

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-91-95

УДК 616.98:579.841.11

Д.Н. Лучинин, Д.В. Устинов, И.М. Шпак, Е.В. Молчанова

Полногеномное секвенирование и поиск детерминант формирования устойчивости к действию бензалкония хлорида у *Burkholderia pseudomallei*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Цель исследования – полногеномное секвенирование и сравнительный анализ исходного и резистентного к действию бензалкония хлорида штаммов *Burkholderia pseudomallei*. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы: *B. pseudomallei* 134, *B. pseudomallei* 134K, устойчивый к бензалкония хлориду. Полногеномное секвенирование производили на платформе MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle). Сборку геномов обоих штаммов проводили с помощью ассемблера SPAdes v3.11.1. Для сравнения последовательностей геномов исследуемых штаммов использовали программу Snippy v4.6.0. Для построения выравниваний нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли программный продукт MEGA X. **Результаты и обсуждение.** Поиск и анализ детерминант, которые могут быть ответственны за появление устойчивости к биоцидам у *B. pseudomallei* 134K, выявили два гена: ген транскрипционного репрессора TetR и ген эффлюксной помпы AmrAB-OprA. В регуляторе TetR обнаружен однонуклеотидный полиморфизм, что обусловило замену серина на пролин в мутантном белке и, как следствие, изменение его вторичной структуры. Предполагается, что данная мутация ведет к потере функции белка-регулятора, в результате чего увеличивается экспрессия регулируемых им генов эффлюксной помпы (AcrB/AcrD/AcrF), в связи с чем происходит как снижение уровня чувствительности к бензалкония хлориду, так и появление резистентности к цефтазидиму. В гене эффлюксной помпы AmrAB-OprA выявлена инсерция 16 нуклеотидов в положении 544-го участка оперона *amrA*, что повлекло за собой увеличение длины цистрона, сдвиг рамки считывания, изменение аминокислотного состава вторичной структуры кодируемого протеина. Вероятнее всего, данная мутация приводит к потере функции оперона *AmrAB-OprA* и невозможности нормального оттока ксенобиотиков из цитоплазмы микроорганизма. Данное предположение подтверждается тем фактом, что мутантный штамм утратил устойчивость к гентамицину.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, мелиоидоз, устойчивость, дезинфектант, полногеномное секвенирование.

Корреспондирующий автор: Лучинин Дмитрий Николаевич, e-mail: luchinin.dmitrii@yandex.ru.

Для цитирования: Лучинин Д.Н., Устинов Д.В., Шпак И.М., Молчанова Е.В. Полногеномное секвенирование и поиск детерминант формирования устойчивости к действию бензалкония хлорида у *Burkholderia pseudomallei*. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:91–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-91-95

Поступила 24.08.2023. Отправлена на доработку 31.08.2023. Принята к публ. 11.09.2023.

D.N. Luchinin, D.V. Ustinov, I.M. Shpak, E.V. Molchanova

Whole-Genome Sequencing and Search for Determinants of Resistance to Benzalkonium Chloride in *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to carry out whole-genome sequencing and comparative analysis of the original and benzalkonium chloride-resistant strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Materials and methods.** We used the strain *B. pseudomallei* 134 and resistant to benzalkonium chloride *B. pseudomallei* 134K. Whole-genome sequencing was conducted on the MiSeq Reagent Kit v3 platform (600-cycle). Genome assembly for both strains was performed with the help of SPAdes v3.11.1. In order to compare genome sequences of the studied strains, Snippy v4.6.0 software was applied. MEGA X program was used to align the nucleotide and amino acid sequences. **Results and discussion.** The search and analysis of determinants responsible for the emergence of resistance to biocides in *B. pseudomallei* 134K have revealed two genes: the TetR transcriptional repressor gene and the AmrAB-OprA efflux pump gene. A single nucleotide polymorphism has been found in the TetR regulator, which led to the replacement of serine by proline in the mutant protein, and, as a result, a change in its secondary structure. It is believed that this mutation causes the loss of regulatory protein functionality, resulting in an increased expression of the efflux pump genes (AcrB/AcrD/AcrF) regulated by it. This follows by both, decrease in the level of sensitivity to benzalkonium chloride and the emergence of resistance to ceftazidime. In the AmrAB-OprA efflux pump gene, an insertion of 16 nucleotides has been detected at the position 544 of the *amrA* operon, which led to an increase in the length of the cistron, a shift in the reading frame, a change in the amino acid composition, and, as a result, a change in the secondary structure of the encoded protein. It is most likely that this mutation contributes to the loss of *AmrAB-OprA* operon function and the failure of normal outflow of xenobiotics from the cytoplasm of the microorganism. This assumption is evidenced by the loss of resistance to gentamicin in the mutant strain.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, resistance, disinfectant, whole-genome sequencing.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Dmitry N. Luchinin, e-mail: luchinin.dmitrii@yandex.ru.

Citation: Luchinin D.N., Ustinov D.V., Shpak I.M., Molchanova E.V. Whole-Genome Sequencing and Search for Determinants of Resistance to Benzalkonium Chloride in *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:91–95. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-91-95

Received 24.08.2023. Revised 31.08.2023. Accepted 11.09.2023.

Luchinin D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6784-9648>
Ustinov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Shpak I.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>
Molchanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Мелиоидоз – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является микроорганизм *Burkholderia pseudomallei*. *B. pseudomallei* – представитель микрофлоры почвы и воды открытых водоемов на территориях Северной Австралии, стран Юго-Восточной Азии, Латинской Америки, островов Карибского архипелага [1–3]. Патоген обладает достаточно высоким уровнем резистентности к различным классам антибиотиков, таким как цефалоспорины I и II поколений, пенициллины, аминогликозиды, полимиксины. У *B. pseudomallei* описаны практически все известные механизмы, обуславливающие невосприимчивость к антибактериальным препаратам [4, 5]. Однако на данный момент накоплено мало информации о механизмах формирования устойчивости к дезинфицирующим и антисептическим средствам у возбудителя мелиоидоза и наличии у него генетических детерминант резистентности.

Сейчас на российском рынке представлено более 1300 дезинфекционных композиций, большая часть из которых содержит в своем составе в качестве активного вещества такое четвертично-аммонийное соединение (ЧАС), как алкилдиметилбензиламмония хлорид (бензалкония хлорид, АДБАХ, БХ) [6, 7]. Механизмом действия бензалкония хлорида является разрушение клеточной стенки и, как следствие, высвобождение клеточных компонентов, что в итоге приводит к гибели клетки [8, 9].

Изначально считалось, что формирование у микроорганизмов устойчивости к ЧАС невозможно. Однако начиная с 1950-х гг. неуклонно растет количество сообщений о микроорганизмах, обладающих устойчивостью к четвертично-аммонийным соединениям, в том числе и к АДБАХ [10–12]. В частности, рядом авторов показано, что вследствие нарушения правил дезинфекционной обработки препаратами на основе бензалкония хлорида у микроорганизмов может многократно, до 500 раз, возрастать степень устойчивости к данному дезинфекционному агенту [13, 14].

Ранее установлено, что возбудитель мелиоидоза способен развивать высокую степень устойчивости к БХ, а также показана корреляционная связь между снижением чувствительности *B. pseudomallei* к бензалкония хлориду и появлением резистентности к антибиотикам различных классов [15]. Однако для поиска возможных детерминант, ответственных за устойчивость *B. pseudomallei* к антибактериальным средствам, необходимо провести поиск мутаций, которые способны привести к появлению такой резистентности.

Таким образом, **цель** исследования заключалась в полногеномном секвенировании и сравнительном анализе исходного и резистентного к действию бензалкония хлорида штаммов *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

В работе использованы два штамма: исходный *B. pseudomallei* 134 и полученный на его основе мутантный штамм *B. pseudomallei* 134K. *B. pseudomallei* 134K характеризовался повышенной устойчивостью к действию АДБАХ, а также, в отличие от *B. pseudomallei* 134, был резистентен к цефтазидиму, обладал промежуточной устойчивостью к амоксициллину / клавулоновой кислоте, доксициклину и меропенему и чувствительностью к гентамицину. Культуры выращивались на агаре Мюллера – Хинтона (Himedia, Индия) при температуре 37 °C в течение 18–24 часов.

Геномную ДНК исходного штамма *B. pseudomallei* 134 и штамма-селектанта *B. pseudomallei* 134K выделяли при помощи набора Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Life Technologies Inc., США) согласно инструкции производителя. Измерение концентрации ДНК проводили с использованием спектрофотометра Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, США) и набора для определения концентрации двухцепочечной ДНК Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Приготовление библиотеки полногеномного секвенирования выполняли набором Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, США). Мультиплексирование образцов осуществляли набором реагентов Nextera XT Index Kit (Illumina, США). Полногеномное секвенирование производили на платформе MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) в режиме парноконцевого чтения (Illumina, США).

Для анализа качества полученных прочтений применяли программные продукты FASTQC v0.11.9 [16] и MultiQC [17]. Сборку геномов обоих штаммов проводили с помощью ассемблера SPAdes v3.11.1 [18] в режиме анализа парноконцевых прочтений с использованием параметра *careful* для снижения числа мисматчей и коротких делеций. Для сравнения последовательностей геномов штамма *B. pseudomallei* 134 и мутантного штамма *B. pseudomallei* 134K использовали программу для быстрого поиска геномных вариантов и выравнивания ядра генома – Snippy v4.6.0 [19]. Для построения выравниваний нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли программный продукт MEGA X.

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования (таблица) итоговый размер геномов исходного и резистентного к алкилдиметилбензиламмония хлориду штаммов *B. pseudomallei* составил свыше 4 млрд п.о. Количество прочтений с параметром качества выше Q30 превышало 75 %. Геном штамма *B. pseudomallei* 134 был собран из 120 контигов длиной не менее 500 п.н. с суммарной длиной свыше 7 млн п.о. Размер самого протяженного контига (L1) превышал 500 тыс. п.о. Геном штамма, устойчивого к воздействию БХ, собран из 127 контигов расчетной общей длиной более 7 млн п.о. Размер его L1 – больше 400 тыс. п.о.

После сборки полученных геномов двух исследуемых штаммов проведено их сравнение, в результате которого в последовательности резистентного штамма обнаружено 16 мутаций в кодирующей области генома. Поиск и анализ детерминант, которые могут быть ответственны за появление устойчивости к биоцидам у *B. pseudomallei* 134К, определили два гена: ген транскрипционного репрессора TetR с точечной миссенс-мутацией и ген эффлюксной помпы AmrAB-OprA с инсерцией.

TetR – большое семейство транскрипционных регуляторов (TFTR). Изначально считалось, что они осуществляют регуляцию экспрессии генов эффлюкс-насосов. Однако в последнее время представления о TFTR претерпели изменения. Получены данные, что они также регулируют гены, задействованные в клеточном делении и обуславливающие патогенность микроорганизмов [20–22]. Зачастую TFTR располагаются в пределах 200 п.о. от регулируемого гена. У штамма *B. pseudomallei* 134К регулятор транскрипции находился на расстоянии 240 п.о. от генов системы эффлюксной помпы семейства AcrB/AcrD/AcrF. Данный насос обуславливает устойчивость как к антибиотикам (фторхинолоны, цефалоспорины) [23], так и к дезинфекционным и антисептическим соединениям (хлоргексидин, бензалкония хлорид) [24, 25]. Однонуклеотидная замена в гене регулятора TetR у устойчивого к АДБАХ штамма привела к замене серина на пролин в мутантном белке, что обусловило изменение его вторичной структуры. Так, произошло сокращение длины α -спирали за счет появления в структуре протеина β -листа (рис. 1). По всей видимости, данная мутация привела к частичной (а возможно, и полной) потере функ-

Характеристика полученных сборок и рядов *B. pseudomallei* 134 и *B. pseudomallei* 134К

Characterization of the assemblies and reads of *B. pseudomallei* 134 and *B. pseudomallei* 134К

Характеристика Characteristics	Штаммы <i>B. pseudomallei</i> Strains of <i>B. pseudomallei</i>	
	<i>B. pseudomallei</i> 134	<i>B. pseudomallei</i> 134К
Объем данных (млрд п.о.) Data volume (billions bp)	2	2,2
Качество Q30 и выше Quality Q30 and more	76,4 %	77,0 %
L1 (п.о.) L1 (bp)	510911	429835
N50 (п.о.) N50 (bp)	182001	222391
Количество контигов (≥ 500 п.о.) Number of contigs (≥ 500 bp)	120	127
Общая длина (≥ 500 п.о.) Total length (≥ 500 bp)	7285364	7287238

ции белка-регулятора, в результате чего увеличилась экспрессия регулируемых генов эффлюксной помпы (AcrB/AcrD/AcrF) и, как следствие, снизился уровень чувствительности к бензалкония хлориду и появилась резистентность к цефтазидиму. Полученные в настоящей работе данные подтверждаются исследованием J.L. Chodkowski и A. Shade, в котором авторы показали, что мутация в гене регулятора TetR привела к повышению уровня устойчивости к антибиотикам у *Burkholderia thailandensis* [26].

Эффлюксная помпа AmrAB-OprA – первая эффлюксная система, описанная у *B. pseudomallei*, относится к суперсемейству RND-транспортеров. Являясь гомологом насоса MexXY-OprM у *Pseudomonas aeruginosa*, определяет устойчивость возбудителя мелиоидоза к аминогликозидам и макролидам [23, 27]. Согласно полученным данным, у *B. pseudomallei* 134К выявлена обширная инсерция в гене эффлюксной помпы AmrAB-OprA. У устойчивого к бензалкония хлориду варианта произошла вставка 16 нуклеотидов в 544-м положении участка оперона *amrA*, что привело к увеличению длины цистрона, сдвигу рамки считывания, изменению аминокислотного состава и вторичной структуры кодируемого протеина (рис. 2). Это, вероятнее всего, привело к потере функции оперона *AmrAB-OprA* и невозможности нормального оттока ксенобиотиков из цитоплазмы микроорганизма. Данная гипотеза

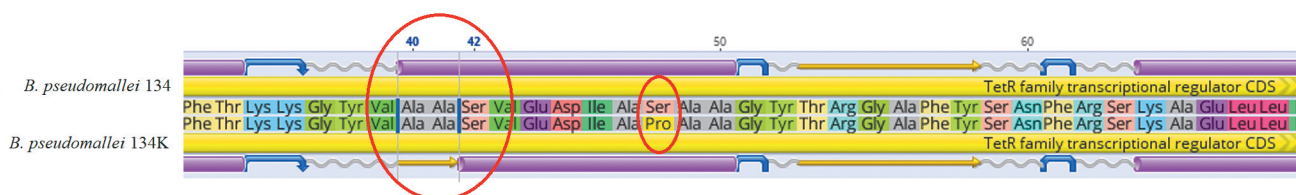


Рис. 1. Мутация и вторичная структура белка транскрипционного репрессора TetR

Fig. 1. Mutation and secondary structure of the transcriptional repressor protein TetR

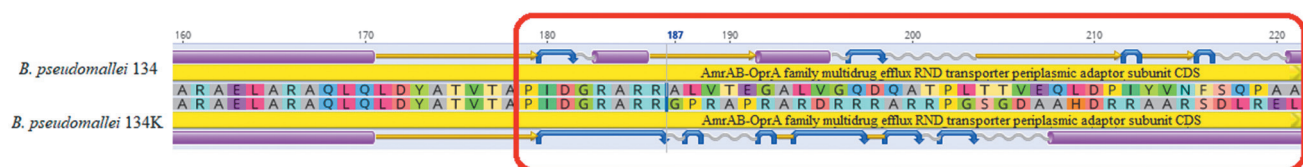


Рис. 2. Мутация и вторичная структура протеина amrA эффлюксной помпы AmrAB-OprA

Fig. 2. Mutation and secondary structure of the amrA protein of the AmrAB-OprA efflux pump

подтверждается тем фактом, что мутантный штамм утратил устойчивость к гентамицину. При анализе литературных данных не удалось найти информацию о том, что эффлюксная система AmrAB-OprA может быть ответственна за устойчивость к каким-либо дезинфектантам. В связи с этим снижение степени чувствительности к АДБАХ из-за мутации в описываемом эффлюксе является маловероятным.

Таким образом, секвенированы исходный штамм *B. pseudomallei* 134 и полученный на его основе штамм *B. pseudomallei* 134К, имеющий повышенный уровень устойчивости к действию бензалкония хлорида. В ходе сравнительного анализа геномов обнаружена мутация в гене транскрипционного репрессора TetR, которая потенциально может быть ответственна за снижение чувствительности возбудителя мелиоидоза к АДБАХ.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

- Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
- Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018; 4:17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.
- Schweizer H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol.* 2012; 7(12):1389–99. DOI: 10.2217/fmb.12.116.
- Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз в аспектах эпидемиологии, клиники и лабораторной диагностики. *Инфекция и иммунитет.* 2021; 11(3):409–22. DOI: 10.15789/2220-7619-MIA-1584.
- Национальный справочно-аналитический портал о дезинфекции, зарегистрированных на территории РФ. [Электронный ресурс]. URL: <http://dezreestr.ru/index.html> (дата обращения 03.08.2023).
- Реестр дезсредств. [Электронный ресурс]. URL: <https://dezr.ru/> (дата обращения 05.08.2023).
- de Vries L.E., Christensen H., Skov R.L., Aarestrup F.M., Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64(3):490–500. DOI: 10.1093/jac/dkp214.
- Gnanadhas D.P., Marathe S.A., Chakravorty D. Bio-cides – resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2013; 22(2):191–206. DOI: 10.1517/13543784.2013.748035.

- Chaplin C.E. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. *J. Bacteriol.* 1952; 63(4):453–8. DOI: 10.1128/jb.63.4.453-458.1952.

- Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulou I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(13):e00377-19. DOI: 10.1128/AEM.00377-19.

- Кобзев Е.Н., Чугунов В.А., Родин В.Б., Дегушева Е.В., Слукин П.В., Фёдорова Л.С., Акимкин В.Г. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014; 19(6):48–54.

- Ahn Y., Kim J.M., Lee Y.J., LiPuma J., Hussong D., Marasa B., Cerniglia C. Effects of extended storage of chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride solutions on the viability of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(12):2211–20. DOI: 10.4014/jmb.1706.06034.

- Kampf G. Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *J. Hosp. Infect.* 2018; 100(3):e1–e22. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.05.019.

- Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Захарова И.Б., Викторов Д.В. Анализ резистентности у *Burkholderia pseudomallei* к бензалкония хлориду и антибиотикам. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 3:115–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119.

- Babraham Bioinformatics – Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016; 32(19):3047–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354.

- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.

- Snippy. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения 10.07.2023).

- Cuthbertson L., Nodwell J.R. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013; 77(3):440–75. DOI: 10.1128/MMBR.00018-13.

- Ramos J.L., Martínez-Bueno M., Molina-Henares A.J., Terán W., Watanabe K., Zhang X., Gallegos M.T., Brennan R., Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69(2):326–56. DOI: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.

- Colclough A.L., Scadden J., Blair J.M.A. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics.* 2019; 20(1):731. DOI: 10.1186/s12864-019-6075-5.

- Viktorov D.V., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Kalinkina E.V., Merinova O.A., Ageeva N.P., Antonov V.A., Merinova L.K., Alekseev V.V. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(Suppl. 1):103–10. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70025-7.

- Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12):5230–5. DOI: 10.1128/AAC.00631-09.

- Begic S., Worobec E.A. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology (Reading).* 2008; 154(Pt. 2):454–61. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012427-0. Erratum in: *Microbiology.* 2009; 155(Pt. 6):2109–11.

26. Chodkowski J.L., Shade A. A coevolution experiment between *Flavobacterium johnsoniae* and *Burkholderia thailandensis* reveals parallel mutations that reduce antibiotic susceptibility. *Microbiology (Reading)*. 2023; 169(2):001267. DOI: 10.1099/mic.0.001267.

27. Podnecky N.L., Rhodes K.A., Schweizer H.P. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* 2015; 6:305. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00305.

References

1. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.

2. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.

3. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018; 4:17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.

4. Schweizer H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol.* 2012; 7(12):1389–99. DOI: 10.2217/fmb.12.116.

5. Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. [Melioidosis in aspects of epidemiology, clinical presentation and laboratory diagnostics]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2021; 11(3):409–22. DOI: 10.15789/2220-7619-MIA-1584.

6. [National reference and analytical portal about disinfectants registered on the territory of the Russian Federation]. (Cited 08 Mar 2023). [Internet]. Available from: <http://dezrestr.ru/index.html>.

7. [Register of disinfectants]. (Cited 08 May 2023). [Internet]. Available from: <https://dezr.ru/>.

8. de Vries L.E., Christensen H., Skov R.L., Aarestrup F.M., Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64(3):490–500. DOI: 10.1093/jac/dkp214.

9. Gnanadhas D.P., Marathe S.A., Chakravorty D. Biocides – resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2013; 22(2):191–206. DOI: 10.1517/13543784.2013.748035.

10. Chaplin C.E. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. *J. Bacteriol.* 1952; 63(4):453–8. DOI: 10.1128/jb.63.4.453-458.1952.

11. Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(13):e00377-19. DOI: 10.1128/AEM.00377-19.

12. Kobzev E.N., Chugunov V.A., Rodin V.B., Detusheva E.V., Slukin P.V., Fedorova L.S., Akimkin V.G. [Formation of resistance to disinfectants in microorganisms and ways to solve the problem]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19(6):48–54.

13. Ahn Y., Kim J.M., Lee Y.J., LiPuma J., Hussong D., Marasa B., Cerniglia C. Effects of extended storage of chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride solutions on the viability of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(12):2211–20. DOI: 10.4014/jmb.1706.06034.

14. Kampf G. Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *J. Hosp. Infect.* 2018; 100(3):e1–e22. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.05.019.

15. Luchinin D.N., Molchanova E.V., Zakharova I.B., Viktorov D.V. [Assessment of resistance in *Burkholderia pseudomallei* to benzalkonium chloride and antibiotics]. *Problemy Osobo*

Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; (3):115–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119.

16. Babraham Bioinformatics – Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

17. Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016; 32(19):3047–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354.

18. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.

19. Snippy. (Cited 10 Jul 2023). [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy>.

20. Cuthbertson L., Nodwell J.R. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013; 77(3):440–75. DOI: 10.1128/MMBR.00018-13.

21. Ramos J.L., Martínez-Bueno M., Molina-Henares A.J., Terán W., Watanabe K., Zhang X., Gallegos M.T., Brennan R., Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69(2):326–56. DOI: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.

22. Colclough A.L., Scadden J., Blair J.M.A. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics*. 2019; 20(1):731. DOI: 10.1186/s12864-019-6075-5.

23. Viktorov D.V., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Kalinkina E.V., Merinova O.A., Ageeva N.P., Antonov V.A., Merinova L.K., Alekseev V.V. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(Suppl. 1):103–10. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70025-7.

24. Maseda H., Hashida Y., Konaka R., Shirai A., Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12):5230–5. DOI: 10.1128/AAC.00631-09.

25. Begic S., Worobec E.A. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt. 2):454–61. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012427-0. Erratum in: *Microbiology*. 2009; 155(Pt. 6):2109–11.

26. Chodkowski J.L., Shade A. A coevolution experiment between *Flavobacterium johnsoniae* and *Burkholderia thailandensis* reveals parallel mutations that reduce antibiotic susceptibility. *Microbiology (Reading)*. 2023; 169(2):001267. DOI: 10.1099/mic.0.001267.

27. Podnecky N.L., Rhodes K.A., Schweizer H.P. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* 2015; 6:305. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00305.

Authors:

Luchinin D.N., Ustinov D.V., Shpak I.M., Molchanova E.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Лучинин Д.Н., Устинов Д.В., Шпак И.М., Молчанова Е.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.