Transformacja genów oporności *gyrA*, *parC* na fluorochinolony u *Neisseria gonorrhoeae*

Transformation of fluoroquinolone-resistance *Neisseria gonorrhoeae* *gyrA* and *parC* genes

Szymon Walter de Walthoffen

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska
Department of Medical Microbiology, Medical University of Warsaw, Poland

N. gonorrhoeae, jako czynnik etiologiczny wywołujący jedną z najczęstszych chorób przenoszonych drogą płciową, wytworzyła wiele mechanizmów oporności, co związane jest z ewolucją bakterii. Naturalna transformacja jest podstawowym sposobem poziomego transferu genów u bakterii z rodzaju *Neisseria*, który może doprowadzić do mutacji w genie *gyrA* kodującym gyrazę DNA. Celem pracy było zweryfikowanie poglądu na temat istotności mutacji w pozycji 91 oraz 95 białka *gyrA* na wrażliwość bakterii *N. gonorrhoeae* na antybiotyki z rodzaju chinolonów. Gen *gyrA* wprowadzony na drodze sztucznej transformacji do wrażliwego na ciprofloksacynę szczepu biorcy (MIC=0,003 mg/L) posiadał identyczną sekwencję aminokwasową w regionie 91-95 z sekwencją szczepu dawcy (MIC>32 mg/L) przy jednoczesnej zmianie wartości MIC (0,125 mg/L).

Słowa kluczowe: *Neisseria gonorrhoeae*, genetic transformation, fluoroquinolones, resistance

ABSTRACT

Introduction: *N. gonorrhoeae* is one of the etiological causative agents of one of the most common sexually transmitted diseases. Gonococci has created many resistance mechanisms, which is associated with bacterial evolution. Natural transformation is the basic method of horizontal gene transfer in bacteria of the genus *Neisseria*, which can lead to a mutation in the *gyrA* gene encoding DNA gyrase. The aim of the study was to verify the view on the significance of mutations at positions 91 and 95 of the *gyrA* protein on the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to antibiotics of the quinolone type.

Methods: *GyrA* gene was introduced into an sensitive isolate of *N. gonorrhoeae* using genetic transformation. Resistance gene donor, recipient and transform strains were tested

for susceptibility and the *gyrA* gene was sequenced.

Results: It has been shown that double mutation in amino acid sequence of the GyrA protein at positions 91 and 95 increase the value of MIC from 0,003 mg / L to 0,125 mg / L at CIP sensitive *N. gonorrhoeae* strain.

Conclusions: Mutations in the amino acid sequence at positions 91 and 95 affect the strain's sensitivity to ciprofloxacin, but it is not the only mechanism which could alter the MIC value of quinolones.

Słowa kluczowe: *Neisseria gonorrhoeae*, transformacja genetyczna, fluorochinolony, oporność

WSTĘP

Neisseria gonorrhoeae, jest czynnikiem wywołującym rzeżączkę, jedną z najczęstszych zakażeń/chorób przenoszonych drogą płciową (sexually transmitted infections – STI/ sexually transmitted diseases - STD) na świecie. Każdego roku odnotowuje się prawie 80 milionów przypadków STI/STD (17, 20, 22). Chociaż zakażenie dwóinką rzeżączki rzadko kończy się śmiercią, stanowi poważny problem zdrowia publicznego na całym świecie. W porównaniu do mężczyzn, kobiety częściej narażone są na problematyczne zakażenia z powodu wyższego odsetka infekcji przewlekłych. Wynika to z faktu, że zakażenie układu moczowo-płciowego jest początkowo bezobjawowe u ponad 50% kobiet i tylko u 10% mężczyzn, co uniemożliwia postawienie właściwej diagnozy, a tym samym wdrożenie odpowiedniego leczenia. Powikłania obejmują uszkodzenie górnych dróg rodnych, tj.: zapalenia narządów miednicy mniejszej u kobiet lub rzadziej, zapalenie najądrza u mężczyzn, co może prowadzić do problemów z płodnością, a nawet w rezultacie do bezpłodności (21).

Według WHO patogeny mogą rozwinąć oporność na niektóre antybiotyki w ciągu dwóch lat od ich wprowadzenia do leczenia. Zjawisko to udowodniono również w przypadku szczepów *N. gonorrhoeae*. Bakterie te mogą unikać działania przeciwdrobnoustrojowego leków takich jak: sulfonamidy, penicyliny, tetracykliny, makrolidy, fluorochinolony i cefalosporyny. Dlatego też WHO wskazuje na potrzebę zmian w leczeniu i zapobieganiu zakażeniom wywołanym przez *N. gonorrhoeae* poprzez monitorowanie zmian oporności u tych bakterii, ograniczenie stosowania powszechnego stosowania antybiotyków, jak również na potrzebę intensywnych poszukiwań nowych leków i szczepionek (8, 12).

N. gonorrhoeae wytworzyła wiele mechanizmów oporności, co związane jest z ewolucją bakterii na wprowadzone do terapii rzeżączki antybiotyki. Głównym czynnikiem wymiany genetycznej wpływającym na zmienność genetyczną u gonokoków jest transformacja genetyczna (16). Istnieje zróżnicowany zestaw ponad 80 zidentyfikowanych naturalnie transformowalnych gatunków bakterii, które są w stanie rozpoznać wolne DNA w środowisku, pobrać przez otoczkę i włączyć fragment egzogenego DNA do własnego genomu na drodze rekombinacji (10). Komórka, u której doszło do wprowadzenia materiału genetycznego przez proces transformacji zwana jest transformantem. Gatunki bakterii zdolne do naturalnej transformacji natywnego DNA, w większości przypadków są w stanie tzw. kompetencji, umożliwiającej pobranie fragmentów DNA ze środowiska

zewnętrznego w określonych warunkach wzrostu. *Neisseria* jest bakterią konstytutywnie (zawsze) kompetentną, zdolną do transformacji na wszystkich etapach wzrostu (4, 19). Naturalna transformacja jest podstawowym sposobem poziomego transferu genów (horizontal gene transfer - HGT) u *Neisseria* spp. z udokumentowanym przepływem informacji genetycznej między gatunkami komensalnymi i patogennymi z tego rodzaju (11, 18). HGT niesie ryzyko zagrożenia dla stabilności genomu oraz funkcjonowania komórki. Bakterie wypracowały na drodze ewolucji strategie kontroli pobierania i stabilizacji transformowalnego DNA takie jak: system indukcji stanu kompetencji komórki przez mechanizm komunikacji między komórkami bakterii uczestniczącymi w regulacji ekspresji genów - quorum sensing, system modyfikacji DNA przez enzymy restrykcyjne oraz strategie kontroli stopnia homologii DNA poprzez system rekombinacji homologicznej (2). W transformowanym DNA *Neisseria gonorrhoeae* rozpoznawane są sekwencje tzw. DUS (DNA uptake sequence - sekwencje pobierania DNA), które stanowią sekwencje 10-zasadową (GCCGTCTGAA), obecną często w chromosomie gatunków z rodzaju *Neisseria* (9). DUS znajduje się zazwyczaj w chromosomie *N. gonorrhoeae* i innych gatunków *Neisseria* spp. w dwóch egzemplarzach jako odwrócone powtórzenie. Plazmidy stosowane do transformacji *N. gonorrhoeae* muszą również zawierać DUS, aby mogły być skutecznie pobierane (6).

Pod koniec ubiegłego stulecia ciprofloksacyna była lekiem tzw. pierwszego rzutu w leczeniu rzeżączki na całym świecie. Niestety gonokoki wykształciły oporność na antybiotyki z grupy chinolonów, która jest obecnie powszechna także wśród innych gatunków bakterii (5). Ciprofloksacyna posiada działanie bakteriobójcze, wiąże się z niezbędnymi do replikacji DNA, bakteryjnymi enzymami docelowymi: gyrazą DNA i topoizomerazą IV, uniemożliwiając ich prawidłowe działanie. Główne mechanizmy oporności na ten antybiotyk to zmiany w enzymach docelowych, nadekspresja układów wypompowania wielolekowego (pompy efflux), ochrona i zmniejszone przepuszczalność błony komórkowej bakterii dla ciprofloksacyny. Gyraza DNA składa się z dwóch podjednostek białka GyrA i dwóch podjednostek GyrB. Istnieje wiele doniesień o korelacji między mutacjami w genie *gyrA* w pozycji 91 i 95 sekwencji aminokwasowej, a opornością na ciprofloksacynę u *N. gonorrhoeae*. Ponadto, tylko kilka zgłoszonych szczepów opornych na ciprofloksacynę nie posiadało zmian w regionie determinującym oporność na chinolony w genie *gyrA*. Wcześniej badano rolę mutacji genu *gyrB*, ale nie stwierdzono zmian w tym genie u 25 wysoce opornych szczepach *N. gonorrhoeae*. Topoizomeraza IV ma wysoki stopień homologii podobieństwa sekwencji aminokwasowej z gyrazą DNA i składa się z dwóch podjednostek ParC i dwóch podjednostek ParE. Istnieje wiele doniesień o korelacji między opornością na ciprofloksacynę a współistnieniem mutacji w podjednostce GyrA, GyrB oraz mutacji prowadzących do substytucji Pro439 → Ser w białku ParE (13, 14). Celem pracy było zweryfikowanie poglądu na temat istotności mutacji w obrębie pozycji 91 oraz 95 sekwencji aminokwasowej białka GyrA na wrażliwość bakterii *N. gonorrhoeae* na antybiotyki z rodzaju chinolonów, wprowadzając zmiany poprzez transformację genetyczną.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Szczepy *Neisseria gonorrhoeae* hodowano na podłożu agar czekoladowy PolyVitex VCAT3 (bioMerieux) i inkubowano w temperaturze 37°C w wilgotnym środowisku o stężeniu 5% CO₂ przez 24-48 godz. Identyfikację szczepów badanych *N. gonorrhoeae* przeprowadzono za pomocą kryteriów obejmujących test oksydazy i zdolność do rozkładu określonych cukrów oraz barwienia metodą Grama. W celu oznaczenia lekowrażliwości pojedyncze kolonie uzyskano poprzez posiew redukcyjny na podłożu agarowe Mueller Hinton Chocolate Agar (MHCA) (Becton Dickinson). Izolaty przechowywano w temperaturze -80° C przy użyciu systemu Microbank™ (Pro Lab Diagnostics). Szczepy dawcy i biorcy pochodziły z kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej.

Oznaczenie lekowrażliwości. Oznaczenie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii MIC dla ciprofloksacyny (0,002-32,0 mg/L) dla *N. gonorrhoeae* określono przy zastosowaniu pasków z gradientem stężeń antybiotyku - Etest™ (bioMerieux) na podłożu MHCH. Inokulum *N. gonorrhoeae*, stanowiące zawiesinę o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarland'a ustalano przez zawieszenie hodowli nocnej na podłożu MHCH w 0,9% soli fizjologicznej i pomiar przy użyciu densytometru. Inokulum posiewano za pomocą wymazówek na płytki zawierające podłożo MHCH, a następnie nanoszono E-test™. Szczep biorcy stanowił szczep wrażliwy na fluorochinolony, a szczep dawcy charakteryzował się wysoką opornością na ciprofloksacynę (tabela 1). Przy oznaczaniu wrażliwości na chinolony jako kontrolę zastosowano szczep wzorcowe *E. coli* ATTC 19424 i ATTC 49226.

Tabela 1. Wartości MIC dla ciprofloksacyny szczepów dawcy, biorcy oraz szczepów badanych.

Szczepy badane	CIP MIC (mg/L)
Dawca	>32
Biorca	0,003
ATTC 19424	0,002
ATTC 49226	0,002

CIP – ciprofloksacyna; MIC – minimalne stężenie hamujące

Transformacja genetyczna. Materiał genetyczny dawcy wyekstrahowano z 18 godz. hodowli bakteryjnej, prowadzonej na podłożu MHCH za pomocą metody lizy termicznej. Do izolacji materiału genetycznego wykorzystano zawiesinę w buforze TRIS o gęstości 2,0 McFarland'a w objętości 1ml komórek dawcy, następnie poddano ogrzewaniu w temperaturze 99°C przez 10minut, po czym schładzano w temperaturze -20°C przez 10 minut i wirowano 3 minuty przy 12 tysięcy obrotów na minutę. Supernatant z materiałem genetycznym dawcy inkubowano w równych proporcjach 1:1 z zawiesiną 1,0 McFarland'a szczepu biorcy i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Następnie 150 µl zawiesiny bakteryjnej szczepu biorcy po inkubacji z materiałem genetycznym szczepu dawcy, przenoszono i rozprowadzano na podłożu agar czekoladowy (Chocolate Agar Base BD Difco™ + Supplement B BD Difco™ + 5% krwi baraniej odwłóknionej Bio-

med Lublin) zawierające określone stężenie kwasu nalidyksowego (Sigma-Aldrich): 0,5 mg/L, 1 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L i 32 mg/L. Następnie inkubowano w temperaturze 37°C w obecności 5% CO₂ przez 24-48 godz. Tak przygotowane płytki z serjnym rozcieńczeniem kwasu nalidyksowego posłużyły również do określenia wartości MIC na ten antybiotyk dla badanych szczepów. Jako kontrole wysiewano materiał genetyczny dawcy na podłoże bez antybiotyku do weryfikacji powodzenia metody izolacji DNA. Reakcje PCR przeprowadzono dla genów *gyrA* i *parC*, a produkty amplifikacji sekwencjonowano, a następnie porównywano otrzymane sekwencje dawcy, biorcy oraz transformanta. Wyniki lekowrażliwości interpretowano zgodnie z zaleceniami EUCAST v 4.0, wg których wartość MIC dla ciprofloksacyny dla szczepu wrażliwego oraz opornego wynosi odpowiednio S ≤ 0.03 mg/L i R > 0.06 mg/L (7).

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) i sekwencjonowanie. Do badań molekularnych materiał genetyczny szczepów biorcy, dawcy oraz rekombinanta (transformanta) izolowano metodą kolumnkową za pomocą zestawu Genomic Mini - A&A Biotechnology zgodnie z protokołem producenta. PCR dla genu *gyrA* i *parC* przeprowadzono w 25 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej oddeczynniki (Thermo Scientific): 2,5 µl 10 x buforu *Taq* KCl PCR, 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl każdego z dwóch starterów (50 pM), 1,0 każdego z czterech trifosforanów deoksynukleozydów (25 mM), 0,1 µl 5 U/µl *Taq* DNA Polymerase i 16,4 µl sterylnej wody oraz 1,5 µl matrycowego DNA. Wykorzystano następujące startery dla genu *gyrA*: F-5'-GAT GTA TCA ATC CGC CAC G-3', R5'-AGC AGT TGA CGA GCA GTG TG-3' oraz dla genu *parC*: F5'GCCATGAGCGTGGTCAAAG-3 , i R-5'-ACCGTCCCCTGATTGATTC-3 ,. PCR genów *gyrA* i *parC* przeprowadzono w następujących warunkach: denaturacja 93° C przez 2 min, a następnie 35 cykli denaturacji w 93° C przez 45 sek., przyłączenie starterów w 54° C przez 55 sek. , elongacja w 72° C przez 60 sek, z końcowym wydłużeniem w 72° C przez 3 min. Otrzymane produkty PCR oczyszczono przed sekwencjonowaniem za pomocą metody EXO SAP (Thermo Scientific). Oczyszczone produkty poddano sekwencjonowaniu w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

WYNIKI

Szczep biorcy, jak również szczepy wzorcowe, wykazywały wrażliwość na ciprofloksacynę wg rekomendacji EUCAST z 01.01.2020 r., natomiast szczep dawcy oraz transformant były odporne na ciprofloksacynę. W przypadku kwasu nalidyksowego brak jest interpretacji EUCAST dot. lekowrażliwości bakterii *Neisseria* na ten antybiotyk (tabela 2). Analiza sekwencji nukleotydowych dawcy i biorcy dla genu *parC* wykazała, iż były identyczne (100% podobieństwa sekwencji nukleotydowej). Dla genu *gyrA* wydzielono region zmienny w sekwencji nukleotydowej od 270 do 285 par zasad. Region ten odpowiada za kodowanie pięciu aminokwasów w pozycji 91 i 95 dla białka GyrA. Zmiany w sekwencji aminokwasowej dla białka GyrA przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 2. Wrażliwość badanych szczepów dawcy, biorcy, transformanta oraz szczepów wzorcowych.

Szczep	CP MIC (mg/L)	Interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości na CIP	NA MIC (mg/L)
Dawca	>32	R	>32
Biorca	0,003	S	0,5
Transformant	0,125	R	16
ATTC 19424	0,002	S	0,5
ATTC 49226	0,002	S	0,5

CIP – ciprofloksacyna; Na - kwas nalidyksowy; MIC – minimalne stężenie hamujące; S – wrażliwy; R – oporny

Tabela 3. Zmienność w sekwencji nukleotydowej oraz aminokwasowej białka *gyrA* dla dwacy biorcy i transformanta *N. gonorrhoeae*

	Pozycja aminokwasu i sekwencja nukleotydowa w kodonie				
Szczep	91	92	93	94	95
Dawca	TTC	GCA	GTT	TAC	GGC
	Fenylalanina (Phe)	Alanina (Ala)	Walina (Val)	Tyrozyna (Tyr)	Glicyna (Gly)
Biorca	TCC	CCA	TTT	TAC	GAC
	Seryna (Ser)	Prolina (Pro)	Fenylalanina (Phe)	Tyrozyna (Tyr)	Kwas asparaginowy (Asp)
Transformant	TTC	GCA	GTT	TAC	GGC
	Fenylalanina (Phe)	Alanina (Ala)	Walina (Val)	Tyrozyna (Tyr)	Glicyna (Gly)

DYSKUSJA

Choć sekwencja nukleotydowa w genie *gyrA* wykazywała wysoką homologię u transformanta i u dawcy, to jednak wykazano znaczną różnicę w poziomie wrażliwości na chinolony. Oba szczepy wykazują oporność na ciprofloksacynę, aczkolwiek transformant wykazywał ośmiokrotnie mniejszą wartość MIC. Choć biorca miał znacznie niższą wartość MIC w porównaniu do dawcy, to jednak zgodnie z interpretacją EUCAST szczep wykazuje oporność na ten antybiotyk. Można zatem wnioskować, że odpowiednie mutacje w genie *gyrA* są wskaźnikiem oporności na ciprofloksacynę u *N. gonorrhoeae*. Do takiego samego wniosku doszli Lindbäck i wsp. wykorzystując metodę sekencjonowania szczepów opornych na ciprofloksacynę oraz Allan-Blitz i wsp. dokonując systematyczny przegląd badań porównujących wyniki badań różnymi metodami nad genem *gyrA* *N. go-*

norrhoeae. Autorzy metaanalizy oceniali czułość i swoistość odpowiednio 91,7% (95% CI 85,4% -95,5%) i 98,0% (95% CI 96,7% -98,8%) badań wykorzystujących metodę PCR w czasie rzeczywistym w celu określenia genotypu *gyrA* i oporności na cyprofloksacynę (1, 15) Lindbäck i wsp. Wykazali, iż mutacje w pozycji 95 sekwencji aminokwasowej białka GyrA w szczepie *N. gonorrhoeae* wrażliwego na cyprofloksacynę prowadzi do zwiększenia wartości MIC do 0,064 mg/L. Ponadto, dwie substytucje aminokwasowe w pozycji 91 i 95, prowadzą do wzrostu wartości MIC do 0,125–0,25 mg/L. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają tą tezę, gdyż również zaobserwowano mutację w pozycjach 91 i 95 sekwencji aminokwasowej gyrazy (15).

Porównanie sekwencji genu *gyrA* *N. gonorrhoeae* do sekwencji szczepu opornego opublikowanej przez Belland i wsp. (GenBank: U08817.1) wskazują, iż większe znaczenie dla wartości MIC dla chinolonów ma mutacja w pozycji 95 sekwencji aminokwasowej GyrA (tabela 4). Dodatkowo wykazano, iż gonokokowa sekwencja białka GyrA jest homologiczna do enzymu gyrazy występującego u *E. coli*; jest on jednak większy, gdyż zawiera kilka małych insercji w pobliżu O-końca przewidywanej otwartej ramki odczytu (3). Region w genie *gyrA*, w którym dochodzi do mutacji warunkującej oporność na chinolony jest specyficzny dla gatunku *N. gonorrhoeae* według analizy sekwencji w bazie BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). W badaniach Zhao i wsp., w analizie filogenetycznej genu *gyrA* z *N. meningitidis* w kontekście innych gatunków *Neisseria* wykazano, że ewolucja genu *gyrA* jest specyficzna dla *N. gonorrhoeae*. Analiza substytucji aminokwasów w białku GyrA wykazała, iż mutacja w pozycji 91 podj. GyrA, która odpowiada analogicznej mutacji w pozycji 83 białka GyrA u *E. coli* jest związana z fenotypem oporności na cyprofloksacynę (23).

Tabela 4. Porównanie sekwencji nukleotydowej oraz aminokwasowej białka GyrA dla dawcy, biorcy, transformanta oraz sekwencji umieszczonej w GenBank: nr. U08817.1 opornego szczepu *N. gonorrhoeae*

	Pozycja aminokwasu i sekwencja nukleotydowa w kodonie				
	91	92	93	94	95
Biorca	TCC	CCA	TTT	TAC	GAC
	Seryna (Ser)	Prolina (Pro)	Fenylalanina (Phe)	Tyrozyna (Tyr)	Kwas asparaginowy (Asp)
Dawca/ transformant	TTC	GCA	GTT	TAC	GGC
	Fenylalanina (Phe)	Alanina (Ala)	Walina (Val)	Tyrozyna (Tyr)	Glicyna (Gly)
GenBank: U08817.1	TCC	GCA	GTT	TAC	GAC
	Seryna (Ser)	Alanina (Ala)	Walina (Val)	Tyrozyna (Tyr)	Kwas asparaginowy (Asp)

WNIOSKI

N. gonorrhoeae ma ogromną zdolność do nabywania oporności na różne antybiotyki. Jednym z bardziej znaczących jest szybki wzrost oporności na ciprofloksacynę w ciągu ostatnich kilku lat. Niniejsze badanie wykazało, że mutacje w genie kodującym gyrazę DNA spowodowały znaczny wzrost MIC ciprofloksacyny ($> 0,125$ mg/L) w szczepie biorcy po transformacji genetycznej. Mutacje w sekwencji aminokwasowej w pozycji 91 oraz 95 mają wpływ na wrażliwość szczepu na ciprofloksacynę oraz mogą mieć znaczenie w określeniu poziomu oporności szczepu, lecz nie jest to jedyny mechanizmem wpływającym na wartość MIC antybiotyków z grupy chinolonów. Wykryte mutacje w genie *parC* nie miały istotnego wpływu na oporność gonokoków na ciprofloksacynę.

Badania sfinansowano z projektu naukowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 1M20/PM1/16/16 „Transformacja genów warunkujących oporność na fluorochinolony u *Neisseria gonorrhoeae*”

PIŚMIENNICTWO

1. Allan-Blitz LT, Wang X, Klausner JD. Wild-Type Gyrase A Genotype of *Neisseria gonorrhoeae* Predicts In Vitro Susceptibility to Ciprofloxacin: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Sex Transm Dis.* 2017; 44: 261-5.
2. Ambur OH, Davidsen T, Frye SA i inni. Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33: 453-70.
3. Belland R, Morrison S, Ison C, Huang W. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol.* 1994; 14: 371-80.
4. Biswas GD, Sox T, Blackman E, Sparling PF. Factors affecting genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1977; 129: 983-92.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Increases in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* among men who have sex with men-United States, 2003; and revised recommendations for gonorrhea treatment. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004; 53: 335-8.
6. Dillard JP. Genetic manipulation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr Protoc Microbiol* 2011; 23: 4A.2.1-4A.2.24.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 10, 2020. <http://www.eucast.org>.
8. Freire-Moran L, Aronsson B, Manz C i inni. ECDC-EMA Working Group. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - Time to react is now. *Drug Resist Updat.* 2011; 14: 118-24.
9. Hamilton HL, Dillard JP. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol.* 2006; 59: 376-85.
10. Johnston C, Martin B, Fichant G i inni. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12: 181-96.

11. Koomey M. Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: a model system for studies of horizontal gene transfer. APMIS Suppl. 1998; 84: 56-61.
12. Kubanov AA, Leinsoo AT, Chestkov AV i inni. Drug resistance mutations and susceptibility phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. Mol Biol. 2017; 51: 379-88.
13. Lindback E, Islam S, Unemo M i inni. Transformation of ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* *gyrA*, *pare* and *porB1b* genes. Int. J. Antimicrob Agents. 2006; 28: 206211.
14. Lindbäck E, Rahman M, Jalal S, Wretling B. Mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in quinolone-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. APMIS. 2002; 110: 651-7.
15. Lindbäck E, Gharizadeh B, Ataker F i inni. DNA gyrase gene in *Neisseria gonorrhoeae* as indicator for resistance to ciprofloxacin and species verification. Int J STD AIDS. 2005;16:142-7.
16. Rotman E, Seifert HS. The Genetics of *Neisseria* Species. Annu Rev Genet. 2014; 48: 405-31.
17. Sánchez-Busó L, Harris SR. Using genomics to understand antimicrobial resistance and transmission in *Neisseria gonorrhoeae*. Microb Genom. 2019; 5: e000239.
18. Sox TE, Mohammed W, Blackman E i inni. Conjugative plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. 1978; 134: 278-286.
19. Sparling PF. Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. J. Bacteriol. 1966; 92: 1364-71.
20. Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS i inni. Sexually transmitted infections: challenges ahead. Lancet Infect Dis. 2017; 17: 235-79.
21. Unemo M, del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st century. Microbiol Spectr. 2016; 4.
22. Wi T, Lahra MM, Ndowa F i inni. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: global surveillance and a call for international collaborative action. PLoS Med. 2017; 14: e1002344.
23. Zhao P, Xu L, Zhang A i inni. Evolutionary analysis of *gyrA* gene from *Neisseria meningitidis* bacterial strains of clonal complex 4821 collected in China between 1978 and 2016. BMC Microbiol. 2020; 20: 71.

Otrzymano: 14 V 2020

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. T. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM, szymon.walter@wum.edu.pl