

## 국내에서 분리된 *Helicobacter pylori* 균주의 metronidazole 내성과 *rdxA* 유전자 변이 연관성 분석

김경숙<sup>1</sup>, 강정옥<sup>2</sup>, 한동수<sup>3</sup>, 진송자<sup>4</sup>, 최태열<sup>2</sup>

생명공학 연구소 코아시스템 (주)<sup>1</sup>, 한양대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>2</sup>,  
내과학교실<sup>3</sup>, 서산의료원 진단검사의학과<sup>4</sup>

### Association between Mutation of *rdxA* Gene and Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates from Korea

Kyung Suk Kim<sup>1</sup>, Jung Oak Kang<sup>2</sup>, Dong Soo Han<sup>3</sup>, Song-ja Chin<sup>4</sup>, and Tae Yeal Choi<sup>2</sup>

Bioengineering Institute, CoreStem Inc.<sup>1</sup>, Department of Laboratory Medicine<sup>2</sup>, and Internal Medicine<sup>3</sup>,  
College of Medicine, Hanyang University, Seoul, and Department of Laboratory Medicine, Seosan Hospital, Korea<sup>4</sup>

**Background :** For the treatment of peptic ulcer diseases infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), amoxicillin, clarithromycin, and metronidazole are most commonly used. Recently the resistant rates against these antibiotics have been increased and this has become one of the major causes of treatment failure. It was recently demonstrated that metronidazole resistance is associated with mutation in *rdxA* gene that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. The aim of this study was to investigate the mutations of the *rdxA* gene for the metronidazole-resistant *H. pylori* isolates from Guri City, Korea.

**Methods :** *H. pylori* strains were isolated from gastric biopsy specimens from patients diagnosed as having peptic ulcer or gastric carcinoma in Hanyang University Guri Hospital. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the modified broth microdilution method. Resistance was defined as metronidazole minimum inhibitory concentration (MIC) being more than 16 ug/mL Three metronidazole-sensitive and 10 metronidazole-resistant strains were selected to detect mutations in the *rdxA* genes by direct sequencing of PCR products.

**Results :** Of the 266 clinical isolates of *H. pylori* that were isolated from 1996 through 2001, 90 isolates (33.8%) showed metronidazole resistance. The frequency of nucleotide substitutions of the *rdxA* gene of 10 metronidazole-resistant strains (25-33/strain) was not so different from that of the three metronidazole-sensitive strains (22-26/strain). Stop signals generated by nucleotide substitution, insertion, or deletion, were found in 5 metronidazole-resistant strains (50%), but not in 3 metronidazole-susceptible strains.

**Conclusion :** The present study confirms that the presence of mutations on the *rdxA* gene causing a premature stopping of the inferred RdxA protein is associated with metronidazole resistance. But other genes or mechanisms might be implicated in the generation of metronidazole resistance and further investigations are needed. (*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(1)77-83)

**Key words :** *Helicobacter pylori*, Metronidazole, Resistance, RdxA gene

접수번호 : CM7-1-5

교신저자 : 강정옥

(471-701) 경기도 구리시 교문동 249-1

한양대학교 구리병원 진단검사의학과

TEL : 031) 560 - 2572 FAX : 031) 560 - 2585

E-mail : jokang@hanyang.ac.kr

서 론

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 감염을 치료하기 위한 병  
합요법에 가장 흔히 사용되고 있는 항균제는 clarithromy-

cin, amoxicillin, metronidazole이며, 이 세 가지 약제 중 amoxicillin 내성균은 드물기 때문에 metronidazole과 clarithromycin에 대한 시험관 내 감수성 검사가 중요하다. Houben 등[1]은 1984년부터 1998년까지 발표된 *H. pylori* 병합요법에 관한 문헌을 모두 검색하여 분석한 결과, metronidazole 내성균인 경우 삼제요법의 효과가 50% 감소하였고, clarithromycin 내성균의 경우 56-58% 감소하였다고 보고하였다. 그러므로 항균제 치료를 시작하기 전에 항균제 감수성검사를 시행하여 감수성이 있는 약제를 선택하는 것이 바람직하며, 정기적으로 *H. pylori* 항균제 내성률을 조사, 분석하여 각 나라마다 적절한 병합요법 약제를 선택해야 할 것이다.

Metronidazole은 nitroheterocyclic 복합제 [1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole]로 *H. pylori* 이외에 *Bacteroides* species, *Clostridium* species, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* 등에 의한 감염 치료에 사용되는 약제이다[2]. Goodwin 등은 *H. pylori*의 oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase 활성 감소가 metronidazole에 대한 내성에 관련이 있다고 보고하였다[3]. 이 효소는 균 내로 흡수된 metronidazole을 세포독성을 가진 중간 산물로 전환시키는 작용을 하며, 이 효소를 만드는 *rdxA* (*H. pylori* genome database HP0954) 유전자의 돌연변이에 의해 효소가 불활성화 되면 metronidazole에 대한 내성을 유발할 것이라는 가설을 제시하였다. 그러나 metronidazole에 대한 내성기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으며 상기한 기전 이외에 여러 다른 기전도 존재하는 것으로 보고 되고 있다[2, 4-10].

이 연구에서는 국내에서 분리 배양된 *H. pylori* 균주들을 대상으로 metronidazole에 대한 내성기전을 밝히기 위하여, 감수성 및 내성인 균주를 대상으로 *rdxA* 유전자의 염기서열을 분석하여 유의한 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. *H. pylori*의 배양 및 분리

한양대학교 구리병원 소화기 내과에서 1996년부터 2001년까지 위내시경 검사를 받은 환자들에서 채취한 위생검 조직을 수송배지 (phosphate buffered saline, PBS 용액)에 넣어 진단검사의학과 미생물 검사실로 즉시 가져온 후 멸균된 공이(micropestle)로 분쇄하여 5% 면양혈액 한천배지와 항균제 (vancomycin 10 ug/mL, cefsulodin 5 ug/mL, trimethoprim 5 ug/mL, amphotericin B 5 ug/mL)가 포함된 7% 말혈액한천 배지에 접종시켰다. 37°C, 고습도의 미호기성 조건 (CampyPak Plus, BBL, Cockeysville, USA)에서 3일 내지 6일간 배양시킨 후, *H. pylori* 균집락을 Gram 염색하여 특징적인 만곡형의 그람 음성간균을 확인하였고, urease, catalase, oxidase 검사를 시행하였다

[11]. 분리된 균주는 냉동보존용 배지 (Brain heart infusion broth, 15% glycerol)에 넣어서 -70 °C에 보관하였다.

### 2. 항균제 감수성검사

*H. pylori*로 확인되면 계대 배양을 실시하여 김 등[12]이 고안한 변법 액체배지 미량희석법(modified broth microdilution method)을 이용하여 *H. pylori*의 metronidazole 항균제에 대한 최소억제농도를 구하였다. 즉 brain heart infusion (BHI) 액체배지에 발색제인 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride를 40 ug/mL 가하여 *H. pylori* 성장으로 액체배지의 색이 변하여 육안으로 최소억제농도를 쉽게 판정할 수 있도록 하였다. BHI 액체배지를 160 uL 씩 96-well microplate의 각 well에 넣은 후, 배수희석 시킨 metronidazole (0.25-128 ug/mL)을 20 uL씩 가하였고, metronidazole은 0.25 ug/mL부터 128 ug/mL까지 배수로 농도를 희석하였다. 순수 계대 배양시킨 *H. pylori* 집락을 fetal bovine serum (FBS) 5%와 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 40 ug/mL가 든 BHI 액체 배지에 부유시켜 McFarland No. 2 (6x10<sup>8</sup> CFU/mL)에 맞춘 다음 20 uL씩 각 well에 가하였다. 미호기성 조건으로 37°C에서 3일간 배양시킨 후 최소억제농도를 판정하였다. *H. pylori*의 metronidazole에 대한 내성 판정은 최소억제농도 16 ug/mL 이상으로 정의하였다[13, 14]. 항균제 감수성검사의 정도관리를 위하여 *H. pylori* ATCC 43504를 사용하였다.

### 3. *H. pylori*의 *rdxA* 유전자의 변이 분석

#### 1) Polymerase chain reaction (PCR) amplification

1996년부터 2001년까지 한양대 구리병원에서 분리된 metronidazole에 감수성이었던 세 균주와 내성이었던 10 균주(최소억제농도가 16 ug/mL 이었던 4균주, 32 ug/mL 이었던 3균주, 64 ug/mL 이었던 3균주)를 순수 계대배양 시켰다. 배양된 균집락에서 InstaGene Matrix (Bio-Rad Lab, Hercules, CA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR은 1 µg의 *H. pylori* genomic DNA, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM 농도의 deoxynucleoside triphosphate mixture, 1 uM 농도의 primers, 그리고 2 U의 Taq DNA polymerase (MBI, USA)를 혼합하고 증류수를 첨가하여 총 부피가 50 uL가 되게 하였다. Primer는 GenBank accession number HP0954의 염기서열을 바탕으로 *rdxA* 유전자 전체가 포함되도록 제작하여 사용하였다. Primer L의 염기서열은 5' -ATG CCA CTC CTT GAA CTT TA-3' 이고, primer R은 5' -TGG TAA TTG TTT CGT TAG GGA-3' 로 PCR 산물의 크기는 762 bp 이다. PCR 반응은 DNA thermal cycler 2400 (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 94°C 에서 10분간 전변성(predenaturation), 94°C 에서 30초간 변

성(denaturation), 52°C 에서 30초간 결합(annealing), 72°C 에서 30초간 연장반응(extension)을 35회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 반응 산물은 2% agarose gel에서 100V 전압에 30분 동안 전기영동 한 후 자외선 하에서 DNA 분획을 확인하였고, PCR 산물의 크기를 확인하기 위하여 100 bp ladder size marker (MBI, USA)를 검체와 함께 loading하였다.

## 2) Sequencing

Agarose gel DNA extraction kit (Roche, Germany)을 사용하여 PCR 산물을 순수 정제한 후, PCR 반응에 사용했던 primers를 가지고, ABI PRISM 377XL과 ABI 3100 DNA analyzer system (Perkin-Elmer) 및 sequencing kit (Perkin-Elmer)를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

## 3) 염기서열 자료분석

미국 NIH ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov))와 영국 European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk))에서 제공하는 프로그램들을 이용하여 염기서열들을 분석하였다.

## 결 과

1996년부터 2001년 까지 한양대학교 구리병원에서 분리 동정한 *H. pylori* 266 균주들 중 metronidazole에 내성을 보인 균주는 90 균주로 33.8%의 내성률을 나타내었다. 분석에 이용된 metronidazole 내성 10 균주들의 *rdxA* 유전자 내 변이를 HP0954 (published sequence of *H. pylori* 26695 complete genome, GenBank accession number AE000604) 유전자의 염기서열과 비교한 결과, r-5 (MIC 64 ug/mL) 균주에서는 27개의 염기치환과 3개의 염기소실이 관찰되었으며, 아미노산 188번째 위치에 stop codon이 관찰되었다. r-7 (MIC 64 ug/mL)균주에서는 33개의 염기치환으로 10개의 아미노산 치환이, r-41 (MIC 64 ug/mL)에서는 27개의 염기 치환 및 8개의 염기소실, 그리고 1개의 염기 첨가로, 159개의 아미노산 치환과 22개의 아미노산 소실, 1개의 아미노산 첨가가 관찰되었으며, 아미노산 189번째 위치에 stop codon이 있었다. r-m3 (MIC 32 ug/mL)에서는 29개의 염기치환과 1개의 염기 첨가로, 92개의 아미노산 치환과 5개의 아미노산 소실이 있었으며, 아미노산 201번째 위치에 stop codon이 있었다. r-m5 (MIC 32 ug/mL)에서는 30개의 염기치환으로 10개의 아미노산 치환이 관찰되었으며, 아미노산 201번째 위치에 stop codon이 있었다. r-m6 (MIC 32 ug/mL)에서는 29개의 염기치환으로 9개의 아미노산 치환, 1개의 아미노산 소실이 있었고, r-m7 (MIC 16 ug/mL)에서는 33개의 염기치환으로 5개의 아미노산 치환이 있었으며, 아미노산 67번째 위치에 stop codon이 있었다. r-m9 (MIC 16 ug/mL)에서는 26개의 염기 치환 및 5개의 아미노산 치환이, r-18 (MIC 16 ug/mL)에서는 28개의 염기 치환 및 9개의 아미노산 치환이, 그리

고 r-14 (MIC 16 ug/mL)에서는 25개의 염기 치환 및 9개의 아미노산 치환이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

대조군으로 사용한 metronidazole에 감수성인 세 균주들에 대한 *rdxA* 유전자 변이는 다음과 같았다. r-m8 (MIC 8 ug/mL) 균주에서는 26개의 염기치환 및 9개의 아미노산 치환이 있었고, r-12 (MIC 4 ug/mL)에는 22개의 염기 치환 및 6개의 아미노산 치환, 그리고 r-28 (MIC 4 ug/mL)에는 26개의 염기치환과 핵산 505 위치에 84 bp 크기의 염기 첨가로 11개 아미노산 치환과 28개의 아미노산 첨가가 있었다. 이들 감수성인 균주들 중에서는 stop codon을 생기게 하는 nonsense 변이는 발견되지 않았다.

*H. pylori* 13 균주들에서 각 균주 당 *rdxA* 유전자 내 약 20-30개 염기치환에 의한 missense 변이가 가장 많이 발견되었고, 감수성인 균주들과 내성인 균주들간의 염기치환의 빈도는 유사하였다. Metronidazole 내성 10 균주들 중 5 균주(50%)에서 핵산의 치환, 소실 및 첨가의 변이로 인한 stop codon이 관찰되었다.

## 고 찰

*H. pylori* 감염이 위십이지장 질환의 발생에 중요 원인 인자로 인식되면서 치료 향상을 위한 연구가 계속적으로 진행되고 있다. *H. pylori* 감염 치료 시 clarithromycin은 가장 널리 사용되는 약제이나 단독으로 사용 시에는 제균 효과가 작을 뿐 아니라, 내성 발생의 경우 치료 실패 가능성이 있어 metronidazole이나 amoxicillin 등 다른 항균제와의 병합요법을 시용함으로써 치료 성공률을 90% 이상으로 향상시킬 수 있다[15].

*H. pylori* 균주의 항균제에 대한 내성률은 국가나 지역에 따라 다양한 양상을 보이고 있는데, 현재까지 대부분의 *H. pylori* 균주들은 amoxicillin에 감수성을 보이고 있는 반면, clarithromycin에 대해서는 1-13%의 균주들에서, metronidazole에 대해서는 20-70%의 내성률이 보고되고 있다[13, 16-19]. 국가별 *H. pylori*의 metronidazole에 대한 내성률을 살펴보면, 독일이나 네델란드를 포함한 유럽과 미국의 경우는 17%-30% 가량의 내성률을 보이고, 우리나라의 경우 metronidazole에 대한 *H. pylori* 균주의 내성률은 50% 가량 되고 있다.[12, 20]. 또한 *H. pylori* 균주들은 국가나 분리된 지역에 따라 다양한 유전자형이 분포한다. 북미, 남미, 아프리카에서 분리된 *H. pylori* 균주들은 유럽의 균주들과 유사하지만, 아시아에서 분리된 균주들과는 차이가 있다[21-23]. 따라서 우리나라에서 분리된 균주를 대상으로 항균제 내성 기전의 특징을 밝히고, 보다 간편한 항균제 내성 검사법이 개발되면 적당한 치료 약제의 신속한 선택이 이루어져 효과적인 치료 및 항균제 내성 발생의 방지에 도움을 줄 수 있을 것이다.

세균 내에서 metronidazole이 항균 작용을 하기 위해서는 metronidazole 내 nitro group의 환원에 의해 독성의 중간산물이 생성되어야 하고 이러한 작용은 표적세포의 산

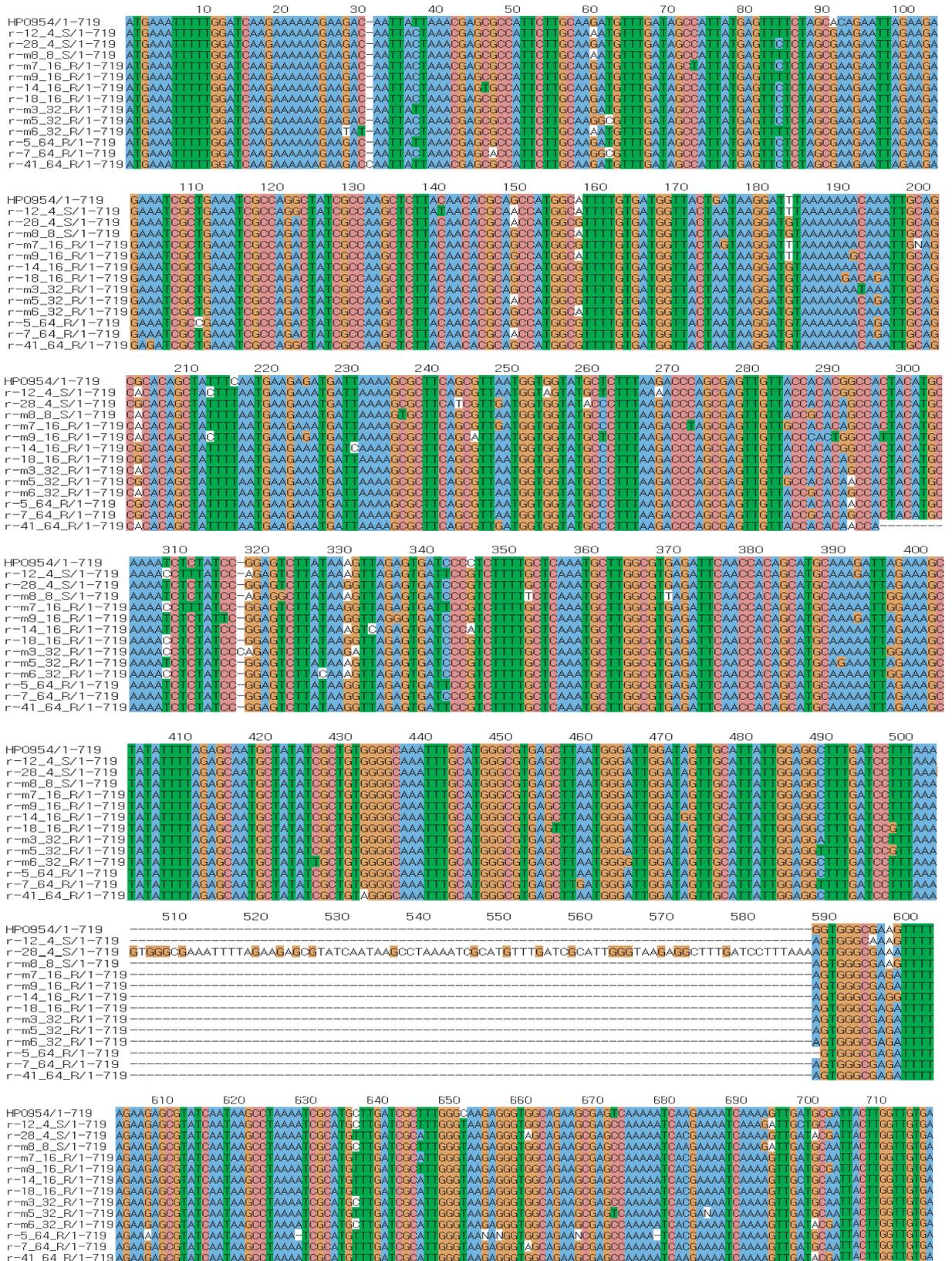


Fig. 1. Multiple alignment of the *rdxA* gene nucleotide sequences for 13 of *H. pylori* strains. The MICs of MTZ (ug/mL) are illustrated following the first underline of the strain name. R, resistant; S, sensitive.

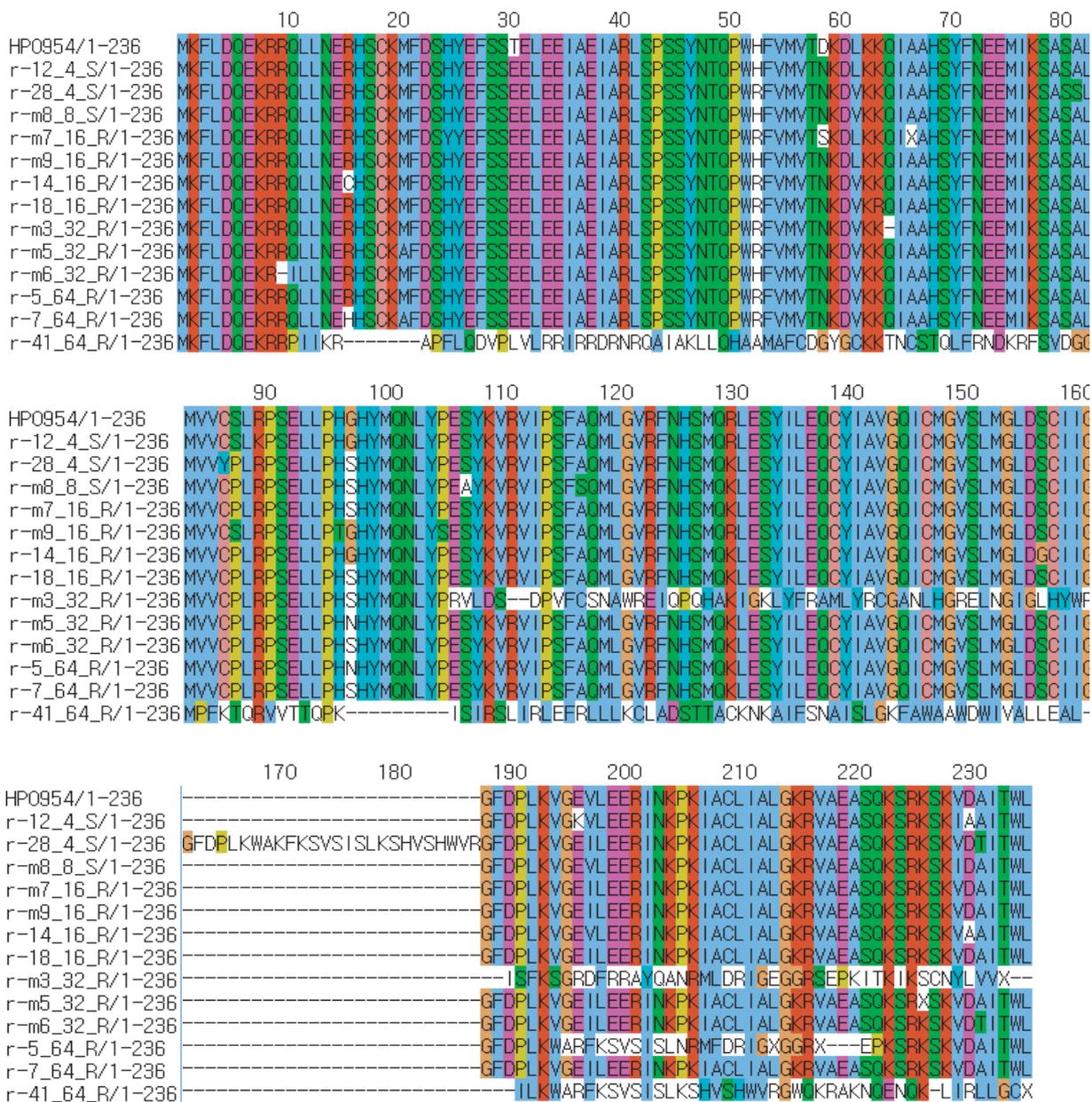


Fig. 2. Multiple alignment of the *rdxA* gene amino acid sequences for of 13 *H. pylori* strains. The MICs of MTZ (ug/mL) are illustrated following the first underline of the strain name. The x means the stop signal.

화환원 체계에 의해 조절된다. *H. pylori*의 실험실 배양 시 미호기성 조건을 이용하지만 인체 내에서 metronidazole의 작용 기전은 혐기성 세균의 경우와 유사하다[4, 24]. Metronidazole nitroreductase로 추정되는 단백질들에는 ferredoxin (FdxA), flavodoxin (FldA), ferredoxin-like proteins (FdxB, OorDABC, and PorCDAB), NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA), 그리고 oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase(RdxA) 등이 있다[25]. Metronidazole 내성 기전에 관해서 제시되고 있는 몇 가지 가설들에는 catalase

혹은 superoxide dismutase의 변형으로 독성을 띤 oxygen radicals 제거의 증가에 의한 내성의 획득[2, 4, 5], 보다 효율적인 DNA 손상 회복에 의한 내성 획득 가능성[6, 7], 그리고 치명적인 reductase 기능의 손실[8]에 의한 내성 획득 가능성들이 있다. 최근 *H. pylori*의 metronidazole에 대한 내성 기전에 관해 가장 의의 있는 가설은 Goodwin등 [3]이 보고한 것으로, oxygen-insensitive NADPH nitroreductase를 코딩하는 *rdxA* (HP0954, complete genome sequence of strain 26695) 유전자의 nonsense 변이로 인해서

진사 과정에서 불완전한 단백질 합성되어 nitroreductase의 불활성화로 내성이 유발된다는 이론이다.

이 연구의 결과에서 metronidazole 감수성 세균주에서는 stop codon을 유발하는 nonsense 변이는 관찰되지 않았고, metronidazole 내성 10 균주들 중 다섯 균주에서만 핵산의 치환, 소실 및 첨가의 변이로 인한 *rdx A* 유전자 내 stop 신호가 관찰되어, metronidazole에 대한 내성기전에 *rdx A* 유전자 변이가 연관됨을 알 수 있었다. 그러나 나머지 metronidazole 내성 5 균주에서는 감수성인 세균주와 마찬가지로 다양한 염기치환, 염기소실 및 첨가 등의 변이가 관찰되었으나, 표현형과 연관 지을 수 있는 특징적 변이는 발견할 수 없었고, 이러한 결과는 Solca 등[26]의 보고와 유사하다.

한편 Debets-Ossenkopp등[27]은 metronidazole 내성인 *H. pylori* NCTC11637 균주에서 *rdx A* 유전자 내 mini-IS605 유전자 (novel transposable element)의 삽입으로 *rdx A* 유전자의 많은 부분이 소실되어 nitroreductase 효소의 활성이 감소되는 기전을 보고하였다. 이번 연구에서 대조군으로 사용한 r-28균주는 *rdxA* 유전자에 26개의 염기치환이 있었고 특이하게도 505번째 nucleotide에 84 bp의 염기 첨가가 있었으나 metronidazole에 감수성이었으므로, 염기첨가보다는 stop codon 생성여부가 내성 유발에 더 중요함을 알 수 있었다. 또한 최근 *rdx A* 유전자 변이 이외의 다른 metronidazole nitroreductase로 추정되는 단백질질을 코딩하는 유전자의 변이들이 metronidazole 내성 유발에 관여한다는 연구 보고들이 발표되고 있다[9, 10, 21]. 따라서 보다 많은 국내 분리 균주들을 대상으로 metronidazole 내성 기전에 관한 다양한 연구가 필요하다고 사료된다.

한양대학교 구리병원에서 분리된 metronidazole 내성 *H. pylori* 균주의 50%에서 *rdx A* 유전자 내 stop 신호가 생겨나는 염기 변이와 관련이 있으며, 또한 *rdx A* 유전자 변이 외에 다른 유전자들의 변이가 metronidazole 내성 유발과 연관성이 있을 것으로 사료되었다.

## 요 약

**배 경** : *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)가 검출되는 소화성 궤양의 치료에 항균제 병합요법의 사용이 권장되고 있으며, 가장 흔히 사용되고 있는 항균제는 clarithromycin, amoxicillin, metronidazole 등이다. 최근 이들 항균제에 대한 내성 균주들이 증가하고 있으며, 이러한 항균제 내성은 치료 실패의 중요한 원인이 되고 있다. 이 연구에서는 국내에서 분리 배양된 *H. pylori* 균주들을 대상으로 metronidazole에 대한 내성 양상과 내성 기전을 밝히기 위하여 oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase를 코딩하는 *rdx A* 유전자 변이를 분석하였다.

**방 법** : 위염, 소화성 궤양, 위암 등으로 한양대학교 구리병원을 방문하여 위생검을 실시한 환자의 조직에서

배양 분리된 *H. pylori* 균주들을 대상으로 액체배지 미량희석법을 이용하여 metronidazole에 대한 항생제감수성 검사를 실시하였다. *H. pylori*의 metronidazole 내성을 결정하는 최소 억제농도는 16 ug/mL 이상으로 하였다. *H. pylori*의 metronidazole에 감수성인 3 균주와 내성인 10 균주를 대상으로 genomic DNA를 추출하고, 630bp 크기의 *rdx A* 유전자가 포함되도록 제작된 primer를 사용하여 PCR-direct sequencing법으로 *rdx A* 유전자 변이를 분석하였다.

**결 과** : 1996년부터 2001년까지 한양대학교 구리병원에서 분리 동정한 *H. pylori* 266 균주들 중 metronidazole에 내성을 보인 균주는 90 균주로 33.8%의 내성률을 나타내었다. Metronidazole에 감수성인 세균주와 내성인 10 균주들의 *rdx A* 유전자 분석에서 각 균주 당 약 20-30개 염기치환에 의한 missense 변이가 가장 많이 발견되었고, 감수성인 균주들과 내성인 균주들 간의 염기치환 빈도는 유사하였다. Metronidazole 감수성이었던 세 균주에서는 stop codon을 생성하게 하는 nonsense 변이는 관찰되지 않았으나, metronidazole 내성이었던 10 균주들 중 5 균주에서 핵산의 치환, 소실 및 첨가의 변이로 인한 stop codon이 관찰되었다.

**결 론** : 한양대학교 구리병원에서 분리된 metronidazole 내성 *H. pylori*의 50%에서 *rdxA* 유전자 내 stop 신호가 생겨나는 염기 변이가 관찰되어, 국내 분리주에서도 *rdxA* 유전자 변이가 중요한 내성 기전임을 확인하였다. 그러나 *rdxA* 유전자 변이 외에 다른 유전자들의 변이나 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Houben MHMG, van de Beek D, Hensen EF, De Craen AJM, Rauws EAJ, Tytgat GNJ. A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy-the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1047-55.
2. Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:9-20.
3. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJO, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance 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.
4. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:115-20.
5. Smith MA and Edwards DI. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J Antimicrob*

- Chemother 1995;35:751-64.
6. Chang KC, Ho SW, Yang JC, Wang JT. Isolation of a genetic locus associated with metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:785-8.
  7. Thompson SA and Blaser MT. Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. Infect Immun 1995;63:2185-93.
  8. Hoffman PS, Goodwin A, Johnsen J, Magee K, Veldhuyzen van Zanten SJO. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. J Bacteriol 1996;178:4822-9.
  9. Kwon DH, Kato M, El-Zaatari FA, Osato MS, Graham DY. Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. FEMS Microbiol Lett 2000; 188:197-202.
  10. Kwon DH, El-Zaatari FA, Kato M, Osato MS, Reddy R, Yamaoka Y, et al. Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*FrxA*) and ferredoxin-like protein(*FdxB*) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2133-42.
  11. 김신경, 김은숙, 박일규, 강정옥, 최태열. *Helicobacter pylori* 감염의 진단방법 및 배양배지에 관한 연구. 대한임상병리학회지 1997;17:1060-7.
  12. 김은숙, 강정옥, 한동수, 박필환, 박일규, 최태열. *Helicobacter pylori*의 항균제 감수성검사를 위한 변법 액체배지 희석법, E test, 디스크 확산법의 비교. 대한임상병리학회지 1998;18:559-64.
  13. Adamek RJ, Suerbaum S, Pfaffenbach B, Opferkuch W. Primary and acquired *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin, metronidazole, and amoxicillin-influence on treatment outcome. Am J Gastroenterol 1998; 93:386-9.
  14. NCCLS document M7-A5. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 10th informational supplement (Aerobic dilution). NCCLS document M100-S10, wayne, pa:2000:20;39
  15. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Megraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2724-8.
  16. Megraud F, Stuart H, Glupczynski Y. Antibiotic Susceptibility and resistance. In: Mobley HLT, Mendz GL, and Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. Washington, DC: ASM press, 2001; 511-30.
  17. O' Morain C and Montague S. Challenges to therapy in the future. Helicobacter 2000; 5(suppl 1):S23-S26.
  18. vanZwet AA, de Boer WA, Schneeberger PM, Weel J, Jansz AR, Thijs JC. Prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in the Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15:861-4.
  19. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. J Korean Med Sci 2002;17:599-603.
  20. Kim JJ, Reddy R, Lee M, Kim JG, El-Zaatari FAK, Osato MS, et al. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother 2001;47:459-61.
  21. Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidienė 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.
  22. Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B, Su WW, Pan ZJ, Garcia C, et al. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. J Bacteriol 2000;182:3210-18.
  23. Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, et al. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. J Bacteriol 2000; 182:3219-27.
  24. Jorgensen MA, Manos J, Mendz GL, Hazell SL. The mode of action of metronidazole in *Helicobacter pylori*: futile cycling or reduction? J antimicrob Chemother 1998; 41:67-75.
  25. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997;388:539-47.
  26. Solca NM, Bernasconi MV, Piffaretti JC. Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: comparison of the *rdxA* gene sequence in 30 strains. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2207-10.
  27. Debets-Ossenkopp YJ, Pot RGJ, van Westerloo DJ, Goodwin A, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Berg DE, et al. Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductases (*rdxA*) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2657-62.