

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *N. GONORRHOEAE* К β -ЛАКТАМНЫМ АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ, ВКЛЮЧАЯ ЦЕФАЛОСПОРИНЫ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Герасимова Н.А., Евстигнеева Н.П., Зильберберг Н.В.

ГБУ СО «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Екатеринбург, e-mail: ngerasimova2010@gmail.com

Проведен анализ данных научной литературы о взаимосвязи мутаций: однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах PenA, PonA, PenB, MTRR, PilQ, blaTEM-1, FtsX, а также мозаичной структуры гена PenA с развитием устойчивости *N. gonorrhoeae* к β -лактамным антимикробным препаратам, в том числе современным действующим препаратам первой линии антимикробной монотерапии - цефалоспорином широкого спектра действия. Применение молекулярно-генетических методов детекции мутаций резистентности имеет важное значение для усиления классического наблюдения за антимикробной резистентностью (АМР), особенно при низкой доступности культуральных методов. Изучение значимых генетических детерминант *N. gonorrhoeae*, с доказанным влиянием на развитие резистентности, важно для мониторинга резистентности в популяции клинических штаммов *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином широкого спектра действия.

Ключевые слова: *N. gonorrhoeae*, генетические детерминанты резистентности, цефалоспорины широкого спектра действия

MOLECULAR GENETIC DETERMINANTS OF RESISTANCE TO *N. GONORRHOEAE* β -LACTAM ANTIMICROBIALS, INCLUDING CEPHALOSPORINS BROAD-SPECTRUM

Gerasimova N.A., Evstigneeva N.P., Zilberberg N.V.

¹Ural Scientific Research Institute of Dermatology and Immunopathology, Ekaterinburg, e-mail: ngerasimova2010@gmail.com

The analysis of the scientific literature on the relationship of mutations: single-nucleotide polymorphisms (SNP) in genes PenA, PonA, PenB, MTRR, PilQ, blaTEM-1, FtsX, and the mosaic PenA gene structure with the development of resistance to *N. gonorrhoeae* β -lactam antimicrobials, including modern existing drugs first-line antimicrobial monotherapy - cephalosporins broad-spectrum. The use of molecular genetic methods for the detection of resistance mutations is important for strengthening the classic surveillance of antimicrobial resistance (AMR), especially in low accessibility of cultural methods. Study important genetic determinant of *N. gonorrhoeae*, with proven impact on the development of resistance is important for monitoring resistance in a population of clinical strains of *N. gonorrhoeae* to extended-spectrum cephalosporins.

Keywords: *N. gonorrhoeae*, genetic determinants of resistance, extended-spectrum cephalosporins

Гонококковая инфекция является проблемой общественного здравоохранения в глобальном масштабе в связи с широким распространением [49], патогенным влиянием, частым субклиническим течением, развившейся устойчивостью ко всем антимикробным препаратам (АМП), рекомендованным ранее для эмпирической монотерапии первой линии, включая цефалоспорины широкого спектра действия (ESCs, extended-spectrum cephalosporins) [3; 4; 34; 39; 42]. Основными средствами управления гонококковой инфекцией на сегодняшний день остаются эффективная диагностика, лечение и профилактика. Обновленные современные европейские рекомендации по диагностике и лечению гонококковой инфекции у взрослых (2012) [38], подготовленные по поручению Европейского отделения Международного союза по борьбе с инфекциями, передаваемыми половым путем (IUSTI-Europe), Европейской

академии дерматологии и венерологии (EADV); Европейского форума дерматологии (EDF); Союза европейских медицинских специалистов (UEMS); Европейского центра по контролю и профилактике заболеваний (ECDC) и Европейского бюро ВОЗ (WHO-Europe), содержат расширенные показания для обследования на *N. gonorrhoeae*, рекомендации антибактериальной терапии неосложненной инфекции с неизвестной чувствительностью двумя АМП (цефтриаксон 500 мг и азитромицин 2 г). Важны определение и информирование о случаях неудач рекомендованной схемы лечения, идентификация и проверка резистентных штаммов *N. gonorrhoeae*, поскольку недолеченная инфекция имеет решающее значение в распространении цефалоспорин-резистентных и полирезистентных штаммов *N. gonorrhoeae*. Для эффективного выявления и контроля излеченности, в том числе резистентных штаммов *N. gonorrhoeae*, необходима оптимизация диагностики. В настоящее время все шире применяются возможности молекулярно-биологических методов (широкий спектр клинического материала, некультивируемые образцы (моча), высокая чувствительность, специфичность [3; 12; 13; 15; 17; 44; 48]. Важное значение для усиления наблюдения за антимикробной резистентностью гонококковой инфекции, особенно при низкой доступности определения фенотипических проявлений резистентности, имеют генотипирование, анализ детерминант антимикробной резистентности *N. gonorrhoeae* [6; 41]. Механизмы устойчивости гонококков к АМП полностью не изучены, но накоплены сведения о генетических мутациях, влияющих на повышение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и, как следствие, на устойчивость к АМП [1; 27; 35; 45; 48].

Пенициллины и цефалоспорины (β -лактамы АМП) ингибируют образование сшивков пептидогликана в клеточной стенке бактерий путем связывания β -лактаминового кольца с пенициллин-связывающим белком - ферментом транспептидазой или РВР (Penicillin-binding proteins), что приводит к бактерицидной активности АМП [35]. В составе клеточной стенки *N. gonorrhoeae* выделены три основных пенициллин-связывающих белка: РВР₁ (молекулярная масса - 87000), РВР₂ (59000), РВР₃ (44000). В формировании устойчивости *N. gonorrhoeae* к β -лактамам АМП в большей степени участвует РВР₂ [3]. Значимость мутаций определяется близостью к активным сайтам фермента, влиянием на вторичную и третичную структуру при сохранении активности фермента и, как следствие, снижением сродства транспептидазы к АМП [40; 45-47]. Мутации в консервативных участках гена PenA уменьшают восприимчивость к пенициллину в 6-8 раз; наиболее значима – инсерция аспартата Asp345a. Мутации, расположенные на С-терминальном конце транспептидазы F504L, A510V(T), A516G, P551S(L) в различных комбинациях, осуществляют молекулярный механизм уменьшения скорости связывания АМП, препятствуют конформационным

изменениям белка РВР₂ [31; 45; 47]. Детерминанты резистентности *N. gonorrhoeae* к β-лактамам АМП представлены в таблице.

Детерминанты резистентности *N. gonorrhoeae* к β-лактамам антибиотикам

Гены	Белок/ механизм	Влияние на МИК	
		Пенициллины	Цефалоспорины
Pen A Немозаичные аллели	РВР ₂ /снижение восприимчивости к АМП	Вставка Asp345 и 4-8 сопутствующие мутации карбоксильной области РВР ₂ увеличивают МИК в 6-8 раз	SNP A501V(T) G542S, P551S(L) увеличивают МИК
Pen A Мозаичные аллели	РВР ₂ /снижение восприимчивости к АМП	До 70 изменений аминокислот (АК) увеличивают МИК	До70 изменений АК A311V, I312M, V316T(P), T483S, A501P(V), N512Y G545S увеличивают МИК
PonA	РВР ₁ /снижение восприимчивости пенициллина	SNP L421P/ увеличивает МИК в 3-4 раза	Большинство штаммов имеют мутацию L421P, на МИК не влияет
mtrR	Эффлюксный насос MtrCDE/ повышение оттока АМП из клетки	G45D увеличивает МИК	Увеличивает МИК
PenB	PogB ₁ b/ снижение притока АМП	SNP G120K(D)/A121D; фенотип PenB проявляется только у штаммов с MTRR	SNP G120K(D)/A121D; фенотип PenB проявляется только у штаммов с MTRR
PilQ	Порообразующий секретин/уменьшение притока АМП	SNP E666K обнаружен только в лабораторных условиях	На МИК не влияет
FtsX	Мало изучен/ увеличение МИК АМП	Увеличивает МИК в 3-6 раз	Увеличивает МИК
blaTEM -1 blaTEM-135 плазмиды	Фермент β-лактамаза/ гидролиз β-лактамого кольца пенициллинов	Устойчивость	На МИК не влияет

Устойчивость к цефалоспорином связана с мозаичными генами PenA, которые возникли в естественных условиях от синантропных видов *Neisseria* путем горизонтального переноса фрагментов или целых генов PenA [5; 11; 12; 18; 20; 28; 33; 35; 36; 43]. Мутации G545S, I312M, V316T в белке РВР₂ ограниченно влияют на МИК цефалоспоринов, но повышают устойчивость при наличии дополнительных мутаций в мозаике PenA аллели, используя механизм эпистаза, подавления других неаллельных генов [36; 43]. Для штаммов *N. gonorrhoeae* с широкой лекарственной устойчивостью подтверждено влияние мутаций A311V, V316P, T483S в РВР₂ [37]; а также мутации A501P [8; 41].

PonA₁ аллель, которая кодирует мутацию Leu421Pro в белке РВР₁, снижает скорость связывания пенициллина в 3-4 раза по сравнению с диким типом PonA [32]. Универсальной детерминантой устойчивости к АМП являются мутации в гене mtrR (multiple transferrable resistance Regulator), приводящие к избыточной экспрессии системы эффлюкса, увеличению экспорта из клетки АМП [10; 22; 24; 41; 43; 50]. Вся система оттока работает только в сочетании со снижением проницаемости канала PogB₁b наружной мембраны [19; 24; 25; 28; 43; 50]. Мутация E666K в гене PilQ в сочетании с изменениями в генах PenA, mtrR, и PenB

повышает устойчивость к пенициллину [16]. Неизвестная детерминанта фактор X (ftsX) может увеличивать МИК пенициллина в 3-6 раз [24; 36; 43] и влиять на МИК цефалоспоринов [50]. Штаммы *N. gonorrhoeae*, обладающие высоким уровнем устойчивости к пенициллину, содержат плазмиды с геном *blaTEM-1*, который кодирует фермент β -лактамазу, переводя АМП в неактивное состояние [21]. Опасность появления β -лактамаз широкого спектра действия, учитывая скорость распространения плазмидных детерминант устойчивости, ограничивается относительной консервативностью генетического материала плазмид. Однако всего один однонуклеотидный полиморфизм может привести к способности ферментов гидролизовать цефалоспорины, как, например, SNP в аллели гена *blaTEM-135*, дополнительно увеличивает МИК ампициллина [21; 23]. Для граммотрицательных бактерий описаны более 170 разновидностей β -лактамаз широкого спектра действия [29; 31; 32]. У штаммов, развивших в лабораторных условиях устойчивость к цефтриаксону, была зафиксирована перекрестная резистентность к пенициллину и цефуроксиму; выявлена повышенная скорость метаболизма (оттока) за счет избыточной экспрессии генов, кодирующих АВС-транспортеры FarB, Tfq, Hfq и ExbB, снижение импорта веществ за счет подавления генов pilM, pilN и pilQ, а также дефекты приспособленности - медленный рост колоний [14].

Изучение значимых генетических детерминант *N. gonorrhoeae*, с доказанным влиянием на развитие резистентности, и поиск новых мутаций важны как для научных исследований, так для эпидемиологического надзора и мониторинга резистентности в популяции клинических штаммов *N. gonorrhoeae* к АМП [2; 15; 45].

Список литературы

1. Кожушная О.С., Васильева Е.Л., Фриго Н.В., Соломка В.С. Механизмы формирования устойчивости *Neisseria gonorrhoeae* к цефалоспорином // Вестн. дерматол. - 2012. - № 5. - С. 44-51.
2. Лесная И.Н., Соломка В.С., Фриго Н.В., Кубанов А.А., Полевщикова С.А., Сидоренко С.В. Выбор препаратов для лечения гонококковой инфекции на основании результатов мониторинга антибиотикорезистентности *N. Gonorrhoeae* // Вестн. дерматол. - 2010. - № 5. - С. 65-73.
3. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных гонококковой инфекцией // Российское общество дерматовенерологов и косметологов. - 2015. – С. 19.
4. Allen V.G., Farrell D.J., Rebbapragada A., Tan J., Tijet N., Perusini S.J., Towns L., Lo S., Low D.E., Melano R.G. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance Mechanisms in *Neisseria*

gonorrhoeae Isolates from Ontario, Canada // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. - V. 55, № 2. – P. 703–712.

5. Ameyama S., Onodera S., Takahata M., Minami S., Maki N., Endo K., Goto H., Suzuki H., Oishi Y. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (penA) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2002. - V. 46, № 12. – P. 3744–3749.

6. Barbour A.G. Properties of penicillin-binding proteins in *Neisseria gonorrhoeae*.// *Antimicrob Agents Chemother.* – 1981. - V. 19, № 2. – P. 316–322.

7. Bignell C., Unemo M., European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults // *International Journal of STD & AIDS.* – 2013. - V. 24, № 2. - P. 85-92.

8. Cámara J., Serra J., Ayats J., Bastida T., Carnicer-Pont D., Andreu A., Ardanuy C. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2012. - V. 67, № 8. - P. 1858–1860.

9. Chen S-C., Yin Y-P., Dai X-Q., Unemo M., Chen X-S. First nationwide study regarding ceftriaxone resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in China // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. - V. 71, № 1. – P. 92-99.

10. Folster J.P., Johnson P.J., Jackson L., Dhulipali V., Dyer D.W., Shafer W.M. MtrR modulates rpoH expression and levels of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* // *J. Bacteriol.* - 2009. - V. 191, № 1. - P. 287–297.

11. Furuya R., Onoye Y., Kanayama A., Saika T., Iyoda T., Tatewaki M., Matsuzaki K., Kobayashi I., Tanaka M. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population // *J. Infect. Chemother.* - 2007. – V. 13, № 5. - P. 302–304.

12. Goire N., Lahra M.M., Chen M., Donovan B., Fairley C.K., Guy R., Kaldor J., Regan D., Ward J., Nissen M.D., Sloots T.P., Whiley D.M. Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2014. - V. 12, № 3. – P. 223-229.

13. Goire N., Ohnishi M., Limnios A.E., Lahra M.M., Lambert S.B., Nimmo G.R., Nissen M.D., Sloots T.P., Whiley D.M. Enhanced gonococcal antimicrobial surveillance in the era of ceftriaxone resistance: a real-time PCR assay for direct detection of the *Neisseria gonorrhoeae* H041 strain // *Oxford Journals Medicine & Health. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* - 2011. - V. 67, № 4. - P. 902-905.

14. Gong Z., Laia W., Liub M., Huac Z., Sund Y., Xua Q., Xiaa Y., Zhaoa Y., Xie X. Novel Genes Related to Ceftriaxone Resistance Found among Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strains // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. - V. 60, № 4. – P. 2043-2051.

15. Graham R.M.A., Doyle C.J., Jennison A.V. Epidemiological typing of *Neisseria gonorrhoeae* and detection of markers associated with antimicrobial resistance directly from urine samples using next generation sequencing // *Sex. Transm. Infect.* – 2016. - URL: <http://sti.bmj.com/content/early/2016/03/11/sextrans-2015-052422.abstract> (дата обращения: 25.03.2016).
16. Helm R.A., Barnhart M.M., Seifert H.S. PilQ missense mutations have diverse effects on PilQ multimer formation, piliation, and pilus function in *Neisseria gonorrhoeae* // *J. Bacteriol.* - 2007. - V. 189, № 8. – P. 3198–3207.
17. Hemarajata P., Yanga S., Sogeb O.O., Humphries R.M., Klausner J.D. Performance and Verification of a Real-Time PCR Assay Targeting the *gyrA* Gene for Prediction of Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* // *J. Clin. Microbiol.* – 2016. - V. 54, № 3. - P. 805-808.
18. Ito M., Deguchi T., Mizutani K.S., Yasuda M., Yokoi S., Ito S., Takahashi Y., Ishihara S., Kawamura Y., Ezaki T. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in central Japan // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2005. - V. 49, № 1. - P. 137–143.
19. Lee S.G., Lee H., Jeong S.H., Yong D., Chung G.T., Lee Y.S., Chong Y., Lee K. Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *ponA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2010. - V. 65, № 4. – P. 669–675.
20. Lindberg R., Fredlund H., Nicholas R., Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA* // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2007. - V. 51, № 6. – P. 2117–2122.
21. Muhammad I., Golparian D., Dillon J.A., Johansson A., Ohnishi M., Sethi S., Chen S.C., Nakayama S., Sundqvist M., Bala M., Unemo M. Characterisation of *bla*_{TEM} genes and types of β -lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* - the prevalent and conserved *bla*_{TEM}-135 has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin // *BMC Infect Dis.* – 2014. – V. 22, № 14. – P. 454.
22. Ohneck E.A., Zalucki Y.M., Johnson P.J., Dhulipala V., Golparian D., Unemo M., Jerse A.E., Shafer W.M. A novel mechanism of high-level, broad-spectrum antibiotic resistance caused by a single base pair change in *Neisseria gonorrhoeae* // *mBio.* - 2011. - V. 2, № 5. - URL: <http://mbio.asm.org/content/2/5/e00187-11.full> (дата обращения: 27.03.2016).
23. Ohnishi M., Ono E., Shimuta K., Watanabe H., Okamura N. Identification of TEM-135 β -Lactamase in Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae* Strains in Japan // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. - V. 54, № 7. – P. 3021–3023.

24. Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K., Saika T., Hoshina S., Iwasaku K., Nakayama S., Kitawaki J., Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2011. - V. 55, № 7. - P. 3538–3545.
25. Olesky M., Hobbs M., Nicholas R.A. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae* // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2002. - V. 46, № 9. - P. 2811–2820.
26. Olesky M., Zhao S., Rosenberg R.L., Nicholas R.A. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations // *J. Bacteriol.* - 2006. - V. 188, № 7. - P. 2300–2308.
27. Opal S.M., Medeiros A.A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell G.L., Bennett J.E. and Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* - 6th ed. Philadelphia, PA; Elsevier Churchill, Livingstone Inc. – 2005. - V. 1. - P. 253-270.
28. Osaka K., Takakura T., Narukawa K., Takahata M., Endo K., Kiyota H., Onodera S. Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone // *J. Infect. Chemother.* - 2008. - V. 14. - P. 195–203.
29. Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Mohapatra S., Casellas J.M., Goossens H., et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections // *Ann. Intern. Med.* – 2004. - V. 140, № 1. - P. 26–32.
30. Pitout J.D., Laupland K.B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern // *Lancet. Infect. Dis.* - 2008. - V. 8, № 3. - P. 159–66.
31. Powell A.J., Tomberg J., Deacon A.M., Nicholas R.A., Davies C. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance // *J. Biol. Chem.* - 2009. - V. 284, № 2. - P. 1202-1212.
32. Ropp P.A., Hu M., Olesky M., Nicholas R.A. Mutations in ponA, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, penC, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2002. - V. 46, № 3. - P. 769–777.
33. Saika T., Nishiyama T., Kanayama A., Kobayashi I., Nakayama H., Tanaka M., Naito S. Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from the genital tract and pharynx of two gonorrhea patients // *J. Infect. Chemother.* - 2001. - V. 7, № 3. - P. 175–179.

34. Tapsall J.W., Ndowa F., Lewis D.A., Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* - 2009. - V. 7, № 7. - P. 821–834.
35. Thakur S.D., Levett P. N., Horsman G.B., Dillon J.R. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Saskatchewan, Canada: utility of NG-MAST in predicting antimicrobial susceptibility regionally // *Sex. Transm. Infect.* – 2014. - V. 90, №4. - P. 297-302.
36. Tomberg J., Unemo M., Davies C., Nicholas R.A. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations // *Biochemistry.* - 2010. - V. 49, № 37. – P. 8062–8070.
37. Tomberg J., Unemo M., Ohnishi M., Davies C., Nicholas R.A. Identification of the amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the *penA* gene from the *Neisseria gonorrhoeae* strain H041 // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2013. - V. 57, № 7. – P. 3029–3036.
38. Unemo M., on behalf of the European STI Guidelines Editorial Board. The «2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults» Recommends dual antimicrobial therapy. *Eurosurveillance*, 2012. - V. 17, № 47. - P. 22.
39. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge // *BMC Infectious Diseases.* – 2015. - V. 15. – P. 364.
40. Unemo M., Dillon J.A. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2011. - V. 24, №3. – P. 447–458.
41. Unemo M., Golparian D., Nicholas R., Ohnishi M., Gallay A., Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. - V. 56, № 3. – P. 1273–1280.
42. Unemo M., Ison C.A., Cole M., Spiteri G., van de Laar M., Khotenashvili L. Gonorrhoea and gonococcal antimicrobial resistance surveillance networks in the WHO European Region, including the independent countries of the former Soviet Union // *Sex Transm Infect.* - 2013. - V. 89, № 4. - P. 42-46.
43. Unemo M., Nicholas R.A. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea // *Future Microbiol.* - 2012. - V. 7, № 12. - P. 1401–1422.
44. Unemo M., Olcén P., Fredlund H., Thulin S. Real-time PCR and subsequent pyrosequencing for screening of *pen A* mosaic alleles and prediction of reduced susceptibility to expanded-spectrum

cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* // Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS). – 2008. - V. 116, № 11. - P. 1004–1008.

45. Unemo M., Shafer W.M. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future // Clin Microbiol Rev. – 2014. - V. 27, № 3. – P. 587–613.

46. Unemo M., Shafer W.M. Future treatment of gonorrhoea - novel emerging drugs are essential and in progress? // Expert Opin Emerg Drugs. – 2015. - V. 20, № 3. – P. 357–360.

47. Whiley D.M., Goire N., Lambert S.B., Ray S., Limnios E.A., Nissen M.D., Sloots T.P., Tapsall J.W. Reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* is associated with mutations G542S, P551S and P551L in the gonococcal penicillin-binding protein 2 // J. Antimicrob. Chemother. - 2010. - V. 65, № 8. – P. 1615–1618.

48. Whiley D.M., Goire N., Rahimi F., Lahra M.M., Limnios A.E., Nissen M.D., Sloots T.P. Real-time PCR genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using 14 informative single nucleotide polymorphisms on gonococcal housekeeping genes // J Antimicrob Chemother. – 2013. - V. 68, № 2. – P. 322–328.

49. World Health Organization. Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections - 2008. – Geneva : World Health Organization, 2012.

50. Zhao S., Duncan M., Tomberg J., Davies C., Unemo M., Nicholas R.A. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae* // Antimicrob. Agents Chemother. - 2009. - V. 53, № 9. - P. 3744–3751.