

# Evolución de la sensibilidad de 235 cepas de *Helicobacter pylori* entre 1995 y 1998 e impacto del tratamiento antibiótico

Eva Cuchí Burgos<sup>a</sup>, Montserrat Forné Bardera<sup>b</sup>, Salvador Quintana Riera<sup>c</sup>, José Lite Lite<sup>a</sup> y Javier Garau Alemany<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, <sup>b</sup>Servicio de Gastroenterología y <sup>c</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Mútua de Terrassa. Barcelona. España.

**FUNDAMENTO.** Conocer la sensibilidad de *Helicobacter pylori* a los antibióticos utilizados en el tratamiento erradicador, su evolución temporal y la influencia de la utilización previa de dicho tratamiento.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se estudió mediante E-test la sensibilidad a amoxicilina, metronidazol, claritromicina y tetraciclina de 235 aislamientos consecutivos de *Helicobacter pylori* durante el período comprendido entre 1995 y 1998, y se relacionaron los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) hallados con la utilización previa de tratamiento erradicador.

**RESULTADOS.** Se observó un porcentaje de resistencia a metronidazol de 23,5%, de 12,9% a claritromicina y de 0,7% a tetraciclina; ninguna de las cepas fue resistente a amoxicilina. No se observaron cambios significativos en los porcentajes de resistencia a lo largo del período estudiado. Los porcentajes de resistencia a metronidazol y claritromicina fueron significativamente más elevados ( $p = 0,03$  y  $p < 0,001$ , respectivamente) en las cepas aisladas de los pacientes que habían recibido tratamiento.

**CONCLUSIONES.** Es necesaria la monitorización de la sensibilidad de *H. pylori* a los antibióticos utilizados en el tratamiento erradicador, especialmente en los pacientes previamente tratados.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*. Sensibilidad antibiótica. Tratamiento.

Sensitivity of 235 strains of *Helicobacter pylori* from 1995 to 1998 and impact of antibiotic treatment

**BACKGROUND.** The aim of this study was to investigate the sensitivity of *Helicobacter pylori* to the antibiotics used in its eradication over a period of four years and to determine the influence of previous treatment on sensitivity.

**MATERIAL AND METHODS.** During the period from 1995 to 1998 we determined the sensitivity of 235 consecutive

*Helicobacter pylori* isolates to amoxicillin, metronidazole, clarythromycin and tetracycline by means of E-test methodology. The MIC values found were related with the prior use of eradicating treatment.

**RESULTS.** The percentage of resistant strains were as follows: 23.5% to metronidazole, 12.9% to clarythromycin and 0.7% to tetracycline; none of the strains was resistant to amoxicillin. There were no significant changes in percentage of resistance to the drugs studied over the 4-year period. Resistance to metronidazole and clarythromycin was significantly higher ( $p = 0.03$  and  $p < 0.001$  respectively) in strains isolated from patients who had received previous treatment.

**CONCLUSIONS.** Monitorization of *H. pylori* sensitivity to the drugs used in its eradication is particularly important in patients who have undergone prior treatment.

**Key words:** *Helicobacter pylori*. Antibiotic susceptibility. Treatment.

## Introducción

*Helicobacter pylori*, aislado por primera vez de la mucosa gástrica en 1982<sup>1</sup>, se considera en la actualidad la principal causa del ulcus péptico. En el 90% de los casos la erradicación de la infección permite la cicatrización de la úlcera y previene las recaídas. El tratamiento erradicador consiste en la combinación de dos antibióticos (amoxicilina, metronidazol, claritromicina o tetraciclina) combinados con un inhibidor de la bomba de protones o sales de bismuto; el fracaso terapéutico se ha relacionado con varios factores, entre ellos la combinación de fármacos, la duración del tratamiento y el período de seguimiento<sup>2</sup>.

Se analiza la evolución de la sensibilidad *in vitro* de *H. pylori* a amoxicilina, metronidazol, claritromicina y tetraciclina a lo largo de 4 años consecutivos (1995-1998) y la influencia del tratamiento erradicador previo.

## Métodos

Entre enero de 1995 y diciembre de 1998 se estudió la sensibilidad antibiótica de 235 cepas de *H. pylori* aisladas de 226 pacientes (75 de ellos mujeres), que acudieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Mútua de Terrassa por presentar sintomatología compatible con ulcus péptico. Se obtuvieron dos biopsias antrales mediante endoscopia para estudio microbiológico en el laboratorio del mismo centro. De pacientes que nunca habían recibido tratamiento

Correspondencia: Dra. E. Cuchí Burgos.

Servicio de Microbiología.

Hospital Mútua de Terrassa.

García Humet, 2. 08221 Terrassa. Barcelona.

Correo electrónico: micro@mutuaterrassa.es

Manuscrito recibido el 1-10-2001; aceptado el 30-01-2002.

TABLA 1. Interpretación de las CMI de los antibióticos estudiados ( $\mu\text{g/ml}$ )

|                | Sensible | Intermedio | Resistente |
|----------------|----------|------------|------------|
| Amoxicilina    | —        | —          | > 0,5      |
| Claritromicina | ≤ 0,25   | 0,5        | ≥ 1        |
| Metronidazol   | < 4      | 6-8        | > 8        |
| Tetraciclina   | ≤ 0,25   | 0,5-1      | ≥ 1        |

erradicador provenían 177 (75,3%) cepas; 34 (14,5%) habían recibido tratamiento previo con claritromicina (y un inhibidor de la bomba de protones), sola o asociada a amoxicilina y 11 (4,6%) habían recibido otras combinaciones antibióticas, todas ellas incluyendo metronidazol. En 13 casos (5,5%) se desconocía si el paciente había recibido o no tratamiento erradicador. Las muestras se remitieron al laboratorio en suero fisiológico y se procesaron durante la hora siguiente a su obtención. Tras su homogeneización, se sembraron en placas de medio Columbia con el 5% de sangre de carnero (BioMérieux®, France) que se incubaron a 37 °C en atmósfera microaeróflica un máximo de 10 días. La identificación de *H. pylori* se llevó a cabo por características morfológicas y culturales, tinción de Gram, producción de citocromo oxidasa e hidrólisis de la urea. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico se determinó mediante E-test (AB Biodisk, Sweden) en agar Columbia con el 5% de sangre de carnero (bioMérieux®, Francia), sembrada con una suspensión del microorganismo McFarland 3 en suero fisiológico, que se incubó a 37 °C en atmósfera microaeróflica de 3 a 5 días. Los puntos de corte utilizados para la interpretación de las CMI obtenidas se detallan en la tabla 1. La sensibilidad a tetraciclina empezó a estudiarse en 1996. Para el estudio estadístico las variables se expresaron en porcentajes y los resultados se analizaron mediante el test de  $\chi^2$  con la corrección de Yates o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Se consideró que existían diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ . Entre  $p = 0,05$  y  $p = 1$  se consideró que el valor expresaba una tendencia marginal. El tratamiento estadístico se hizo con un enfoque bilateral, con el software SPSS 6.1 para Windows.

## Resultados

El porcentaje promedio de resistencia a lo largo del estudio fue del 23,5% para metronidazol, el 12,9% para claritromicina y el 0,7% para tetraciclina. No se observó variación significativa en los porcentajes anuales de resistencia (tabla 2).

En 138 de las 235 cepas se estudiaron los cuatro antibióticos. Setenta y cuatro (53,6%) fueron sensibles a todos ellos. De las 90 cepas en las que se estudiaron conjuntamente amoxicilina, metronidazol y tetraciclina, 60 (66,7%) fueron sensibles a los tres. Nueve de 229 cepas (3,9%) fueron resistentes tanto a metronidazol como a claritromicina; seis de ellas se habían aislado de pacientes que habían recibido previamente una pauta de

TABLA 2. Evolución de la resistencia antibiótica

|  | Metronidazol   |               | Clarithromicina |              | Tetraciclina |                |
|--|----------------|---------------|-----------------|--------------|--------------|----------------|
|  | Resistente     | Intermedio    | Resistente      | Intermedio   | Resistente   | Intermedio     |
| 1995                                   | 7/52 (13,5%)   | 5/52 (9,6%)   | 7/55 (12,7%)    | 2/55 (3,6%)  | —            | —              |
| 1996                                   | 18/62 (29,0%)  | 6/62 (9,7%)   | 3/62 (4,8%)     | —            | —            | 1/24 (4,2%)    |
| 1997                                   | 18/70 (25,7%)  | 1/70 (1,4%)   | 9/69 (13,0%)    | 1/69 (1,4%)  | 1/70 (1,4%)  | 14/70 (20%)    |
| 1998                                   | 11/46 (23,9%)  | 1/46 (2,2%)   | 4/46 (8,7%)     | —            | —            | 3/46 (6,5%)    |
| 1995-1998                              | 54/230 (23,5%) | 13/230 (5,7%) | 30/232 (12,9%)  | 5/232 (2,1%) | 1/140 (0,7%) | 18/140 (12,9%) |
| IC 95%                                 | 18-29%         | 3-9,5%        | 8,6-17,2%       | 0,7-5%       | 0-4%         | 7,3-18,4%      |
| CMI <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) | > 32           |               |                 | 1,5          |              | 0,5            |

TABLA 3. Resistencia a metronidazol

|             | Resistente | Sensible    |
|-------------|------------|-------------|
| No tratados | 48 (23,3%) | 158 (76,7%) |
| Tratados    | 6 (54,5%)  | 5 (45,5%)   |

$p = 0,03$ .

TABLA 4. Resistencia a metronidazol por sexos

|                        | Resistente | Sensible    |
|------------------------|------------|-------------|
| Mujeres*               | 22 (31,9%) | 47 (68,1%)  |
| Varones*               | 32 (21,6%) | 116 (78,4%) |
| Mujeres: no tratadas** | 21 (30,9%) | 47 (69,1%)  |
| Varones: no tratados** | 27 (18,9%) | 116 (81,1%) |

\*p = NS; \*\*p = 0,077.

TABLA 5. Resistencia a claritromicina

|             | Resistente | Sensible    |
|-------------|------------|-------------|
| No tratados | 13 (7,1%)  | 169 (92,8%) |
| Tratados    | 14 (42,4%) | 19 (57,5%)  |

$p < 0,001$ .

Se han excluido 5 cepas con valores "intermedios" y 12 cepas de pacientes con tratamiento desconocido.

tratamiento con omeprazol, claritromicina y amoxicilina (OCA), una se aisló de un paciente que había recibido otra pauta y en las dos restantes los pacientes no habían sido tratados previamente. Una cepa, aislada de una paciente no tratada con pauta anti *H. pylori*, fue resistente a metronidazol, claritromicina y tetraciclina. Ninguna de las cepas estudiadas fue resistente a amoxicilina.

El porcentaje de cepas resistentes a uno o más de los antibióticos testados fue significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) en el grupo de pacientes que habían recibido tratamiento erradicador previo.

La resistencia a metronidazol fue significativamente más elevada ( $p = 0,03$ ) en los pacientes que habían sido tratados con este antibiótico respecto a los que no lo habían sido (tabla 3). La resistencia a metronidazol no variaba en ambos sexos, aunque existía una tendencia a la mayor resistencia en las pacientes cuando se excluía a las tratadas previamente (tabla 4).

La resistencia a claritromicina también se asoció de manera significativa a su utilización previa: el porcentaje de cepas resistentes fue de 7,1% en los pacientes que no la habían recibido frente al 45,5% de los ya tratados ( $p < 0,001$ ) (tabla 5).

La única cepa resistente a tetraciclina (CMI 2) fue también resistente a metronidazol y claritromicina. La paciente portadora no había recibido tratamiento erradicador, pero sí numerosas pautas antibióticas por infecciones urinarias recurrentes; respondió favorablemente a la pauta OCA. Las CMI consideradas intermedias a tetraciclina (0,5 y 1) se registraron en el 12,9% de las cepas. Los porcentajes de resistencia a tetraciclina no se han podido relacionar con la previa exposición a la misma, puesto que el número de pacientes en los que se ha utilizado es muy escaso.

## Discusión

Hasta la reciente publicación del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>3</sup> no se disponía de recomendaciones específicas para la determinación de la susceptibilidad antibiótica de *H. pylori*. Respecto a los diversos métodos para la práctica del antibiograma se ha discutido el efecto del inóculo<sup>4,5</sup>, la correlación de los diversos métodos<sup>6-9</sup> y el medio de cultivo más idóneo<sup>5</sup>; sólo parece haber consenso sobre el período de incubación, para el que se postula un mínimo de 72 h.

Se ha comunicado la aparición de cepas resistentes a la amoxicilina<sup>10,11</sup>. Sin embargo, tanto en nuestra serie como en otras similares<sup>12-14</sup>, la CMI<sub>90</sub> a la amoxicilina está muy por debajo de la definida para cepas resistentes.

La resistencia global a metronidazol fue del 23,5% en nuestra serie, siendo similar a la reportada por López et al<sup>12</sup> para cepas aisladas durante los dos primeros años de nuestro estudio. La gran variabilidad del porcentaje de resistencia a metronidazol (del 19,9% al 32,2%) de *H. pylori* que se comunica en la bibliografía<sup>12-18</sup> se ha atribuido a la heterogeneidad geográfica de las poblaciones estudiadas, la diversidad de las cepas y las diferencias metodológicas<sup>14,18</sup>.

Aunque existe un cierto grado de variabilidad en los porcentajes de resistencia a claritromicina reportados<sup>12-14,17,19</sup>, esta variabilidad no es tan grande como la publicada para el metronidazol. En las series consultadas, el 85% de las cepas, como mínimo, son sensibles. Según nuestros datos existe una fuerte asociación ( $p < 0,001$ ) entre la resistencia a claritromicina y el tratamiento previo con la misma. La resistencia decrece del 12,9 al 7,1% cuando se excluyen del estudio los pacientes que ya han sido tratados, coincidiendo con la experiencia de otros grupos<sup>15</sup>. Por otra parte, cuando se estudian sólo las cepas de los pacientes con exposición previa, la prevalencia de la resistencia es del 42,4%. Algunos autores<sup>13,20</sup> observan una tendencia al incremento de la resistencia a claritromicina durante el período estudiado, lo que atribuyen a la generalización de su uso; en nuestro estudio no se ha registrado esta tendencia. Datos obtenidos a partir de experiencias *in vitro* sugieren que dicha resistencia pudiera ser reversible<sup>11,21</sup>, lo que explicaría que los porcentajes de resistencia no fueran tan elevados como en el caso del metronidazol, a pesar del extendido uso de los macrólidos en ésta y otras enfermedades.

La resistencia a tetraciclina, aunque descrita, es infrecuente<sup>22</sup>. Nosotros hemos aislado tan sólo una cepa resistente, que lo era asimismo a metronidazol y claritromicina, en una paciente que no había recibido

tratamiento previo erradicador. La interpretación de los valores de CMI intermedios (12,9%), bien como predictores de resistencias futuras o como factores relacionados con eventuales fallos del tratamiento, es dudosa.

Se cuestiona la utilidad del antibiograma de *H. pylori*. En la gran mayoría de los casos, la enfermedad asociada a este microorganismo se trata de forma empírica y tanto metronidazol como claritromicina, en combinación con otros agentes, se utilizan dependiendo de los datos de sensibilidad que se dispongan en la población; el antibiograma se reserva para aquellos pacientes en los que haya fracasado el tratamiento<sup>3,11,14,18</sup>. Sin embargo, algunos estudios han concluido que el tratamiento basado en un antibiograma previo es más barato y efectivo<sup>23,24</sup> y, en cualquier caso, como se ha mencionado anteriormente, la prevalencia de cepas resistentes en un determinado entorno debe ser tenida en cuenta al elegir un tratamiento, como sugieren las diversas comunicaciones sobre variabilidad geográfica de la sensibilidad de *H. pylori*<sup>20,23</sup>. Por otra parte, se ha descrito una fuerte asociación entre fracaso de la erradicación y resistencia al metronidazol<sup>2,17,18,25</sup>, asociación que también empieza a encontrarse con claritromicina<sup>19,26,27</sup>. Nuestros datos indican que la utilización de metronidazol y claritromicina se asocia con la aparición de cepas resistentes a éstos. Todas estas consideraciones apoyan la necesidad del estudio sistemático de la sensibilidad antimicrobiana de *H. pylori* en aquellos pacientes en los que sea necesario realizar endoscopia para su diagnóstico, posibilitando así la obtención de muestra para cultivo<sup>27</sup>.

Sin embargo, la práctica sistemática de cultivo y antibiograma de *H. pylori* resulta, hoy por hoy, problemática. La principal dificultad estriba en la variable sensibilidad del cultivo<sup>28</sup>; por otra parte, la práctica añadida del antibiograma supone una demora de aproximadamente 10 días<sup>25</sup>. Se impone la optimización de las técnicas de cultivo, no sólo para asegurar un tratamiento individualizado, sino también para conocer mejor los mecanismos de resistencia y su correlación clínica. La NCCLS recomienda para la práctica del antibiograma la dilución en agar<sup>4</sup>, técnica que resulta menos práctica que la de E-test en los laboratorios clínicos; ambos métodos deben correlacionarse<sup>6,29</sup>. Adicionalmente, para obtener una perspectiva más amplia, se necesitan estudios que permitan identificar qué variables (sexo<sup>2</sup>, tipo de patología gástrica<sup>14,15</sup>, antibioterapia previa<sup>18,26</sup>, uso de omeprazol<sup>17</sup>) influyen en la respuesta al tratamiento erradicador.

## Bibliografía

1. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;1(8336):1273-5.
2. Lerang F, Moun B, Ragnhildsvéit E, Sandvei PK, Tolas P, Whist JE, et al. Simplified 10-day bismuth triple therapy for cure of *Helicobacter pylori* infection: Experience from clinical practice in a population with a high frequency of metronidazole resistance. Am J Gastroenterol 1998;93:212-6.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement M100-S9 (1999). NCCLS, Wayne, P.A.

4. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. The E test for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1993;31: 65-71.
5. Hartvig Hartzen S, Percival Andersen L, Bremmelgaard A, Colding H, Arpi M, Kristiansen J, et al. Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: Importance of medium, inoculum and incubation time. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2634-9.
6. Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M. Discrepancies between E-Test and agar dilution methods for testing metronidazole susceptibility of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1998;36:1165-6.
7. Piccolimini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Carbone, F, Neri M. 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.
8. Iovene MR, Romano M, Pilloni AP, Giordano B, Montella F, Caliendo S, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in eighty clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy* 1999;45:8-14.
9. Chaves S, Gadinho M, Tenreiro R, Cabrita J. Assessment of metronidazole susceptibility in *Helicobacter pylori*: Statistical validation and error rate analysis of breakpoints determined with the disk diffusion test. *J Clin Microbiol* 1999;37:1628-31.
10. van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Thijss JC, Van der Wouden EJ, Gerrits MM, Kusters JG. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998;352:1595.
11. Dore MP, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepulveda AR. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:47-54.
12. López Bartolomé O, Morán Vasallo A, Ramírez Armengol JA, Picazo de la Garza JJ. Diagnóstico microbiológico de *Helicobacter pylori* y su resistencia a los antimicrobianos. *Rev Clin Esp* 1998;198:420-3.
13. Lopez-Brea M, Domingo D, Sanchez I, Alarcon T. Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:279-81.
14. Wolle K, Nilius M, Leodolter A, Müller WA, Malfertheiner P, König W. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to several antimicrobial agents in a region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:519-21.
15. Xia H, Buckley M, Keane CT, O'Morain CA. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: Prevalence in untreated dyspeptic patients and stability *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:473-81.
16. European Study Group on Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a multicentre European survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clinical Microbiol Infect Dis* 1992;11: 777-81.
17. Loo GV, Fallone CA, De Souza E, Lavallée J, Barkun AN. In-vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:881-3.
18. Gisbert JP, Boixeda D, Rafael L de, Redondo C, Martín de Argila C, Bermejo, F. ¿De qué factores depende el éxito de la triple terapia "clásica" en la erradicación de *Helicobacter pylori*? *Rev Esp Enferm Dig* 1996;88:317-22.
19. Gotoh A, Kawakami Y, Akahane T, Akamatsu T, Shimizu T, Kiyosawa K, et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates against agents commonly administered for eradication therapy and the efficacy of chemotherapy. *Microbiol Immunol* 1997;41:7-12.
20. Glupezynski Y, Goutier S, Van der Borre C, Butzler JP, Burette, A. Surveillance of *Helicobacter pylori* resistance to antimicrobial agents in Belgium from 1989 to 1994. *Gut* 1995;37(Suppl 1):A56.
21. Sörberg M, Hanberger H, Nilsson M, Bjorkman A, Lennart NE. Risk of development of in vitro resistance to amoxicillin, clarithromycin, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1222-8.
22. Midolo PD, Korman MG, Turnidge JD, Lambert JR. *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline. *Lancet* 1996;347:1194-5.
23. de Boer W A, Tytgat GNJ. How to treat *Helicobacter pylori* infection - should treatment strategies be based on testing bacterial susceptibility? A personal viewpoint. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:709-16.
24. Breuer T, Graham DY. Costs of diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection: When does choosing the treatment regimen based on susceptibility testing become cost effective? *Am J Gastroenterol* 1999;94:725-9.
25. Ching CK, Leung KP, Yung RWH, Lam SK, Wong BCY, Lai KC, Lai CL. Prevalence of metronidazole resistant *Helicobacter pylori* strains among Chinese peptic ulcer disease patients and normal controls in Hong Kong. *Gut* 1996;38:675-8.
26. Xia, HX, Buckley M, Hyde D, Keane CT, O'Morain CA. Effects of antibiotic resistance on clarithromycin combined triple therapy for *Helicobacter pylori*. *Gut* 1995;37(Suppl 1):55.
27. Gisbert JP, Pajares JM. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol y a la claritromicina en España. Una revisión sistemática. *Med Clin (Barc)* 2001;116:111-6.
28. Williams CL. *Helicobacter pylori*: Bacteriology and laboratory diagnosis. *J Infect* 1997;34:1-5.
29. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer 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.