente si CMI > 2 mg/l (15); furazolidona y nitrofurantoína, sensible si CMI < 4 mg/l y resistente si CMI ≥ 4 mg/l (12).

Estudio de la frecuencia de mutación

Se seleccionaron ocho cepas sensibles (incluidas *H. pylori* NCTC 11638 y *H. pylori* TIGR 26695) para estudiar la tasa de mutación espontánea que confiere resistencia a metronidazol, furazolidona y nitrofurantoína. Las cepas se cultivaron en infusión de cerebro-corazón con extracto de levadura y un 5% de suero fetal bovino durante tres días; se dividió una dilución de 10^5 células/ml en alícuotas de 0,5 ml para obtener cultivos paralelos e independientes, que se incubaron durante tres días. El cultivo completo se realizó en medio con 8 mg/l de metronidazol, 2 mg/l de nitrofurantoína o 2 mg/l de furazolidona, y en medio sin antimicrobianos después de realizar diluciones adecuadas para obtener un número de colonias viables. Se realizó el recuento de colonias después de cuatro días de incubación. Para determinar la tasa de mutación (probabilidad de que ocurra una mutación por célula y por cultivo) se aplicó la ecuación descrita por Luria-Delbruck en 1943 y revisada por Roscher en 2001 (16), estimando el número de mutaciones mediante análisis de fluctuación (16). La frecuencia de mutantes resistentes se determinó como el número de

células resistentes dividido entre el número total de células viables por cultivo.

Análisis de resultados

Para comparar la actividad *in vitro* de los diferentes antimicrobianos se analizó la CMI que inhibió al 50% de los aislamientos estudiados (CMI₅₀), la CMI que inhibió al 90% de los aislamientos estudiados (CMI₉₀) y el intervalo de CMI para todos los aislamientos. Se determinó el porcentaje de cepas sensibles, con resistencia intermedia o resistentes a cada antimicrobiano, con un intervalo de confianza del 95% (IC95%).

RESULTADOS

La resistencia al metronidazol en los aislamientos clínicos de *H. pylori* incluidos en el estudio fue del 23,77% (IC95%: 18,96-29,14), y a la claritromicina del 16,78% (IC95%: 12,64-21,62). Además, un 1,4% (IC95%: 0,38-3,54) de las cepas presentaron resistencia intermedia a la claritromicina, con una CMI de 0,5 mg/l. Todos los aislamientos fueron sensibles a la amoxicilina y a la tetraciclina.

El porcentaje de resistencia a la furazolidona y a la nitrofurantoína fue del 1,82% (IC95%: 0,37-5,25) y del 0,6%

(IC95%: 0-3,35), respectivamente. Las tres cepas resistentes a la furazolidona fueron sensibles a la nitrofurantoína (CMI de 4 mg/l para la furazolidona y de 2 mg/l para la nitrofurantoína), y la única cepa resistente a la nitrofurantoína fue sensible a la furazolidona (CMI de 4 mg/l para la nitrofurantoína y de 1 mg/l para la furazolidona). Estas cuatro cepas eran resistentes al metronidazol (CMI de 16 mg/l).

En la Tabla 1 se muestran los resultados en forma de CMI₅₀, CMI₉₀ e intervalo para los antimicrobianos estudiados. Los porcentajes de cepas sensibles, con resistencias intermedias o resistentes a los antimicrobianos estudiados se presentan en la Tabla 2.

No se detectó mutación espontánea que confiriera resistencia a la furazolidona ni a la nitrofurantoína en los seis aislamientos clínicos de *H. pylori* ni en las dos cepas control estudiadas; sin embargo, sí se detectaron mutantes resistentes al metronidazol, con una frecuencia de mutación de $3,6 \times 10^{-9}$ a $5,6 \times 10^{-9}$ y una tasa de mutación de $7,4 \times 10^{-10}$ a $9,4 \times 10^{-10}$ (Tablas 3 y 4).

DISCUSIÓN

H. pylori se encuentra asociado a diferentes enfermedades digestivas, como gastritis crónica, úlcera péptica y linfoma MALT, y actualmente se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, pero una parte importante de las personas colonizadas no presentan sintomatología y probablemente no desarrollarán nunca una infección grave. Se han realizado diferentes reuniones de consenso para determinar cuándo es necesario realizar un tratamiento erradicador y con qué pauta (17).

La mayoría de los antimicrobianos son activos *in vitro* frente a *H. pylori*, pero esto no garantiza la eficacia clínica. Los que han demostrado resultados en clínica son las tetraciclinas, el metronidazol (y otros nitroimidazoles), la amoxicilina y la claritromicina (y otros macrólidos). Sin embargo, diversos factores se han asociado con el fallo del

Tabla 1. CMI₅₀, CMI₉₀ e intervalo de CMI (mg/l) para los antimicrobianos estudiados frente a *Helicobacter pylori*.

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo
Metronidazol	1	32	0,016-128
Claritromicina	0,032	8	0,008-64
Amoxicilina	0,016	0,125	0,008-0,5
Tetraciclina	0,125	0,5	0,008-2
Furazolidona	0,125	0,5	0,008-4
Nitrofurantoína	0,5	1	0,008-4

Tabla 2. Porcentaje de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes, con resistencia intermedia y sensibles a los diferentes antimicrobianos.

	Resistentes		Intermedias		Sensibles	
	%	IC 95%	%	IC 95%	%	IC 95%
Metronidazol	23,77	18,96-29,14	-	-	76,22	70,85-81,03
Claritromicina	16,78	12,64-21,62	1,4%	0,38-3,54	81,81	76,85-86,11
Amoxicilina	0	0-1,28	-	-	100	98,71-100
Tetraciclina	0	0-1,28	-	-	100	98,71-100
Furazolidona	1,82	0,37-5,25	-	-	98,17	94,74-99,62
Nitrofurantoína	0,6	0-3,35	-	-	99,39	96,64-100

Tabla 3. Número de mutantes de *Helicobacter pylori* resistentes al metronidazol obtenidos en cada uno de los cultivos independientes.

Cultivos	Cepas de <i>Helicobacter pylori</i>							
	Hp1	Hp2	Hp3	Hp4	Hp5	Hp6	TIGR26695	NCTC11638
1	11	0	0	0	7	4	0	6
2	5	3	0	7	0	0	4	0
3	0	0	0	0	6	0	0	0
4	9	0	11	0	0	0	4	0
5	0	5	4	0	0	0	11	15
6	0	0	0	3	13	0	0	0
7	7	4	0	0	0	0	0	0
8	0	0	8	5	5	14	0	0
9	0	0	0	0	0	6	0	2
10	0	0	0	0	0	0	1	0
11	0	11	0	4	0	5	0	0
12	0	0	5	8	4	3	0	0
13	-	-	0	-	0	0	0	8
14	-	-	-	-	0	0	7	-
15	-	-	-	-	9	-	0	-
16	-	-	-	-	0	-	-	-

Tabla 4. Tasa de mutaciones que confieren resistencia al metronidazol en las ocho cepas de *Helicobacter pylori* estudiadas.

Cepa	Nº células/cultivo	Bacterias resistentes			Tasa de mutación por división celular
		Fracción cero*	Media	Frecuencia de mutación	
Hp1	$4,5 \times 10^8$	8/12	2	$4,4 \times 10^{-9}$	$8,8 \times 10^{-10}$
Hp2	$5,8 \times 10^8$	7/12	2,5	$4,3 \times 10^{-9}$	$9,2 \times 10^{-10}$
Hp3	$3,9 \times 10^8$	9/13	2,1	$5,3 \times 10^{-9}$	$9,4 \times 10^{-10}$
Hp4	$5,7 \times 10^8$	7/12	2,2	$3,9 \times 10^{-9}$	$9,4 \times 10^{-10}$
Hp5	$5,3 \times 10^8$	10/16	2,7	5×10^{-9}	$8,8 \times 10^{-10}$
Hp6	$5,9 \times 10^8$	9/14	2,2	$3,7 \times 10^{-9}$	$7,4 \times 10^{-10}$
TIGR 26695	$4,6 \times 10^8$	10/15	1,7	$3,6 \times 10^{-9}$	$8,8 \times 10^{-10}$
NCTC 11637	$4,1 \times 10^8$	9/13	2,3	$5,6 \times 10^{-9}$	$8,9 \times 10^{-10}$

*Fracción cero: fracción de cultivos sin mutantes.

tratamiento, como la falta de cumplimiento por parte del paciente, la interrupción del tratamiento por la aparición de efectos secundarios o la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos utilizados, especialmente a la claritromicina y al metronidazol. Se han utilizado nuevos antimicrobianos en pautas de segunda línea, como la furazolidona, el levofloxacino y la rifabutina, y se han obtenido buenas tasas de erradicación (11).

La prevalencia de la resistencia a los diferentes antimicrobianos presenta variaciones geográficas o incluso po-

blacionales dentro de la misma región, por lo que se recomienda realizar estudios de sensibilidad antes de aplicar tratamientos empíricos. Además, la resistencia ha aumentado en los últimos años (18).

En los aislamientos clínicos de *H. pylori* incluidos en este estudio no encontramos ninguna cepa resistente a la amoxicilina ni a la tetraciclina. La resistencia a estos antimicrobianos se ha descrito en algunos trabajos, pero sigue siendo excepcional (19, 20). El porcentaje de resistencia al metronidazol fue del 23,77%, algo más bajo que lo publi-

cado en un estudio multicéntrico realizado en Europa, en el cual era del 33,1%, aunque se observaron variaciones entre los países del Norte, Centro o Sur de Europa (33%, 29,2% y 40,8%, respectivamente) (14).

La resistencia a la claritromicina en los aislamientos estudiados fue del 16,78%, y se detectó también un 1,4% de cepas con resistencia intermedia. La mayoría de los aislamientos incluidos en este estudio se obtuvieron en el año 2001 y el porcentaje de resistencia encontrado es más bajo que el que se detecta en aislamientos obtenidos más recientemente (datos sin publicar). La resistencia global observada en el estudio multicéntrico europeo fue del 9,9%, con importantes variaciones entre las cepas aisladas en países del Norte (4,2%), del Centro (9,3%) o del Sur (18,4%) (14). Se han descrito también importantes variaciones entre cepas aisladas de muestras de niños o de adultos, y que el porcentaje de resistencia era mayor en los niños más pequeños (14, 21).

El porcentaje de resistencia a la furazolidona y a la nitrofurantoína en los aislamientos incluidos en este estudio fue muy bajo (menos del 2%), datos que concuerdan con los de otros autores. Se ha estudiado la resistencia a la furazolidona en diversas poblaciones y se ha detectado un alto porcentaje de sensibilidad: 100% en India (22) y Brasil (9, 23), 98,6% en Corea (24, 25), 98% en Texas (12) o 96% en otro estudio realizado en Brasil (26).

Existen pocos trabajos que comparan la sensibilidad a la nitrofurantoína y a la furazolidona, y se observan porcentajes similares de resistencia (12, 24, 25). En nuestro trabajo se observaron diferencias en el porcentaje de resistencia, aunque cabe señalar que las CMI de los dos antimicrobianos fueron similares y próximas al punto de corte que las clasificó en diferente categoría para cada antimicrobiano. La implicación clínica de estos datos no se conoce.

La resistencia al metronidazol en nuestros aislamientos fue del 16%, mientras que a la furazolidona fue del 1,8%. Además, las cepas resistentes a la furazolidona fueron resistentes al metronidazol. En estudios anteriores se describió también la resistencia al metronidazol en cepas resistentes a la furazolidona, y que el porcentaje de resistencia al metronidazol era mucho más elevado que a la furazolidona (52% *versus* 2%) (12).

En *H. pylori*, el mecanismo de acción de metronidazol, furazolidona y nitrofurantoína es similar y requiere la reducción del grupo nitro, aunque este proceso se produciría de diferente modo (27). En la reducción del metronidazol están implicadas las nitrorreductas RdxA, FrxA y FdxB, que no participan en la reducción de la furazolidona ni de la nitrofurantoína. La reducción de estos dos antimicrobia-

nos podría producirse por la piruvato flavodoxin oxidoreductasa y la 2-oxoglutarato reductasa (28, 29). Estas dos enzimas son esenciales para la bacteria, por lo que la tasa de mutación a estos antimicrobianos sería muy baja; sin embargo, una inactivación parcial llevaría a un bajo grado de resistencia a la furazolidona y a la nitrofurantoína, y podría ser causa de la resistencia de bajo grado al metronidazol.

Los microorganismos adquieren resistencia a los antibióticos por diferentes mecanismos, como la aparición de mutaciones en genes cromosómicos o por la adquisición horizontal de genes de resistencia. En *H. pylori* se han descrito mutaciones que confieren resistencia a diferentes antimicrobianos, como claritromicina (mutaciones en el gen 23S rDNA), tetraciclina (mutaciones en el 16S rDNA) o las fluoroquinolonas (mutaciones en *gyrA*) (30-32). Las mutaciones en el gen *rdxA* parecen ser el principal mecanismo implicado en la resistencia al metronidazol.

En este estudio calculamos la tasa de mutación que confiere resistencia al metronidazol, a la furazolidona y a la nitrofurantoína en seis aislamientos clínicos de *H. pylori* y en dos cepas control. Para la nitrofurantoína y la furazolidona, la tasa de mutación observada fue extremadamente baja (menor de 10^{-10}), sin que se recuperara ninguna colonia resistente en los cultivos independientes realizados; sin embargo, sí se detectaron mutantes resistentes al metronidazol, con una frecuencia entre $3,6 \times 10^{-9}$ y $5,6 \times 10^{-9}$, y una tasa de mutación entre $7,4 \times 10^{-10}$ y $9,4 \times 10^{-10}$. La tasa de mutación que confiere resistencia al metronidazol en *H. pylori* ha sido estudiada por otros autores, encontrando que es baja ($<10^{-9}$) (33).

La furazolidona presenta una buena actividad *in vitro* frente a aislamientos clínicos de *H. pylori*, y el porcentaje de resistencia es muy bajo. En poblaciones en desarrollo, con pocos recursos económicos, la furazolidona puede ser una buena opción terapéutica, aunque pueden aparecer efectos secundarios que lleven a suspender el tratamiento (34). También puede ser una buena alternativa a la claritromicina cuando la resistencia a este antimicrobiano impida su utilización clínica.

Correspondencia: Teresa Alarcón, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, c/Diego de León 62, 28006 Madrid. Tel./Fax: 34 91 520 23 17. e-mail: talarcon@helicobacterspain.com

BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall, B.J. *Helicobacter pylori: Situación actual y en los próximos diez años*. En: López-Brea, M. (Ed.). *Helicobacter pylori*. Retos para el siglo XXI: Microbiología, clínica y tratamiento. Prous Science, Barcelona 1999; 13-30.

2. World Health Organization. IARC, monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. World Health Organization, Geneva 1994; 61: 177-240.
3. Megraud, F. *Update on therapeutic options for Helicobacter pylori-related diseases*. Curr Infect Dis Rep 2005; 7: 115-120.
4. Candelli, M., Nista, E.C., Carloni, E. y cols. *Treatment of H. pylori infection: A review*. Curr Med Chem 2005; 12: 375-384.
5. De Boer, W.A., Tytgat, G.N.J. *Treatment of Helicobacter pylori infection*. BMJ 2000; 320: 31-34.
6. Wu, H., Shi, X.D., Wang, H.T., Liu, J.X. *Resistance of Helicobacter pylori to metronidazole, tetracycline and amoxicillin*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 121-123.
7. Alarcón, T., Domingo, D., López-Brea, M. *Antibiotic resistance problems with Helicobacter pylori*. Intern J Antimicrob Agent 1999; 12: 19-26.
8. Qasim, A., O'Morain, C.A. *Review article: Treatment of Helicobacter pylori infection and factors influencing eradication*. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16 (Suppl. 1): 24-30.
9. Queiroz, D.M., Dani, R., Silva, L.D. y cols. *Factors associated with treatment failure of Helicobacter pylori infection in a developing country*. J Clin Gastroenterol 2002; 35: 315-320.
10. Van Doorn, L.J., Schneeberger, P.M., Nouhan, N., Plaisier, A.P., Quint, W.G.V., De Boer, W.A. *Importance of Helicobacter pylori cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment*. Gut 2000; 46: 321-326.
11. Qasim, A., Sebastian, S., Thornton, O. y cols. *Rifabutin- and furazolidone-based Helicobacter pylori eradication therapies after failure of standard first- and second-line eradication attempts in dyspepsia patients*. Aliment Pharmacol Ther 2005; 21: 91-96.
12. Kwon, D.H., Lee, M., Kim, J.J. y cols. *Furazolidone- and nitrofurantoin-resistant Helicobacter pylori: Prevalence and role of genes involved in metronidazole resistance*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 306-308.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement (aerobic dilution)*. NCCLS document M100-S10 (M7), Wayne, Pennsylvania, 2000.
14. Glupczynski, Y., Mégraud, F., Andersen, L., López-Brea, M. *European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in H. pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 820-823.
15. Midolo, P.D., Korman, M.G., Turnidge, J.D., Lambert, J.R. *Helicobacter pylori resistance to tetracycline*. Lancet 1996; 347: 1194-1195.
16. Rosche, W.A., Foster, P.L. *Determining mutation rates in bacterial populations*. Methods 2000; 20: 4-17.
17. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. y cols. *The European Helicobacter pylori Study Group (EHPG). Current concept in the management of Helicobacter pylori infection. The Maastricht 2-2000 Consensus Report*. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 167-180.
18. López-Brea, M., Domingo, D., Sánchez, I., Alarcón, T. *Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in Helicobacter pylori clinical isolates from Spain*. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 279-281.
19. Watanabe, K., Tanaka, A., Imase, K. y cols. *Amoxicillin resistance in Helicobacter pylori: Studies from Tokyo, Japan, from 1985 to 2003*. Helicobacter 2005; 10: 4-11.
20. Nahar, S., Mukhopadhyay, A.K., Khan, R. y cols. *Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori strains isolated in Bangladesh*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4856-4858.
21. Alarcón, T., Vega, A.E., Domingo, D., Martínez, M.J., López-Brea, M. *High level of clarithromycin resistance in Helicobacter pylori from children according to age and study of the mechanism of resistance by PCR-RFLP*. J Clin Microbiol 2003; 41: 486-489.
22. Datta, S., Chattopadhyay, S., Patra, R. y cols. *Most Helicobacter pylori strains of Kolkata in India are resistant to metronidazole but susceptible to other drugs commonly used for eradication and ulcer therapy*. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22: 51-57.
23. Coelho, L.G., Moretzsohn, L.D., Vieira, W.L. y cols. *New once-daily, highly effective rescue triple therapy after multiple Helicobacter pylori treatment failures: A pilot study*. Aliment Pharmacol Ther 2005; 21: 783-778.
24. Kim, J.J., Kim, J.G., Kwon, D.H. *Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant Helicobacter pylori isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing*. Helicobacter 2003; 8: 202-206.
25. Kim, J.J., Reddy, R., Lee, M. y cols. *Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of Helicobacter pylori isolates from Korea*. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 459-461.
26. Mendonca, S., Ecclissato, C., Sartori, M.S. y cols. *Prevalence of Helicobacter pylori resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil*. Helicobacter 2000; 5: 79-83.
27. Whiteway, J., Koziarz, P., Veall, J. y cols. *Oxygen insensitive nitroreductases: Analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to nitrofurans derivatives in Escherichia coli*. J Bacteriol 1998; 180: 5529-5539.
28. Kaihovaara, P., Hook-Nikkanen, J., Uusi-Oukari, M., Kosunen, T.U., Salaspuro, M. *Flavodoxin-dependent pyruvate oxidation, acetate production and metronidazole reduction by Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 171-177.
29. Hughes, N.J., Clayton, C.L., Chalk, P.A., Kelly, D.J. *Helicobacter pylori porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate: Acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP*. J Bacteriol 1998; 180: 1119-1128.
30. Domingo, D., Alarcón, T. *Mecanismo de resistencia a antibióticos en Helicobacter pylori*. En: López-Brea, M. (Ed.). *Helicobacter pylori: Retos para el siglo XXI*. Microbiología, clínica y tratamiento. Prous Science, Barcelona 1999; 307-325.
31. Kim, J.M., Kim, J.S., Kim, N., Jung, H.C., Song, I.S. *Distribution of fluoroquinolone MICs in Helicobacter pylori strains from Korean patients*. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 965-967.
32. Fujimura, S., Kato, S., Iinuma, K., Watanabe, A. *In vitro activity of fluoroquinolone and the gyrA gene mutation in Helicobacter pylori strains isolated from children*. J Med Microbiol 2004; 53: 1019-1022.
33. Wang, G., Wilson, T.J., Jiang, Q., Taylor, D.E. *Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 727-733.
34. Roghani, H.S., Massarrat, S., Shirekhoda, M., Butorab, Z. *Effect of different doses of furazolidone with amoxicillin and omeprazole on eradication of Helicobacter pylori*. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 778-782.