



(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/74 (2006.01); A61K 35/741 (2006.01); A61K 35/742 (2006.01); A61K 35/744 (2006.01); A61K 35/745 (2006.01); A61K 35/747 (2006.01); A61K 9/0053 (2006.01); A61K 9/48 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01); Y02A 50/469 (2006.01); Y02A 50/473 (2006.01); Y02A 50/475 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015137399, 04.02.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.02.2014

Дата регистрации:
17.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

04.02.2013 US 61/760,584;

04.02.2013 US 61/760,585;

04.02.2013 US 61/760,574;

04.02.2013 US 61/760,606;

13.01.2014 US 61/926,918

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2017 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 17.08.2018 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.09.2015

(86) Заявка РСТ:

US 2014/014745 (04.02.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2014/121302 (07.08.2014)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулингз Интернэшнл Инк.", Лыу Татьяна
Нгоковна

(72) Автор(ы):

МАККЕНЗИ Грегори (US),

МАККЕНЗИ Мэри-Джейн Ломбардо (US),

КУК Дэвид (US),

ВУЛИК Марин (US),

ФОН МАЛТЗАН Джоффри (US),

ГУДМАН Брайан (US),

АУНИНС Джон Дж. (US),

ХЕНН Мэтью Р. (US),

БЕРРИ Дэвид А. (US),

УИНКЛЕР Джонатан (US)

(73) Патентообладатель(и):

СЕРЕС ТЕРАПЕУТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: PETROF E.O. et al. Stool substitute
transplant therapy for the eradication of
Clostridium difficile infection:
'RePOOPulating' the gut // Microbiome, 09 Jan
2013, 1:3, pp.1-12. KORANSKY J.R. Use of
ethanol for selective isolation of sporeforming
microorganisms // Appl Environ Microbiol.
1978 Apr; 35(4): 762-765. WO 2012122478 A1,
13.09.2012. WO (см. прод.)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

(57) Реферат:

Предложены варианты применения
очищенной популяции способных к прорастанию
бактериальных спор для лечения или
предотвращения или уменьшения тяжести по
меньшей мере одного симптома дисбиоза ЖКТ,
связанного с Clostridium difficile, включая

рецидивирующую инфекцию C. difficile, или
язвенный колит у реципиента, представляющего
собой млекопитающее, а также варианты
терапевтической композиции, содержащей
эффективное количество очищенной популяции
способных к прорастанию бактериальных спор.

Способные к прорастанию бактериальные споры могут быть получены путем осуществления следующих этапов: а) обеспечение фекального материала от донора, представляющего собой млекопитающее, и б) проведение обработки этанолом или термообработки фекального материала, в результате которой получают популяцию способных к прорастанию бактериальных спор. Из указанной очищенной популяции по существу устранен на детектируемом уровне патогенный материал, или патогенный материал по существу не имеет патогенной активности или имеет сниженный уровень патогенной активности, где необязательно указанный патогенный материал выбран из группы, состоящей из вируса, бактерии, эукариотического паразита, гельминта, фага, микоплазмы, токсоплазмы и гриба. При этом споры содержат по меньшей мере два вида

бактерий, содержащих последовательности нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 97% идентичные последовательностям нуклеиновых кислот, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 383, SEQ ID NO. 381, SEQ ID NO. 572, SEQ ID NO. 601, SEQ ID NO. 652, SEQ ID NO. 659, SEQ ID NO. 673, SEQ ID NO. 674, SEQ ID NO. 774, SEQ ID NO. 839, SEQ ID NO. 845, SEQ ID NO. 847, SEQ ID NO. 848, SEQ ID NO. 856, SEQ ID NO. 874, SEQ ID NO. 880, SEQ ID NO. 886, SEQ ID NO. 1049, SEQ ID NO. 1591, SEQ ID NO. 1655, SEQ ID NO. 1657, SEQ ID NO. 1670 и SEQ ID NO. 1896. Группа изобретений обеспечивает эффективное предотвращение, контроль и лечение заболеваний, расстройств и состояний ЖКТ, связанных с *Clostridium difficile*, и обеспечение здорового функционирования системы пищеварения в целом. 4 н. и 19 з.п. ф-лы, 21 ил., 33 табл., 37 пр.

(56) (продолжение):

2011094027 A1, 04.08.2011. WO 1997009886 A1, 20.03.1997. ШЕПТУЛИН А.А. Рефрактерные и рецидивирующие формы колита, ассоциированного с *Clostridium difficile* // РЖГГК, 2011, т.21, N2, с. 50-53. SETLOW B. et al. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol // Journal of Applied Microbiology 2002, 92, 362-375. COLEMAN W.H. Mechanism of killing of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* by wet heat // The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 50 (2010), 507-514.

RU 2 6 6 4 4 7 9 C 2

RU 2 6 6 4 4 7 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*A61K 35/74* (2015.01)*A61K 9/48* (2006.01)*A61P 1/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 35/74 (2006.01); *A61K 35/741* (2006.01); *A61K 35/742* (2006.01); *A61K 35/744* (2006.01); *A61K 35/745* (2006.01); *A61K 35/747* (2006.01); *A61K 9/0053* (2006.01); *A61K 9/48* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *Y02A 50/469* (2006.01); *Y02A 50/473* (2006.01); *Y02A 50/475* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015137399, 04.02.2014**(24) Effective date for property rights:
04.02.2014Registration date:
17.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
04.02.2013 US 61/760,584;
04.02.2013 US 61/760,585;
04.02.2013 US 61/760,574;
04.02.2013 US 61/760,606;
13.01.2014 US 61/926,918

(43) Application published: **10.03.2017 Bull. № 7**(45) Date of publication: **17.08.2018 Bull. № 23**(85) Commencement of national phase: **04.09.2015**(86) PCT application:
US 2014/014745 (04.02.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/121302 (07.08.2014)Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Goulingz Interneshnl Ink.", Lyu Tatyana Ngokovna

(72) Inventor(s):

MCKENZIE Gregory (US),
MCKENZIE Mary-Jane Lombardo (US),
COOK David (US),
VULIC Marin (US),
VON MALTZAHN Geoffrey (US),
GOODMAN Brian (US),
AUNINS John G. (US),
HENN Matthew R. (US),
BERRY David A. (US),
WINKLER Jonathan (US)

(73) Proprietor(s):

SERES TERAPEUTIKS, INK. (US)**(54) COMPOSITIONS AND METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: disclosed are versions of using a purified population of germination-competent bacterial spores for treating or preventing or reducing the severity of at least one symptom of gastrointestinal dysbiosis associated with *Clostridium difficile*, including a recurrent *C.difficile* infection, or ulcerative colitis in a mammalian recipient, as well as versions of a

therapeutic composition containing an effective amount of a purified population of germination-competent bacterial spores. Germination-competent bacterial spores can be obtained by the following steps: a) providing a fecal material from a mammalian donor, and b) carrying out ethanol treatment or heat treatment of the fecal material, resulting in a population of germination-capable bacterial spores. From said purified

population, a pathogenic material is substantially eliminated at a detectable level, or the pathogenic material is substantially free of pathogenic activity or has a reduced level of pathogenic activity, where said pathogenic material is optionally selected from a group consisting of a virus, a bacterium, a eukaryotic parasite, a helminth, a phage, a mycoplasma, toxoplasma and a fungus. Spores contain at least two kinds of bacteria comprising nucleic acid sequences that are at least 97% identical to the nucleic acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 383, SEQ ID NO. 381, SEQ ID NO. 572, SEQ ID NO. 601, SEQ ID NO. 652, SEQ ID NO. 659, SEQ ID NO.

673, SEQ ID NO. 674, SEQ ID NO. 774, SEQ ID NO. 839, SEQ ID NO. 845, SEQ ID NO. 847, SEQ ID NO. 848, SEQ ID NO. 856, SEQ ID NO. 874, SEQ ID NO. 880, SEQ ID NO. 886, SEQ ID NO. 1049, SEQ ID NO. 1591, SEQ ID NO. 1655, SEQ ID NO. 1657, SEQ ID NO. 1670 and SEQ ID NO. 1896.

EFFECT: group of inventions provides effective prevention, control and treatment of diseases, disorders and conditions of the gastrointestinal tract associated with *Clostridium difficile*, and ensuring the healthy functioning of the digestive system as a whole.

23 cl, 21 dwg, 33 tbl, 37 ex

R U 2 6 6 4 4 7 9 C 2

R U 2 6 6 4 4 7 9 C 2

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США №61/760584, поданной 4 февраля 2013 г., предварительной заявке на патент США №61/760585, поданной 4 февраля 2013 г., предварительной заявке на патент США №61/760574, поданной 4 февраля 2013 г., предварительной заявке на патент США №61/760606, поданной 4 февраля 2013 г., и предварительной заявке на патент США №61/926918, поданной 13 января 2014 г. Все указанные заявки включены посредством ссылки полностью для любых целей.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Настоящая заявка включает Перечень последовательностей, поданный в электронном формате в виде текстового файла, озаглавленного «25970PCT_sequence1isting.txt», созданного 2 февраля 2014 г. и имеющего размер 4100000 байтов. Указанный перечень последовательностей включен посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[003] Микроорганизмы колонизируют желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), кожу и другие эпителиальные и тканевые ниши в организме млекопитающих, например, ротовую полость, поверхность глаз и влагалище. В желудочно-кишечном тракте локализовано многочисленное и разнообразное сообщество микроорганизмов. Среду или нишу для сообщества множества различных видов или организмов, в том числе разнообразных штаммов бактерий обеспечивает сложная система. Сотни разных видов могут образовывать сообщество комменсалов в ЖКТ здорового индивидуума; указанный набор организмов развивается с момента рождения с формированием функционально зрелой популяции микроорганизмов приблизительно к возрасту 3-х лет. Взаимодействия между штаммами микроорганизмов в указанных популяциях, а также между микроорганизмами и хозяином, например, с иммунной системой хозяина, формируют структуру указанного сообщества, при этом на распределение микроорганизмов влияет доступность ресурсов и конкуренция за ресурсы. Такими ресурсами могут быть пища, местоположение и доступность пространства для роста, или физическая структура, к которой может прикрепляться микроорганизм. Например, рацион питания хозяина вносит вклад в формирование флоры ЖКТ.

[004] Нормальная микробиота обеспечивает ряд преимуществ для хозяина, в том числе устойчивость к колонизации широким спектром патогенов, биосинтез и поглощение важнейших питательных веществ, а также стимуляцию иммунной системы для поддержания здоровья кишечного эпителия и адекватной регуляции системного иммунитета. В условиях «дисбиоза» или нарушенного симбиоза функции микробиоты могут утрачиваться или нарушаться, что приводит к повышенной восприимчивости к патогенам, измененным метаболическим профилям или индукции провоспалительных сигналов, что может приводить к местному или системному воспалению или аутоиммунным реакциям. Таким образом, микробиота ЖКТ играет важную роль в патогенезе многих заболеваний и расстройств, в том числе разнообразных патогенных инфекций пищеварительного тракта. Например, восприимчивость субъектов к патогенным инфекциям повышается, если нормальная микробиота ЖКТ была повреждена в результате применения антибиотиков широкого спектра действия. Многие из указанных заболеваний и расстройств представляют собой хронические состояния, значительно снижающие качество жизни субъекта и способные в конечном итоге приводить к смертельному исходу.

[005] Производители пробиотиков утверждали, что предлагаемые ими составы с бактериями способствуют поддержанию здоровья млекопитающих за счет сохранения

естественной микрофлоры ЖКТ и усиления нормального контроля над аберрантными иммунными реакциями. См., например, патент США №8034601. Пробиотики, тем не менее, были ограничены очень узкой группой родов и, соответственно, ограниченным числом видов; таким образом, во многих ситуациях они не заменяют адекватным

5 образом отсутствующую естественную микрофлору ЖКТ.

[006] Таким образом, у практикующих специалистов имеется потребность в способе заселения желудочно-кишечного тракта субъекта разнообразными полезными наборами микробиоты для коррекции дисбиоза.

[007] Соответственно, отвечая на потребность в устойчивых, действенных и

10 эффективных композициях и способах лечения заболеваний ЖКТ путем восстановления или усиления функций микробиоты, авторы настоящего изобретения решают указанные и другие проблемы предшествующего уровня техники, предлагая композиции и способы лечения субъектов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[008] Раскрытые в настоящем изобретении терапевтические композиции, содержащие непатогенные способные к прорастанию бактериальные споры для предотвращения, контроля и лечения заболеваний, расстройств и состояний ЖКТ и поддержания общего

15 здоровья в области пищеварения. Указанные композиции обладают полезными свойствами, поскольку подходят для безопасного введения человеку и другим субъектам-млекопитающим, а также эффективны при многочисленных желудочно-кишечных

20 заболеваниях, расстройствах и состояниях и для поддержания общего здоровья в области питания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[009] На фиг. 1А приведено схематическое изображение гена 16S рРНК и указаны

25 координаты гипервариабельных областей 1-9 (V1-V9). Координаты V1-V9: 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 и 1435-1465, соответственно, на основе нумерации с применением системы номенклатуры для *E. coli* по Brosius et al., Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, PNAS 75 (10):4801-4805 (1978). На фиг. 1В выделены жирным шрифтом нуклеотидные

30 последовательности для каждой гипервариабельной области в типовой референсной последовательности 16S *E. coli*, описанной Brosius et al.

[010] На фиг. 2 приведена фотография градиента CsCl, демонстрирующая отделение спор от другого остаточного материала среды обитания.

[011] На фиг. 3 приведено три фазово-контрастных изображения, демонстрирующих

35 нарастающее обогащение спорами из суспензии фекалий; обработанного этанолом и очищенного CsCl состава со спорами; и обработанного этанолом и очищенного CsCl и сахарозой состава со спорами.

[012] На фиг. 4 приведена совокупность кривых выживаемости, демонстрирующих эффективность популяции спор в модели профилактики *C. difficile* на мышах.

40 [013] На фиг. 5 приведена совокупность кривых выживаемости, демонстрирующих эффективность популяции спор в модели предотвращения рецидива *C. difficile* на хомяках.

[014] На фиг. 6 продемонстрирована жизнеспособность клеток при разнообразных вариантах обработки этанолом и термообработки в течение различных периодов

45 времени.

[015] На фиг. 7 продемонстрирована способность к выживанию клеток из четырех донорских образцов фекалий после термообработки при 60°C в течение 5 минут.

[016] На фиг. 8 продемонстрировано, что этанол уменьшает численность и

анаэробных, и аэробных бактериальных видов на несколько порядков величины за секунды.

[017] На фиг. 9 продемонстрирована зависимость концентрации спор от времени в полученных образцах фекалий от нескольких доноров.

5 [018] На фиг. 10 показана выраженная корреляция и линейная зависимость между измерением концентрации ДНК с применением анализа сопряженных спектров флуоресценции и количеством жизнеспособных споровых колониеобразующих единиц.

[019] На фиг. 11 показан эффект различных обработок способствующим прорастанию веществом на способность бактерий к вегетативному росту в популяции спор.

10 [020] На фиг. 12 показано увеличение бактериального разнообразия при применении обработки способствующим прорастанию веществом для получения вегетативных форм бактерий из популяций спор.

[021] На фиг. 13 показана роль термоактивации при различных температурах на спорах из трех разных образцов донорских фекалий.

15 [022] На фиг. 14 показано, что обработка лизоцимом совместно с термоактивацией улучшает прорастание при большинстве температур.

[023] На фиг. 15 приведены концентрации спор, присутствующих в образце фекалий, при культивировании на разных средах.

20 [024] На фиг. 16 показано аналогичное спорообразование при инкубировании планшетов в течение 2 и 7 дней после прорастания популяции спор на планшетах с различными средами.

[025] На фиг. 17 показана защитная эффективность популяции спор у мышей, стимулированных *C. difficile*, по оценке на основании изменения массы тела мышей на протяжении эксперимента. Каждый график отражает изменение массы тела 25 индивидуальной мыши относительно дня -1 на протяжении эксперимента. Число смертей на протяжении эксперимента указано сверху над графиком и отражено окончанием линии перед днем 6. На верхних панелях (слева направо) представлены группа с контролем-носителем, группа с суспензией фекалий и группа с необработанным нестимулированным контролем; на нижних панелях представлены обработанный 30 этанолом и очищенный в градиенте состав со спорами; обработанный этанолом очищенный в градиенте «способный к прорастанию» состав со спорами, и обработанные этанолом очищенный в градиенте «способный к споруляции» состав.

[026] На фиг. 18 представлено разнообразие микроорганизмов, измеренное в 35 обработанных этанолом споровых образцах и образцах пациента до лечения и после лечения. Общее разнообразие микроорганизмов определяют с применением индекса альфа-разнообразия Chao1 и измеряют с той же глубиной анализа генома для подтверждения адекватного перекрытия последовательностей для анализа микробиома в целевых образцах. Пациент до лечения (фиолетовый) был носителем микробиома со 40 значительно уменьшенным общим разнообразием по сравнению с обработанными этанолом спорами (красный) и с пациентом после лечения на 5 день (синий), 14 (оранжевый) день и 25 (зеленый) день.

[027] На фиг. 19 показано, как происходит сдвиг экогруппы микроорганизмов у 45 пациента при лечении обработанными этанолом спорами от дисбиотического состояния в сторону здорового состояния. Анализ главных координат на основании общего разнообразия и структуры микробиома (бета-разнообразие Брея-Кертиса) пациента до и после лечения показывает, что сочетание приживления OTU при лечении спорами и стимуляции экогруппы микроорганизмов пациента приводит к получению экогруппы микроорганизмов, отличной как от микробиома до лечения, так и от экогруппы пря

лечении обработанными этанолом спорами.

[028] На фиг. 20 показана стимуляция видов *Bacteroides* у пациентов, получавших лечение популяции спор. Сравнение количества колоний *Bacteroides* из суспензии фекалий до лечения и на 4 неделе после лечения демонстрирует увеличение в 4 log или более.

5 Колонии нумеровали по серийным разведениям и высевали на агар с желчными кислотами и эскулином для *Bacteroides*, высокоселективный в отношении труппы *B. fragilis*. Виды определяли путем идентификации полноразмерных последовательностей 16S.

10 [029] На фиг. 21 показано увеличение числа приживающихся видов и стимулируемых видов в микробиомах пациента после лечения обработанной этанолом популяции спор. Относительную распространенность видов, которые приживались или были стимулированы согласно описанию, определяли на основании числа прочтений последовательностей 16S. Все графики соответствуют разным пациентам, получавшим лечение рецидивирующего *C. difficile* обработанной этанолом популяции спор.

15 [030] На фигурах представлены различные варианты реализации настоящего изобретения исключительно в иллюстративных целях. Специалист в данной области техники легко поймет из приведенного ниже описания, что альтернативные варианты реализации проиллюстрированных в настоящем документе структур и способов могут быть реализованы без отступления от принципов настоящего изобретения, описанных
20 в настоящем документе.

ОПИСАНИЕ ТАБЛИЦ

[031] Таблица 1. Перечень функциональных таксономических единиц (OTU) с таксономической принадлежностью к роду, виду и филогенетической кладе. Принадлежность клад бактериальных OTU основана на данных о последовательностях
25 16S. Клады определяют на основании топологии филогенетического дерева, сконструированного на основании полноразмерных последовательностей 16S с применением методов максимального правдоподобия, известных специалистам в области филогенетики. Конструируют клады для подтверждения того, что все OTU в определенной кладе: (i) расположены в пределах определенного числа узлов с бутстреп-
30 поддержкой друг от друга, и (ii) отличаются не более чем на 5% в отношении генетического сходства. OTU, принадлежащие одной кладе, можно определить как генетически и филогенетически отличные от OTU другой клады на основании данных секвенирования 16S-V4, при этом OTU, попадающие в одну кладу, являются близкородственными. OTU, попадающие в одну кладу, являются эволюционно
35 близкородственными, и могут быть отличимы или неотличимы друг от друга при применении данных секвенирования 16S-V4. Представители одной клады, благодаря эволюционному родству, играют аналогичные функциональные роли в экогруппе микроорганизмов, например, обнаруживаемых в кишечнике человека. Композиции, где одни виды замещены другими из той же клады, предположительно сохраняют
40 консервативную экологическую функцию и, соответственно, подходят для применения в настоящем изобретении. Для всех OTU обозначено наличие предполагаемой способности образовывать споры и то, являются ли они патогенными или патобионтными (см. определения для описания «патобионта»). Приоритетные патогены по классификации NIAID обозначены как «категория А», «категория В» или «категория С», а оппортунистические патогены обозначены как «ОП». OTU, которые не являются патогенными, или способность которых существовать в виде патогенов неизвестна, обозначены отметкой «НЕТ». «SEQ ID №» соответствует идентификатору OTU в Перечне последовательностей; «№ доступа в общедоступной базе данных» соответствует

идентификационному номеру OTU в общедоступной базе последовательностей.

[032]

[033] В таблице 2 приведены бактериальные OTU, идентифицированные с помощью анализа 16s обработанной этанолом популяции спор до и после очищения в градиенте CsCl.

[034] В таблице 3 приведены смертность и изменение массы тела мышей, получавших лечение суспензией донорских фекалий и обработанным этанолом и/или термообработанным составом со спорами в различных разведениях,

[035] В таблице 4 приведены OTU, идентифицированные среди спорообразующих видов, полученных путем выделения колоний из состава со спорами, включая различные варианты термообработки

[036] Таблица 5 содержит OTU, не идентифицированные в необработанных фекальных суспензиях, однако идентифицированные в обработанных этанолом или термообработанных популяциях спор.

[037] Таблица 6 содержит OTU, идентифицированные в обработанной этанолом популяции спор, выделенной из образца микробиома от донора А.

[038] Таблица 7 содержит OTU, идентифицированные в обработанной этанолом популяции спор, выделенной из образца микробиома от донора В.

[039] Таблица 8 содержит OTU, идентифицированные в обработанной этанолом популяции спор, выделенной из образца микробиома от донора С.

[040] Таблица 9 содержит OTU, идентифицированные в обработанной этанолом популяции спор, выделенной из образца микробиома от донора D.

[041] Таблица 10 содержит OTU, идентифицированные в обработанной этанолом популяции спор, выделенной из образца микробиома от донора Е.

[042] Таблица 11 содержит OTU, идентифицированные в обработанной этанолом популяции спор, выделенной из образца микробиома от донора F.

[043] Таблица 12 содержит OTU, идентифицированные в культивируемых обработанных этанолом популяциях спор на разных средах типов.

[044] Таблица 13. Виды, идентифицированные как «способные к прорастанию» и «способные к споруляции» методом точечного выделения колоний

[045] Таблица YYY. Виды, идентифицированные как «способные к прорастанию» с применением метода 16S-V4 NGS.

[046] Таблица ZZZ. Виды, идентифицированные как «способные к споруляции» с применением метода 16s-V4 NGS.

[047] На таблице AC приведены данные относительно содержания спор для 3 разных обработанных этанолом составов со спорами, примененных для успешного лечения 3 пациентов, страдающих рецидивирующей инфекцией *C. difficile*.

[048] Таблица AD. Дозы ДПК в таблице AC при нормировании к 4×10^5 СКOE на дозу

[049] Таблица GB. OTU, детектированные минимум по десяти прочтения последовательностей 16S-V4 по меньшей мере в одном обработанном этанолом составе со спорами (панмикробиом). Отмечены OTU, приживающиеся у получавших лечение пациентов, и процент пациентов, у которых они приживаются, а также клады, статус спорообразования и статус ключевых OTU. Отмеченные звездочкой OTU встречаются в $\geq 80\%$ обработанных этанолом составов и приживаются у $\geq 50\%$ получавших лечение пациентов.

[050] В таблице GC ранжированы первые 20 OTU по CES, при этом имеется дополнительное требование: должно быть показано, что OTU приживается, чтобы она

считалась коровым экологическим элементом.

[051] Таблица GD: Коровые экологические подгруппы, протестированные в модели на мышах с *C. difficile*

[052] Таблица GE: Результаты для бактериальных композиций, протестированных в модели на мышах с *C. difficile*.

[053] Таблица GF. OTU и принадлежность их клад, протестированные в тройных комбинациях, с результатами анализа ингибирования *in vitro*

[054] Таблица ZA. Композиции с микроорганизмами, которые вводят через оральный зонд в день -1

[055] Таблица TAB. Популяция OTU в 2, 3 и 4 день после дозирования композициями с микроорганизмами

[056] Таблица TAC. Популяция клад в 2, 3 и 4 дни после дозирования композициями с микроорганизмами

[057] Таблица TAD. Смертность в экспериментальной группе мышей,

стимулированных $10^{4,5}$ спор *C. difficile* в 0 день

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ ОБЩИЙ ОБЗОР

[058] В настоящем изобретении раскрыты терапевтические композиции, содержащие непатогенные, способные к прорастанию бактериальные споры, для предотвращения, контроля и лечения заболеваний, расстройств и состояний ЖКТ и поддержания общего здоровья в области пищеварения. Указанные композиции обладают полезными свойствами, поскольку подходят для безопасного введения человеку и другим субъектам-млекопитающим, а также эффективны при многочисленных желудочно-кишечных заболеваниях, расстройствах и состояниях и для поддержания общего здоровья в области пищеварения. Хотя композиции на основе спор известны, их обычно получают с применением других техник, таких как лиофилизация или высушивание распылением жидких бактериальных культур, что приводит к неудовлетворительной эффективности, нестабильности, существенной вариабельности и отсутствию адекватной безопасности и эффективности.

[059] Было обнаружено, что популяции бактериальных спор могут быть получены из биологических материалов, полученных от субъектов-млекопитающих, в том числе человека. Указанные популяции вводят в состав композиций согласно настоящему изобретению и вводят субъектам-млекопитающим с применением способов согласно описанию в настоящем документе.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[060] «Микробиота» относится к сообществу микроорганизмов, которые встречаются (продолжительное время или временно) в организме и на организме субъекта-животного, как правило, млекопитающего, такого как человек, в том числе эукариот, архей, бактерий и вирусов (включая бактериальные вирусы, т.е. фаги).

[061] «Микробном» относится к генетическому содержанию сообществ микроорганизмов, живущих в организме и на организме человека, продолжительное время или временно, в том числе эукариот, архей, бактерий и вирусов (включая бактериальные вирусы (т.е. фаги)), при этом «генетическое содержание» включает геномную ДНК, РНК, такую как рибосомальная РНК, эпигеном, плазмиды и все другие типы генетической информации.

[062] «Носительство микроорганизмов» или просто «носительство» относится к популяции микроорганизмов, населяющей нишу в организме или на поверхности организма человека. Носительство часто определяют как относительную

распространенность. Например, OTU1 содержит 60% от общего носительства микроорганизмов, что означает, что относительная распространенность OTU1 составляет 60% относительно других OTU в образце, для которого проводилось измерение. Носительство чаще всего определяют на основании данных геномного секвенирования, в этом случае относительная распространенность или носительство одной OTU или группы OTU определяется по отношению числа прочтений секвенирования, которые относятся к указанной(ым) OTU, и общего числа прочтений секвенирования для указанного образца.

[063] «Стимуляция микроорганизмов» или просто «стимуляция» относится к формированию или значимому увеличению популяции микроорганизмов, которые (i) отсутствуют или не детектируются (по оценке с применением стандартных геномных и микробиологических техник) во вводимой терапевтической композиции с микроорганизмами, (ii) отсутствуют, не детектируются или редко встречаются в нише организма хозяина (например, желудочно-кишечном тракте, коже, в ноздрях или влагалище) до доставки композиции с микроорганизмами, и (iii) обнаруживаются после введения композиции с микроорганизмами, или их численность значительно увеличивается, например 2-кратно, 5-кратно, 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , или более чем на 1×10^8 , в тех случаях, когда они ранее редко встречались.

Микроорганизмы стимулированных групп могут быть получены из экзогенных источников, таких как пища и окружающая среда, или вырастать в микронизмах в организме хозяина, где они встречаются с низкой частотой.

[064] Введение указанной терапевтической композиции с микроорганизмами индуцирует экологический сдвиг в целевой нише, способствующий созданию благоприятных условий для роста указанных комменсальных микроорганизмов. В отсутствие лечения терапевтической композицией с микроорганизмами хозяин может постоянно подвергаться воздействию указанных микроорганизмов; тем не менее, устойчивый рост и положительное влияние на здоровье, связанные со стабильной популяцией микроорганизмов с повышенной численностью, составляющих стимулированную экогруппу, не наблюдаются.

[065] «Приживление микроорганизмов» или просто «приживление» относится к приживлению OTU, содержащих терапевтическую композицию с микроорганизмами в целевой нише, которые отсутствуют у получающего лечение хозяина до лечения. Микроорганизмы, которые составляют прижившуюся экогруппу, присутствуют в терапевтической композиции с микроорганизмами и становятся компонентами экогруппы микроорганизмов хозяина при лечении. Прижившиеся OTU могут сохраняться временно, или демонстрируют долгосрочную стабильность в экогруппе микроорганизмов, которые заселяют организм хозяина после лечения терапевтической композицией с микроорганизмами. Прижившаяся экогруппа может индуцировать в целевой нише экологический сдвиг, который способствует созданию благоприятных условий для роста комменсальных микроорганизмов, способных катализировать сдвиг дисбиотической экогруппы к экогруппе, соответствующей здоровому состоянию.

[066] «Экологическая ниша» или просто «ниша» относится к экологическому пространству, которое занимает организм или группа организмов. Ниша характеризует то, как организм или популяция организмов отвечает на распределение ресурсов, физические показатели (например, пространство в тканях хозяина) и конкуренцию (например, ростом, если ресурсов достаточно, а хищники, паразиты и патогены немногочисленны), и как он, в свою очередь, изменяет эти же показатели (например, ограничивая доступ к ресурсам для других организмов, функционируя в качестве

источника пищи для хищников и потребителя добычи).

[067] «Дисбиоз» относится к состоянию микробиоты пищеварительного тракта или другой области организма субъекта, в том числе поверхностей слизистых оболочек и кожи, где нарушено(а) нормальное разнообразие и/или функция экосистемы. Указанное болезненное состояние может быть обусловлено уменьшением разнообразия, избыточным ростом одного или большего количества патогенов или патобионтов, симбиотических организмов, способных вызывать заболевание только тогда, когда у субъекта имеются определенные генетические условия и/или условия окружающей среды, или сдвиг в сторону экосистемы микроорганизмов, которая уже не обеспечивает необходимую функцию у субъекта-хозяина, и, соответственно уже не способствует поддержанию здоровья.

[068] «Патобионты» или «оппортунистические патогены» относится к симбиотическим организмам, способным вызывать заболевание исключительно тогда, когда у субъекта имеются определенные генетические условия и/или условия окружающей среды.

[069] «Филогенетическое дерево» относится к графическому представлению эволюционных взаимосвязей между генетическими последовательностями, полученных с применением определенного набора алгоритмов филогенетической реконструкции (например, принцип экономии, максимального правдоподобия, или байесовский метод). Узлы дерева соответствуют отдельным предковым последовательностям; достоверности любого узла обеспечиваются бутстепом или критерием байесовской апостериорной вероятности, измеряющей неопределенность ветвей.

[070] «Функциональные таксономические единицы», «OTU», относятся к конечному листу филогенетического дерева и определяются последовательностью нуклеиновых кислот, например, всего генома или конкретной генетической последовательностью, и всеми последовательностями, обладающими идентичностью последовательностей с указанной последовательностью нуклеиновых кислот на уровне вида. Согласно некоторым вариантам реализации специфическая генетическая последовательность может представлять собой последовательность 16S или часть последовательности 16S. Согласно другим вариантам реализации секвенируют и сравнивают полные геномы двух элементов. Согласно другому варианту реализации выбранные области, такие как мультилокусные метки последовательностей (MLST), специфические гены или группы генов могут генетически сравниваться. Во вариантах реализации с 16S OTU, обладающие $\geq 97\%$ средней идентичности нуклеотидов по всем 16S, или некоторым переменным областям 16S, считаются одной OTU (см., например, Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ros RP, and O'Toole PW. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 38: e200. Konstantinidis KT, Ramette A, and Tiedje JM. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.). Согласно вариантам реализации, задействующим весь геном, метки MLST, специфические гены или группы генов OTU, обладающие $\geq 95\%$ средней идентичности нуклеотидов, считают одной OTU (см., например, Achtman M, and Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440. Konstantinidis KT, Ramette A, and Tiedje JM. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.). OTU часто определяют через сравнение последовательностей у разных организмов. Обычно последовательности менее чем с 95% идентичностью последовательностей не считают принадлежащими одной OTU. OTU могут также описываться любой комбинацией нуклеотидных маркеров или генов, в частности, высококонсервативных генов (например, генов «домашнего

хозяйства»), или их комбинацией. Такое описание задействует, например, данные секвенирования WGS или последовательности всего генома.

[071] «Остаточные продукты среды обитания» относится к материалу, происходящему из местообитания микробиоты в организме или на организме человека или животного.

Например, микробиота обитает в экскрементах, в желудочно-кишечном тракте, на собственной коже, в слюне, слизи дыхательных путей или выделениях мочеполового тракта (т.е. это биологические материалы, связанные с сообществом микроорганизмов).

«По существу не содержащий остаточных продуктов среды обитания» означает, что бактериальная композиция уже не содержит биологического материала, связанного со средой обитания микроорганизмов на организме или в организме субъекта, человека или животного, и является на 100%, 99%, 98%, 97%, 96% или 95% свободной от любого загрязняющего биологического материала, связанного с сообществом микроорганизмов.

Остаточные продукты среды обитания могут включать абиотические материалы (в том числе неперевавленную пищу) или могут включать нежелательные микроорганизмы.

«По существу не содержащий остаточных продуктов среды обитания» может также означать, что бактериальная композиция не содержит детектируемых клеток человека или животного, и что детектируются только клетки микроорганизмов. Согласно одному варианту реализации «по существу не содержащий остаточных продуктов среды обитания» может также означать, что бактериальная композиция не содержит

детектируемых вирусных загрязняющих примесей (в том числе бактериальных вирусов (т.е. фагов)), грибных и микоплазменных загрязняющих примесей. Согласно другому

варианту реализации это означает, что менее чем $1 \times 10^{-2}\%$, $1 \times 10^{-3}\%$, $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$, $1 \times 10^{-6}\%$, $1 \times 10^{-7}\%$, 1×10^{-8} жизнеспособных клеток в бактериальной композиции

принадлежать человеку или животному, а не клеткам микроорганизмов. Существует несколько способов обеспечения указанной степени чистоты, ни один из которых не являются ограничивающим. Так, загрязнение может быть уменьшено путем выделения требуемых компонентов путем проведения нескольких этапов пересева одиночных колоний методом штриха на твердых средах, до того момента, когда дублирующие

штрихи (например, не ограничиваясь указанным, два штриха) из последовательных одиночных колоний не будут обеспечивать морфологию исключительно одиночных колоний. Как вариант, уменьшение загрязнения может достигаться путем проведения нескольких циклов серийных разведений до получения одиночных нужных клеток

(например, разведение 10^{-8} или 10^{-9}), например, путем проведения несколько 10-кратных серийных разведений. Затем можно подтвердить получение одиночных клеток, показав,

что в нескольких изолированных колониях наблюдается аналогичная форма клеток и окрашивание по Граму. Другие способы подтверждения надлежащей чистоты включают генетический анализ (например, ПЦР, секвенирование ДНК), серологический и антигенный анализ, ферментный и метаболический анализ, и способы с применением таких инструментов, как проточная цитометрия с реагентами для различения нужных компонентов и загрязняющих примесей.

[072] «Клада» относится к OTU или представителям филогенетического дерева, расположенным ниже статистически достоверного узла филогенетического дерева.

Клада содержит набор конечных листьев филогенетического дерева, представляющих собой отдельные монофилетические эволюционные единицы, обладающие определенной степенью сходства последовательностей.

[073] В области микробиологии, «16S-секвенирование», или «16S-pPHK», или «16S» относится к последовательности, полученной в результате определения нуклеотидов,

которые содержат ген(ы) рибосомальной РНК 16S. Длина бактериальных 16S рРНК составляет приблизительно 1500 нуклеотидов и используют для реконструкции эволюционных взаимосвязей и сходства последовательностей между бактериальными изолятами с применением филогенетических методов. Последовательности 16S используют для филогенетической реконструкции, поскольку они обычно высококонсервативны, однако содержат специфические гипервариабельные области, содержащие достаточно разнообразные нуклеотиды для различения родов и видов большинства бактерий.

[074] Термин «области V1-V9» 16S рРНК относится к первым девяти гипервариабельным областям гена 16S рРНК, которые используют для генотипирования бактериальных образцов. Указанные области у бактерий определяют нуклеотиды 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 и 1435-1465, соответственно, с применением нумерации на основе системы номенклатуры *E. coli*. Brosius et al., Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, PNAS 75(10):4801-4805 (1978). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере что-либо одно из областей V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, и V9 используют для определения OTU. Согласно одному варианту реализации области V1, V2, и V3 используют для определения OTU. Согласно другому варианту реализации области V3, V4 и V5 используют для определения OTU. Согласно другому варианту реализации используют область V4 для определения OTU. Специалист в данной области техники может идентифицировать специфические гипервариабельные области кандидатной 16S рРНК путем сравнения указанной представляющей интерес кандидатной последовательности с референсной последовательностью и идентифицировать гипервариабельные области на основании сходства с референсными гипервариабельными областями; или, как вариант, можно использовать характеристику микроорганизмов или сообщества микроорганизмов с применением полногеномного секвенирования методом «дробовика» (WGS).

[075] Термин «субъект» относится к любому субъекту-животному, в том числе человеку, лабораторным животным (например, приматам, крысам, мышам), сельскохозяйственным животным (например, коровам, овцам, козам, свиньям, индейкам и курам) и домашним животным (например, собакам, кошкам и грызунам). Субъект может страдать дисбиозом, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, инфекцией, обусловленной патогеном ЖКТ, или у него возможно имеется риск развития или передачи окружающим инфекции, обусловленной патогеном ЖКТ.

[076] Термин «фенотип» относится к набору поддающихся наблюдению характеристик индивидуального объекта. Например, индивидуальный субъект может иметь фенотип, соответствующий «здоровому состоянию» или «заболеванию». Фенотипы описывают состояние объекта, и все объекты, имеющие определенный фенотип, обладают одинаковым набором характеристик, описывающий указанный фенотип. Фенотип индивидуума обусловлен отчасти или полностью взаимодействием генома и/или микробиома объекта с окружающей средой.

[077] Термин «экосистема» относится к объединению OTU, которые совместно встречаются у ряда субъектов. В настоящем документе «систему» определяют математически с применением графа, отражающего то, как специфические узлы (т.е. OTU) и ребра (соединения между специфическими OTU) соотносятся друг с другом, для определения экологической структуры объединения OTU. Любая заданная экосистема обладает собственным филогенетическим разнообразием и функциональными свойствами. Экосистема может также быть определена через функцию, где, например,

узлы будут включать такие элементы, как, не ограничиваясь перечисленными, ферменты, кластеры ортологичных групп (COGS; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21090/>) или пути KEGG (www.genome.jp/kegg/).

[078] Термины «класс системы», «коровая система» и «коровая экосистема» относятся к группе экосистем, как правило, как определено численными методами, содержат экогруппы с аналогичными филогенетическими и/или функциональными характеристиками. Коровая система, соответственно, содержит важные биологические признаки группы (т.е. кластера), определенные либо филогенетически, либо функционально, родственных экосистем. Одним из вариантов реализации коровой экосистемы является сконструированное объединение микроорганизмов, как правило, непатогенных бактерий, отражающее коровые характеристики набора филогенетически или функционально связанных экосистем, наблюдаемых у большого числа разных субъектов. Во многих случаях коровая система, сконструированная согласно описанию в настоящем документе, существует в виде экосистемы, наблюдаемой у одного или большего количества субъектов. Экогруппы коровой системы подходят для устранения или уменьшения дисбиоза у субъектов в тех случаях, когда была повреждена базовая родственная экосистема.

[079] Термин «ключевые OTU» относится к одной или большему количеству OTU, обычных для многих экосистем и являющихся представителями экосистем, которые встречаются у многих субъектов (т.е. являются распространенными) (фиг. 1). Ввиду универсальной природы ключевых OTU они играют важнейшую роль в функционировании экосистем у здоровых субъектов и часто отсутствуют, либо их уровни снижены, у субъектов с заболеванием. Ключевые OTU могут присутствовать у субъектов с низкой, умеренной или высокой распространенностью.

[080] Термин «неключевые OTU» относится к OTU, наблюдаемым в экосистеме и не являющимся ключевыми OTU.

[081] Термин «филогенетическое разнообразие» относится к биоразнообразию, свойственному определенной экосистеме или коровой экосистеме, по оценке на основании OTU, которые содержатся в указанной системе. Филогенетическое разнообразие представляет собой относительный термин, то есть экосистема или коровая система, сравнительно более филогенетически разнообразная относительно другой системы, содержит большее число уникальных видов, родов и таксономических семейств. Уникальность видов, родов или таксономического семейства обычно определяют с применением филогенетического дерева, которое отражает генетическое разнообразие все видов, родов и таксономических семейств относительно друг друга. Согласно другому варианту реализации филогенетическое разнообразие может быть измерено с применением общей длины ветвей или средней длины ветвей филогенетического дерева.

[082] «Спора», или «эндоспора» относится к элементу, в частности, бактериальному элементу, находящемуся в покоящемся, не вегетативном и не репродуктивном состоянии. Споры обычно устойчивы к стресс-факторам окружающей среды, таким как излучение, высыхание, обработка ферментами, изменение температуры, недостаток питательных веществ и химические дезинфицирующие средства.

[083] «Популяция спор» относится к совокупности спор, присутствующих в композиции. Синонимы, используемые в настоящем документе, включают споровую композицию, состав со спорами, обработанную этанолом споровую фракцию и споровую экогруппу. Популяция спор может быть очищена из донорского фекального материала, например, с применением этанола или термообработки, или разделения в

градиенте плотности, или любой комбинации способов, описанных в настоящем документе, для увеличения чистоты, активности и/или концентрации спор в образце. Как вариант, популяция спор может быть получена с применением методов культивирования, начиная с выделенных спорообразующих видов или спорообразующих

5 ОТУ, или смеси таких видов, в вегетативной форме либо в виде спор.

[084] Согласно одному варианту реализации состав со спорами содержит спорообразующие виды, при этом остаточные неспорообразующие виды инактивированы с применением химической или физической обработки, в том числе этанолом, детергентом, нагреванием, ультразвуком и т.п.; или указанные

10 неспорообразующие виды удалены из состава со спорами путем проведения различных этапов разделения, в том числе разделения в градиенте плотности, центрифугирования, фильтрации и/или хроматографии; либо способы инактивации и разделения комбинируют для получения указанного состава со спорами. Согласно еще одному варианту реализации состав со спорами содержит спорообразующие виды, обогащенные спорами

15 относительно жизнеспособных не образующих спор или вегетативных форм спорообразующих бактерий. Согласно указанному варианту реализации наблюдается 2-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 50-кратное, 100-кратное, 1000-кратное, 10000-кратное или более чем 10000-кратное обогащение по спорам по сравнению со всеми вегетативными формами бактерий. Согласно еще одному варианту реализации споры

20 в споровом составе частично прорастают при обработке и получении препаратов, так что конечная композиция содержит споры и вегетативные бактерии, происходящие из спорообразующих видов.

[085] «Способствующее прорастанию вещество» представляет собой материал, или композицию, или физико-химический процесс, способный индуцировать вегетативный

25 рост у бактерий, которые находятся в покоящейся споровой форме, или группы бактерий в споровой форме, напрямую или опосредованно, в организме-хозяине и/или *in vitro*.

[086] «Индукующий споруляцию агент» представляет собой материал или физико-химический процесс, способный индуцировать споруляцию у бактерий, прямо или

непрямо, в организме-хозяине и/или *in vitro*.

[087] Термин «увеличивать получение бактериальных спор» включает индуцирующую

30 (ий) споруляцию активность или агент. «Получение» включает преобразование вегетативных бактериальных клеток в споры и увеличение скорости такого преобразования, а также уменьшение прорастания бактерий в форме спор, уменьшение скорости разложения спор *in vivo* или *ex vivo*, или увеличение общего выхода спор

35 (например, за счет увеличения объемного выхода фекального материала).

[088] «Колонизация» организма-хозяина включает не носящее временного характера пребывание бактерии или другого микроскопического организма. В настоящем документе «уменьшение колонизации» желудочно-кишечного тракта субъекта-хозяина (или любой другой микробиотической ниши) патогенной бактерией включает

40 уменьшение времени пребывания указанного патогена в желудочно-кишечном тракте, а также снижение количества (или концентрации) указанного патогена в желудочно-кишечном тракте или прикрепленного к люминальной поверхности желудочно-кишечного тракта. Измерение снижения количества адгезивных патогенов может быть продемонстрировано, например, в биопсийном образце, или снижение может быть

45 измерено непрямо, например, путем измерения патогенной нагрузки в экскрементах хозяина-млекопитающего.

[089] «Комбинация» двух или большего числа бактерий включает физическое сосуществование двух бактерий, в одном и том же материале или продукте либо в

физически связанных продуктах, а также совместное по времени введение или колокализацию двух бактерий.

[090] «Цитотоксическая» активность или бактерия включает способность вызывать гибель бактериальной клетки, например, патогенной бактериальной клетки.

5 «Цитостатическая» активность или бактерия включает способность ингибировать, частично или полностью, рост, метаболизм и/или пролиферацию бактериальной клетки, например, патогенной бактериальной клетки.

[091] Не содержащий «непищевых продуктов» означает, что бактериальная композиция или другой описанный в настоящем документе материал не содержит
10 существенного количества несъедобного продукта, например, продукта или материала, непригодного для употребления в пищу, вредного или по иным причинам нежелательного для продукта, подходящего для введения, например, перорального введения, субъекту-человеку. Непищевые продукты часто присутствуют в составах с бактериями, известных из предшествующего уровня техники.

15 [092] В настоящем документе термин «витамин» включает любые из ряда жирорастворимых или водорастворимых органических веществ (неограничивающие примеры включают витамин А, витамин В1 (тиамин), витамин В2 (рибофлавин), витамин В3 (ниацин или ниацинамид), витамин В5 (пантотеновую кислоту), витамин В6 (пиридоксин, пиридоксаль или пиридоксамин, или гидрохлорид пиридоксина), витамин
20 В7 (биотин), витамин В9 (фолиевую кислоту) и витамин В12 (различные кобаламины; в витаминных добавках, как правило, цианокобаламин), витамин С, витамин D, витамин Е, витамин К, К1 и К2 (т.е. МК-4, МК-7), фолиевую кислоту и биотин), необходимые в незначительных количествах для нормального роста и активности организма, и получаемые в естественных условиях из растительной и животной пищи или
25 синтетически, провитамины, производные, аналоги.

[093] В настоящем документе термин «минеральные вещества» включают бор, кальций, хром, медь, йод, железо, магний, марганец, молибден, никель, фосфор, калий, селен, кремний, олово, ванадий, цинк или их комбинации.

[094] В настоящем документе термин «антиоксидант» включает любой один или
30 большее количество различных веществ, таких как бета-каротин (предшественник витамина А), витамин С, витамин Е и селен), которые ингибируют окисление или реакции, стимулируемые реактивными кислородными веществами («ROS») и другими радикалами и не являющимися радикалами веществами. Кроме того, антиоксиданты являются молекулами, которые способны замедлять или предотвращать окисление
35 других молекул. Неограничивающие примеры антиоксидантов включают астаксантин, каротиноиды, кофермент Q10 («CoQ10»), флавоноиды, глутатион, ягоды годжи (дерева), гесперидин, состав на основе молока и ягод годжи (Lacto-Wolfberry), лигнан, лютеин, ликопен, полифенолы, селен, витамин А, витамин С, витамин Е, зеаксантин или их комбинации.

40 КОМПОЗИЦИИ

[095] Раскрытые в настоящем изобретении терапевтические композиции, содержащие непатогенные, способные к прорастанию бактериальные споры, для предотвращения, контроля и лечения заболеваний, расстройств и состояний ЖКТ и поддержания общего
здоровья в области пищеварения. Указанные композиции обладают полезными
45 свойствами, поскольку подходят для безопасного введения человеку и другим субъектам-млекопитающим, а также эффективны при многочисленных желудочно-кишечных заболеваниях, расстройствах и состояниях, и для поддержания общего здоровья в области пищеварения. Хотя композиции на основе спор известны, их обычно получают

с применением других техник, таких как лиофилизация или высушивание распылением жидких бактериальных культур, что приводит к неудовлетворительной эффективности, нестабильности, существенной вариабельности и отсутствию адекватной безопасности и эффективности.

5 [096] Было обнаружено, что популяции бактериальных спор могут быть получены из биологических материалов, полученных от субъектов-млекопитающих, в том числе человека. Указанные популяции вводят в состав композиций согласно настоящему изобретению, и вводят субъектам-млекопитающим с применением способов согласно описанию в настоящем документе.

10 [097] Предложены терапевтические композиции, содержащие очищенную популяцию бактериальных спор. В настоящем документе термины «очищать», «очищенный» и «очищение» относятся к состоянию популяции (например, к совокупности известной или неизвестной численности и/или концентрации) требуемых бактериальных спор, подвергнутых одному или нескольким процессам очищения, например, отбору по
15 требуемым бактериальным спорам или обогащению требуемыми бактериальными спорами, или как вариант, к удалению или уменьшению количества остаточных продуктов среды обитания согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в очищенной популяции отсутствует детектируемая нежелательная активность или, как вариант, уровень или количество нежелательной
20 активности являются приемлемыми или ниже приемлемых уровня или количества. Согласно другим вариантам реализации очищенная популяция содержит приемлемое (ую) количество и/или концентрацию требуемых бактериальных спор или

большее(ую) количество и/или концентрацию. Согласно другим вариантам
25 реализации указанное отношение требуемой и нежелательной активностей (например, спор и вегетативных бактерий), изменялось в 2, 5, 10, 30, 100, 300, 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 или более чем 1×10^8 раз. Согласно другим вариантам реализации очищенная популяция бактериальных спор обогащена относительно исходного материала (например, фекального материала), из которого получают указанную популяцию.
30 Указанное обогащение может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999%, 99,9999% или более чем 99,999999% по сравнению с исходным материалом.

[098] Согласно определенным вариантам реализации в указанных очищенных популяциях бактериальных спор наблюдаются пониженные или недетектируемые
35 уровни одной или большего числа патогенных активностей, таких как токсичность, способность вызывать инфекцию у реципиента - субъекта-млекопитающего, нежелательная иммуномодулирующая активность, аутоиммунный ответ, метаболический ответ, или воспалительный ответ, или неврологическая реакция. Такое уменьшение патогенной активности может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,
40 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999%, или более чем 99,9999% по сравнению с исходным материалом. Согласно другим вариантам реализации в очищенных популяциях бактериальных спор содержится меньше органолептических компонентов по сравнению с фекальным материалом, например, менее выраженный запах, вкус, внешний вид и умами.

45 [099] Предложены очищенные популяции бактериальных спор, по существу не содержащие остаточных продуктов среды обитания. Согласно определенным вариантам реализации это означает, что композиция с бактериальными спорами уже не содержит существенного количества биологического вещества, связанного с сообществом

микроорганизмов, обитающих на организме или в организме субъекта-человека или животного, и очищенная популяция спор может быть на 100%, 99%, 98%, 97%, 96% или 95% очищена от каких-либо загрязнений биологическим веществом, связанным с указанным сообществом микроорганизмов. «По существу не содержащие остаточных

5 продуктов среды обитания» может также означать, что композиция с бактериальными спорами не содержит детектируемых клеток человека или животного, и что детектируются только клетки микроорганизмов, в частности, детектируются только требуемые клетки микроорганизмов. Согласно другому варианту реализации это

10 означает, что менее чем $1 \times 10^{-2}\%$, $1 \times 10^{-3}\%$, $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$, $1 \times 10^{-6}\%$, $1 \times 10^{-7}\%$, $1 \times 10^{-8}\%$ клеток в бактериальной композиции принадлежат человеку или животному, а не микроорганизмам. Согласно другому варианту реализации количество остаточного продукта среды обитания, присутствующего в очищенной популяции, уменьшается по меньшей мере до определенного уровня относительно фекального материала,

15 полученного от донора - субъекта-млекопитающего, например, по меньшей мере приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999% или более чем на 99,9999%.

[0100] Согласно одному варианту реализации «по существу не содержащие остаточных продуктов среды обитания» или «по существу не содержащие патогенного

20 материала на детектируемом уровне» означает, что бактериальная композиция не содержит детектируемых вирусных загрязнений (в том числе бактериальных вирусов (т.е. фагов)), грибных, микоплазменных или токсоплазменных загрязнений, или эукариотических паразитов, например, гельминтов. Как вариант, очищенные популяции спор по существу не содержат бесклеточного материала, например, ДНК, материала вирусной оболочки или нежизнеспособного бактериального материала. Как вариант,

25 очищенная популяция спор может быть обработана способом, который обеспечивает гибель, инактивацию или устранение одного или большего количества специфических нежелательных вирусов, таких как кишечный вирус, в том числе норовирус, полиовирус или вирус гепатита А.

[0101] Согласно описанию в настоящем документе, очищение популяций спор может

30 быть продемонстрировано с помощью генетического анализа (например, ПЦР, секвенирования ДНК), серологического и антигенного анализа, микроскопического анализа, анализа микроорганизмов, в том числе прорастания и культивирования, и способов с применением таких инструментов, как проточная цитометрия с реагентами для различения требуемых бактериальных спор и нежелательных загрязняющих

35 материалов.

[0102] Примеры биологических материалов включают фекальные материалы, такие как экскременты, или материалы, выделенные из различных сегментов тонкого и толстого кишечника. Фекальные материалы получают от донора - субъекта-млекопитающего, или они могут быть получены от более чем одного субъекта-донора,

40 например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 или от более чем 1000 доноров, при этом такие материалы затем объединяют до очищения требуемых бактериальных спор. Согласно другому варианту реализации фекальные материалы могут быть получены многократно от единственного субъекта-донора и может быть объединена совокупность образцов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

45 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 48, 50, 100 образцов от единственного донора.

[0103] Согласно альтернативным вариантам реализации указанные требуемые бактериальные споры очищают из одного образца фекального материала, полученного от единственного донора, и после такого очищения комбинируют с очищенными

популяциями спор, также полученными при очищении, либо от одного и того же донора в разные моменты времени, или от одного или нескольких разных доноров, или используют оба варианта.

[0104] Доноры - субъекты-млекопитающие обычно отличаются нормальным состоянием здоровья и обладают микробиотой, соответствующей указанному нормальному состоянию здоровья. Часто субъектам-донорам не вводили соединений с антибиотической активностью в течение определенного периода времени перед получением фекального материала. Согласно определенным вариантам реализации указанные субъекты-доноры не страдают ожирением или избыточной массой тела, и могут иметь показатели индекса массы тела (ИМТ) ниже 25, например, от 18,5 до 24,9. Согласно другим вариантам реализации субъекты-доноры не имеют психических заболеваний или не имеют в личном или семейном анамнезе психических заболеваний, таких как тревожное расстройство, депрессия, биполярное расстройство, расстройства аутистического спектра, шизофрения, панические расстройства, расстройства, связанные с дефицитом внимания (гиперактивностью), расстройства пищевого поведения или расстройства настроения. Согласно другим вариантам реализации у субъектов-доноров отсутствует заболевание, связанное с раздражением кишечника (например, болезнь Крона, язвенный колит), синдром раздраженного кишечника, целиакия, рак ободочной и прямой кишки или указанные заболевания отсутствуют в семейном анамнезе. Согласно другим вариантам реализации проводят скрининг доноров на переносимые с кровью патогены и передающиеся через фекалии патогены с применением стандартных техник, известных специалистам в данной области техники (например, тестирования на нуклеиновые кислоты, серологического тестирования, тестирования на антигены, техник культивирования, ферментативного анализа, анализов бесклеточных фекальных фильтратов на токсины на чувствительных субстратах - клеточных культурах).

[0105] Согласно некоторым вариантам реализации доноров также отбирают на основании присутствия определенных родов и/или видов, обеспечивающих повышенную эффективность терапевтических композиций, содержащих указанные роды или виды. Согласно другим вариантам реализации в фекальном материале предпочтительных доноров образуются относительно более высокие концентрации спор, чем у других доноров. Согласно дополнительным вариантам реализации предпочтительные доноры обеспечивают фекальный материал, из которого очищают споры, отличающиеся повышенной эффективностью; указанную повышенную эффективность измеряют в исследованиях *in vitro* или на животных согласно приведенному ниже описанию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный донор может подвергаться одной или нескольким обработкам до взятия донорского материала для уменьшения количества нежелательного материала в фекальном материале и/или увеличения количества требуемых популяций спор.

[0106] Целесообразно проводить скрининг состояния здоровья субъекта-донора перед и, необязательно, один или несколько раз после сбора фекального материала. Такой скрининг позволяет идентифицировать доноров-носителей патогенных материалов, такие как вирусы (ВИЧ, гепатит, полиовирус) и патогенные бактерии. После сбора материала проводят скрининг доноров в течение приблизительно одной недели, двух недель, трех недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, шести месяцев, одного года или более чем одного года, и такой скрининг может проводиться ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, раз в полгода или ежегодно. Доноров, которые прошли скрининг, результаты тестов для которых не были положительными до или после, либо ни до, ни после отбора донорского материала,

считают «валидированными» донорами.

[0107] Обработка растворителем. Для очищения бактериальных спор фекальный материал один или несколько раз обрабатывают растворителем. Обработка растворителем представляет собой обработку смешивающимся растворителем (частично смешивающимся или полностью смешивающимся) или обработку несмешивающимся растворителем. Смешиваемость представляет собой способность двух жидкостей смешиваться друг с другом с образованием гомогенного раствора. Вода и этанол, например, полностью смешиваются, так что смесь, содержащая воду и этанол в любом соотношении, будет однофазной. Смешиваемость выражают через массовые % или через массу одного из растворителей на 100 г конечного раствора. Если два растворителя полностью смешиваются в любых пропорциях, их смешиваемость составляет 100%. Полностью смешивающиеся с водой растворы образуют спирты, например, метанол, этанол, изопропанол, бутанол, пропандиол, бутандиол и т.д. Спирты могут быть заранее соединены с водой; например, могут быть представлены в виде 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 89%, 85%, 90%, 95% или более чем 95% раствором. Другие растворители являются только частично смешивающимися, что означает, что только определенная часть растворяется в воде. Простой диэтилэфир, например, частично способен смешиваться с водой. До 7 г простого диэтилэфира растворяются в 93 г воды с получением 7% (масс. %) раствора. Если добавить большее количество диэтилэфира, образуется двухфазный раствор с отдельным слоем диэтилэфира над водой. Другие частично смешиваемые материалы включают простые эфиры, пропаноат, бутаноат, хлороформ, диметоксиэтан или тетрагидрофуран. С другой стороны, масло, например, алкан и вода являются несмешиваемыми и образуют две фазы. Также обработку несмешивающимся растворителем необязательно комбинируют с детергентом, либо ионогенным, либо неионогенным. Примеры детергентов включают Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Nonidet P40, плүроник или полиол. Этапы обработки растворителем снижает жизнеспособность неспорообразующих бактериальных видов на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, или на 99,9999%, и он может необязательно снижать жизнеспособность контаминирующих протистов, паразитов и/или вирусов.

[0108] Хроматографическая обработка. Для очищения популяций спор фекальные материалы подвергают одной или нескольким хроматографическим обработкам, последовательно или параллельно. При хроматографической обработке раствор, содержащий фекальный материал, приводят в контакт с твердой средой, содержащей а среду для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC) или среду для аффинной хроматографии. Согласно альтернативному варианту реализации твердую среду, способную абсорбировать остаточный продукт среды обитания, присутствующий в фекальном материале, приводят в контакт с твердой средой, которая адсорбирует остаточный продукт среды обитания. Согласно определенным вариантам реализации указанная среда для HIC содержит сефарозу или дериватизированную сефарозу, например, бутилсефарозу, октилсефарозу, фенилсефарозу или бутил-s-сефарозу. Согласно другим вариантам реализации указанная среда для аффинной хроматографии содержит материал, дериватизированный муцином типа I, II, III, IV, V или VI, или олигосахаридами, происходящими из муцинов или аналогичными происходящим из муцинов типа I, II, III, IV, V или VI. Как вариант, среда для аффинной хроматографии содержит материал, дериватизированный антителами, распознающими споробразующие бактерии.

[0109] Механическая обработка. Предложено физическое разрушение фекального

материала, в частности, путем одной или нескольких механических обработок, таких как смешивание, перемешивание, встряхивание, обработка на вортексе, ударная
 5 пульверизация и обработка ультразвуком. Согласно настоящему изобретению указанная обработка с механическим разрушением по существу разрушает неспортивный материал, присутствующий в фекальном материале, и по существу не разрушает споры,
 присутствующие в фекальном материале, или может разрушать спорный материал в
 меньшей степени, чем неспортивный материал, например, в 2 раза, в 5, 10, 30, 100, 300,
 10 1000 или более чем в 1000 раз. Кроме того, механическая обработка гомогенизирует материал для последующего взятия образцов, тестирования и обработки. Механическая
 обработка необязательно включает обработку фильтрацией, при которой нужные
 популяции спор остаются на фильтре, а нежелательные (неспорные) фекальные
 компоненты проходят через фильтр, и затем спорную фракцию извлекают из
 фильтрующей среды. Как вариант, нежелательные частицы и эукариотические клетки
 15 могут оставаться на фильтре, а бактериальные клетки, в том числе споры, могут
 проходить через фильтр. Согласно некоторым вариантам реализации спорную
 фракцию, остающуюся на фильтре, подвергают диафильтрации, при этом указанные
 оставшиеся споры приводят в контакт с жидкостью для промывания, как правило,
 стерильным содержащим соли раствором или другим разбавителем, таким как
 совместимый с водой полимер, например, раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) с низкой
 20 молекулярной массой, для дополнительного уменьшения количества или удаления
 нежелательных фекальных компонентов.

[0110] Термообработка. Предложено термическое разрушение фекального материала. Обычно фекальный материал смешивают с содержащим соли раствором, таким как
 25 забуференный фосфатом солевой раствор (ФСБ), и помещают в среду с повышенной
 температурой, например, в теплую комнату, инкубатор, на водяную баню, или т.п.,
 таким образом, чтобы между нагретой средой и фекальным материалом происходил
 эффективный теплообмен. Предпочтительно раствор фекального материала
 перемешивают во время инкубирования для увеличения теплопроводности и разрушения
 агрегатов частиц. Термообработка может модулироваться за счет температуры
 30 окружающей среды и/или продолжительности термообработки. Например, фекальный
 материал или жидкость, содержащую фекальный материал, подвергают воздействию
 среды с повышенной температурой, например, горячей водяной бани, температура
 которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,
 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более чем 100°C, в течение по меньшей мере
 35 приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 секунд, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30,
 40 или 50 минут, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 часов. Согласно определенным
 вариантам реализации термообработка происходит при двух различных температурах,
 например, в течение 30 секунд в среде с температурой 100 градусов Цельсия, а затем в
 течение 10 минут в среде с температурой 50 градусов Цельсия. Согласно
 40 предпочтительным вариантам реализации температура и продолжительность
 термообработки являются достаточными для гибели или удаления патогенных
 материалов, и при этом по существу не повреждают или не уменьшают, количество
 способных к прорастанию спор. Согласно другим предпочтительным вариантам
 реализации температура и продолжительность термообработки являются достаточно
 45 небольшими для уменьшения прорастания популяции спор.

[0111] Обработка облучением. Предложены способы обработки фекального
 материала или разделенных компонентов фекального материала ионизирующим
 излучением, как правило, гамма-излучением, ультрафиолетовым излучением или

облучением электронным пучком с обеспечением уровня энергии, достаточного для гибели патогенных материалов, но по существу не повреждающего нужные популяции спор. Например, ультрафиолетовое излучение с длиной волны 254 нм с обеспечением

5 уровня энергии, составляющим менее чем приблизительно 22000 мкВт на см² в секунду, обычно не разрушает требуемые споры.

[0112] Обработка центрифугированием и разделение по плотности. Предложены способы отделения требуемых популяций спор от других компонентов фекального материала путем центрифугирования. Раствор, содержащий фекальный материал, один

10 или несколько раз обрабатывают центрифугированием, например, приблизительно при 200×g, 1000×g, 2000×g, 3000×g, 4000×g, 5000×g, 6000×g, 7000×g, 8000×g или более чем 8000×g. Дифференциальное центрифугирование позволяет отделить требуемые споры от нежелательного неспорового материала; при малых мощностях споры остаются в растворе, а при более высоких мощностях споры осаждаются, тогда как

15 примеси меньшего размера (например, вирусные частицы, фаги, микроскопические волокна, биологические макромолекулы, такие как свободный белок, нуклеиновые кислоты и липиды) остаются в растворе. Например, при первом центрифугировании с малой мощностью осаждаются волокнистые материалы; при втором центрифугировании с большей мощностью осаждаются нежелательные эукариотические клетки, а при

20 третьем центрифугировании с еще большей мощностью осаждаются требуемые споры, однако загрязняющие примеси более малого размера остаются в суспензии. Согласно некоторым вариантам реализации градиенты или «подушки» плотности или подвижности (например, «ступенчатые подушки»), такие как градиенты CsCl, перколлы, фикола, никоденза, гистоденза или градиенты сахарозы, используют для разделения требуемых популяций спор и других материалов в фекальном материале.

25 [0113] Также в настоящем документе предложены способы получения популяций спор, сочетающие два или большее число вариантов обработки, описанных в настоящем документе, для синергетического очищения требуемых спор наряду с уничтожением или удалением нежелательных материалов и/или активностей из популяции спор. Как

30 правило, желательно сохранение популяций спор в не способствующих прорастанию и росту условиях и средах, для минимизации роста патогенных бактерий, присутствующих в популяциях спор, и для минимизации прорастания спор с образованием вегетативных бактериальных клеток.

[0114] Очищенные популяции спор. Согласно описанию в настоящем документе очищенные популяции спор содержат комбинации комменсальных бактерий кишечной

35 микробиоты человека, обладающие способностью значительно способствовать функции здоровой микробиоты при введении субъекту-млекопитающему. Считается, что, не ограничиваясь конкретным механизмом, такие композиции ингибируют рост патогена, такого как *C. difficile*, *Salmonella* spp., энтеропатогенные *E. coli*, *Fusobacterium* spp., *Klebsiella* spp. и устойчивые к ванкомицину *Enterococcus* spp., таким образом, что может

40 поддерживаться здоровая, разнообразная защитная микробиота или, в случае инфекций патогенными бактериями, например, инфекции *C. difficile*, заново заселять просвет кишечника для восстановления экологического контроля над потенциальными патогенами. Согласно одному варианту реализации очищенные популяции спор могут приживаться у хозяина и присутствовать в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней,

45 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 дней, 25 дней, 30 дней, 60 дней, 90 дней или дольше чем 90 дней. Кроме того, очищенные популяции спор могут индуцировать приживание у хозяина других здоровых комменсальных бактерий, обнаруживаемых в здоровом кишечнике, не присутствующих в указанных очищенных популяциях спор или

присутствующих в меньшем количестве, и, соответственно, считается, что указанные виды «стимулируют» введенные популяции спор. Таким образом, стимуляция комменсальных видов в очищенной популяции спор в кишечнике реципиента приводит к формированию более разнообразной популяции кишечной микробиоты по сравнению с присутствующей изначально.

[0115] Предпочтительные бактериальные роды включают *Acetanaerobacterium*, *Acetivibrio*, *Alicyclobacillus*, *Alkaliphilus*, *Anaerofustis*, *Anaerosporebacter*, *Anaerostipes*, *Anaerotruncus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Brachyspira*, *Brevibacillus*, *Bryantella*, *Bulleidia*, *Butyricoccus*, *Butyrivibrio*, *Catenibacterium*, *Chlamydiales*, *Clostridiaceae*, *Clostridiales*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprobacillus*, *Coprococcus*, *Coxiella*, *Deferribacteres*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Dorea*, *Eggerthella*, *Erysipelothrix*, *Erysipelotrichaceae*, *Ethanoligenens*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Filifactor*, *Flavonifractor*, *Flexistipes*, *Fulvimonas*, *Fusobacterium*, *Gemmiger*, *Geobacillus*, *Gloeobacter*, *Holdemania*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Kocuria*, *Lachnobacterium*, *Lachnospira*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillus*, *Lactonifractor*, *Leptospira*, *Lutispora*, *Lysinibacillus*, *Mollicutes*, *Moorella*, *Nocardia*, *Oscillibacter*, *Oscillospira*, *Paenibacillus*, *Papillibacter*, *Pseudoflavonifractor*, *Robinsoniella*, *Roseburia*, *Ruminococcaceae*, *Ruminococcus*, *Saccharomonospora*, *Sarcina*, *Solobacterium*, *Sporobacter*, *Sporolactobacillus*, *Streptomyces*, *Subdoligranulum*, *Sutterella*, *Syntrophococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobifida*, *Turicibacter*

[0116] Предпочтительные бактериальные виды представлены в таблице 1 и отмечены как спорообразующие. В тех случаях, когда приведены конкретные штаммы вида, специалисту в данной области техники будет понятно, что приведенный штамм может быть заменен на другие штаммы указанного вида.

[0117] Согласно некоторым вариантам реализации спорообразующие бактерии идентифицируют по присутствию последовательностей нуклеиновых кислот, которые модулируют споруляцию. В частности, характерные для споруляции гены высококонсервативны у всех представителей дальнородственных родов, в том числе *Clostridium* и *Bacillus*. С применением традиционных подходов «прямой» генетики были идентифицированы многие, если не все, гены, критически важные для споруляции (*spo*). Программа развития споруляции частично управляется последовательным действием четырех компартмент-специфических сигма-факторов (наблюдаемых в следующем порядке: σ^F , σ^E , σ^G и σ^K), активность которых ограничена протспорой (σ^F и σ^G) или материнской клеткой (σ^E и σ^K). Согласно другим вариантам реализации спорообразующие бактерии идентифицируют по биохимической активности продуцирующих ДПК ферментов или путем анализа содержания ДПК в культурах. В ходе бактериальной споруляции продуцируются большие количества ДПК, составляющие 5-15% от массы споры. Поскольку не все жизнеспособные споры прорастают и растут в известных условиях среды, сложно оценить общее число спор в популяции бактерий. Таким образом, измеренное содержание ДПК хорошо коррелирует с содержанием спор и представляет собой подходящий показатель для определения общего содержания спор в бактериальной популяции.

[0118] Предложены популяции спор, содержащие более чем один тип бактерий. В настоящем документе «тип» или более одного «типа» бактерий может различаться на уровне рода, вида, подвида, штамма, или с применением любого другого таксономического метода, согласно описанию в настоящем документе и иными известными в данной области техники способами.

[0119] Согласно некоторым вариантам реализации все или по существу все бактериальные споры, присутствующие в очищенной популяции, получены из фекального материала, обработанного согласно описанию в настоящем документе

или иным известным способом в данной области техники. Согласно альтернативным вариантам реализации одну или большее количество бактериальных спор или типов бактериальных спор получают в культуре и комбинируют для получения очищенной популяции спор. Согласно другим альтернативным вариантам реализации одну или

5 большее количество указанных полученных в культуре популяций спор комбинируют с полученной из фекального материала популяцией спор для получения гибридной популяции спор. Бактериальные композиции могут содержать по меньшей мере два типа указанных предпочтительных бактерий, в том числе штаммы одного вида. Например, бактериальная композиция может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, или по меньшей мере 20 или более чем 20 типов бактерий, по оценке на основании видов

15 или функциональной таксономической единицы (OTU), включающей такие виды.

[0120] Таким образом, предложены способы получения композиции, содержащей популяцию бактериальных спор, подходящую для терапевтического введения нуждающемуся в этом субъекту-млекопитающему. Указанную композицию получают, как правило, путем проведения этапов: (a) получения фекального материала,

20 полученного от донора - субъекта-млекопитающего; и (b) проведения по меньшей мере одного варианта очищения или этапа очищения указанного фекального материала в таких условиях, чтобы получить из указанного фекального материала популяцию бактериальных спор. Состав с указанной композицией получают таким образом, что

одна доза для перорального приема содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^4 колониеобразующих единиц указанных бактериальных спор, и одна доза для

перорального приема, как правило, содержит приблизительно 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} или более чем 1×10^{15} КОЕ указанных бактериальных спор. Присутствие и/или концентрация определенного

30 типа бактериальных спор могут быть известны или неизвестны в определенной очищенной популяции спор. В случае, когда известна, например, концентрация спор

определенного штамма, или совокупности всех штаммов составляет, например, 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} или более

35 чем 1×10^{15} жизнеспособных бактериальных спор на грамм композиции или на введенную дозу.

[0121] В некоторых составах указанная композиция содержит по меньшей мере приблизительно 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более чем 90% спор по массе. В некоторых составах введенная доза не превышает 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мг или 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; или 1,9 г по

40 массе. [0122] Бактериальные споровые композиции обычно вводят в составы для перорального введения или гастрального введения, как правило, субъекту-млекопитающему. Согласно конкретным вариантам реализации указанную композицию вводят в состав для перорального введения в твердой, полутвердой, гелевой или жидкой форме, например, в форме пилюль, таблеток, капсул или пастилок. Согласно некоторым вариантам реализации такие составы содержат кишечнорастворимое покрытие или покрыты кишечнорастворимым покрытием для защиты бактерий при прохождении

через желудок и тонкий кишечник, хотя споры обычно устойчивы в желудке и тонком кишечнике. Согласно другим вариантам реализации указанные бактериальные споровые композиции могут быть введены в состав со способствующим прорастанию веществом для улучшения приживления или эффективности. Согласно другим вариантам реализации

5 указанные бактериальные споровые композиции могут быть введены в состав с пребиотическими веществами или вводиться вместе с пребиотическими веществами для улучшения приживления или эффективности.

[0123] Может быть получен состав с бактериальными споровыми композициями, эффективный у определенного субъекта-млекопитающего при однократном введении

10 или при многократном введении. Например, однократное введение по существу эффективно для уменьшения содержания *Cl. difficile* и/или токсина *Cl. difficile* у субъекта-млекопитающего, которому вводят указанную композицию. По существу эффективный означает, что содержание *Cl. difficile* и/или токсин *Cl. difficile* у субъекта уменьшается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или

15 более чем на 99% после введения указанной композиции. Как вариант, эффективность может быть измерена по отсутствию симптомов диареи или отсутствию носительства *C. difficile* или токсина *C. difficile* через 2 дня, 4 дня, 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 8 недель или более 8 недель.

Бактериальные композиции

[0124] Предложены бактерии и комбинации бактерий кишечной микробиоты человека, обладающие способностью значимо способствовать функциям здоровой микробиоты при введении хозяевам-млекопитающим. Считается, не ограничиваясь конкретным механизмом, что такие композиции ингибируют рост, пролиферацию, и/или колонизацию

20 одной или множества(ом) патогенных бактерий в дисбиотической микробиотической нише, таким образом нормальная разнообразная защитная микробиота колонизирует и заселяет просвет кишечника для формирования или восстановления экологического контроля над патогенами или потенциальными патогенами (например, некоторые бактерии являются патогенными только при присутствии в дисбиотической среде). Ингибирование патогенов включает такие патогены, такие как *C. difficile*, *Salmonella*

30 *spp.*, энтеропатогенные *E. coli*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью бактерии, такие как *Klebsiella* и *E. coli*, устойчивые к карбапенемам *Enterobacteriaceae* (CRE), устойчивые к бета-лактамам расширенного спектра *Enterococci* (ESBL) и устойчивые к ванкомицину *Enterococci* (VRE).

[0125] В настоящем документе «тип» или более одного «типа» бактерий может

35 различаться на уровне рода, вида, подвида, штамма или с применением любого другого таксономического метода, согласно описанию в настоящем документе и иными известными в данной области техники способами.

[0126] Бактериальные композиции могут содержать два типа бактерий (называясь «бинарными комбинациями» или «бинарными парами») или более чем два типа бактерий.

40 Например, бактериальная композиция может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по

45 меньшей мере 20, или по меньшей мере 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или более чем 50 типов бактерий, по оценке на основе видов или функциональных таксономических единиц (OTU), или иным образом согласно описанию в настоящем документе.

[0127] Согласно другому варианту реализации число типов бактерий, присутствующих в бактериальной композиции, равно известному значению или ниже известного значения. Например, в таких вариантах реализации бактериальная композиция содержит 50 или менее типов бактерий, например, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, или 10 или менее, или 9 или менее типов бактерий, 8 или менее типов бактерий, 7 или менее типов бактерий, 6 или менее типов бактерий, 5 или менее типов бактерий, 4 или менее типов бактерий, или 3 или менее типов бактерий. Согласно другому варианту реализации бактериальная композиция содержит от 2 до не более чем 40, от 2 до не более чем 30, от 2 до не более чем 20, от 2 до не более чем 15, от 2 до не более чем 10, или от 2 до не более чем 5 типов бактерий.

Бактериальные композиции, описанные через виды

[0128] Могут быть получены бактериальные композиции, содержащие по меньшей мере два типа выделенных бактерий, выбранных из видов в таблице 1.

[0129] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Enterococcus faecalis* (ранее была известна как *Streptococcus faecalis*), *Clostridium innocuum*, *Clostridium ramosum*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Escherichia coli* (1109 и 1108-1), *Clostridium bif fermentans* и *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus*). Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0130] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Enterococcus faecalis* (ранее была известна как *Streptococcus faecalis*), *Clostridium innocuum*, *Clostridium ramosum*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Escherichia coli* (1109 и 1108-1), *Clostridium bif fermentans* и *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus*). Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0131] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну из предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Acidaminococcus intestinalis*, *Bacteroides ovatus*, два штамма *Bifidobacterium adolescentis*, два штамма *Bifidobacterium longum*, *Blautia producta*, *Clostridium cocleatum*, *Collinsella aerofaciens*, два штамма *Dorea longicatena*, *Escherichia coli*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium eligens*, *Eubacterium limosum*, четыре штамма *Eubacterium rectale*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospira pectinoshiza*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Paracateroides distasonis*, *Raoultella* sp., один штамм *Roseburia* (выбранный из *Roseburia faecalis* или *Roseburia faecis*), *Roseburia intestinalis*, два штамма *Ruminococcus torques*, два штамма *Ruminococcus obeum* и *Streptococcus mitis*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0132] Согласно еще одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Barnesiella intestinihominis*; *Lactobacillus reuteri*; вид,

описанный как один из *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium* или *Enterococcus durans*; вид, описанный как один из *Anaerostipes saccae* или *Clostridium indolis*; вид, описанный как один из *Staphylococcus warneri* или *Staphylococcus pasteurii*; и *Adiercreutzia equolifaciens*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0133] Согласно другим вариантам реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Clostridium absonum*, *Clostridium argentinense*, *Clostridium baratii*, *Clostridium bartlettii*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium camis*, *Clostridium celatum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium difficile*, *Clostridium fallax*, *Clostridium felsineum*, *Clostridium ghonii*, *Clostridium glycolicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium hastiforme*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium indolis*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium irregulare*, *Clostridium limosum*, *Clostridium malenominatum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium oroticum*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium piliforme*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium sardiniense*, *Clostridium sartagoforme*, *Clostridium scindens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sphenoides*, *Clostridium spiroforme*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium tertium*, *Clostridium tetani*, *Clostridium welchii* и *Clostridium villosum*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0134] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Clostridium innocuum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, три штамма *Escherichia coli* и *Lactobacillus* sp. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0135] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Clostridium bifermentans*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium butyricum*, три штамма *Escherichia coli*, три штамма *Bacteroides* и *Blautia producta*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0136] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Bacteroides* sp., *Escherichia coli* и непатогенная *Clostridia*, в том числе *Clostridium innocuum*, *Clostridium bifermentans* и *Clostridium ramosum*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0137] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: виды *Bacteroides*, *Escherichia coli* и непатогенная *Clostridia*, например, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifermentans* и *Clostridium innocuum*. Согласно

альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

5 [0138] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Bacteroides caccae*, *Bacteroides capillosus*, *Bacteroides coagulans*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides forsythus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides fragilis-ryhm*, *Bacteroides gracilis*, *Bacteroides levii*, *Bacteroides macacae*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides pneumosintes*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides*
10 *pyogenes*, *Bacteroides splanchnicus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides tectum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ureolyticus* и *Bacteroides vulgatus*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

15 [0139] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Fusobacteria*, *Propionibacteria*, *Lactobacilli*, анаэробные кокки, *Ruminococcus*, *Escherichia coli*, *Gemmiger*, *Desulfomonas* и *Peptostreptococcus*. Согласно альтернативному варианту реализации по меньшей мере
20 какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

[0140] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция содержит по меньшей мере какую-либо одну и, предпочтительно, более чем одну из следующих бактерий: *Bacteroides fragilis ss. Vulgatus*, *Eubacterium aerofaciens*, *Bacteroides*
25 *fragilis ss. Thetaiotaomicron*, *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus II*), *Bacteroides fragilis ss. Distasonis*, *Fusobacterium prausnitzii*, *Coprococcus eutactus*, *Eubacterium aerofaciens III*, *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus I*), *Ruminococcus bronii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Gemmiger formicilis*, *Bifidobacterium longum*, *Eubacterium siraeum*, *Ruminococcus torques*, *Eubacterium rectale III-*
30 *H*, *Eubacterium rectale IV*, *Eubacterium eligens*, *Bacteroides eggerthii*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis ss. A*, *Eubacterium biforme*, *Bifidobacterium infantis*, *Eubacterium rectale III-F*, *Coprococcus comes*, *Bacteroides capillosus*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium formicigenerans*, *Eubacterium hallii*, *Eubacterium ventriosum I*, *Fusobacterium russii*, *Ruminococcus obeum*, *Eubacterium rectale II*, *Clostridium ramosum I*, *Lactobacillus leichmanii*,
35 *Ruminococcus cailidus*, *Butyrivibrio crossotus*, *Acidaminococcus fermentans*, *Eubacterium ventriosum*, *Bacteroides fragilis ss. fragilis*, *Bacteroides AR*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium hadrum*, *Eubacterium cylindroides*, *Eubacterium ruminantium*, *Eubacterium CH-1*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus BL*, *Eubacterium limosum*, *Bacteroides praeacutus*, *Bacteroides L*, *Fusobacterium mortiferum I*, *Fusobacterium naviforme*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium*
40 *ramosum*, *Propionibacterium acnes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus AT*, *Peptococcus AU-1*, *Eubacterium AG*, -AK, -AL, -AL-1, -AN; *Bacteroides fragilis ss. ovatus*, -ss. d, -ss. f; *Bacteroides L-1*, *L-5*; *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum*, *Escherichia coli*, *Streptococcus morbillorum*, *Peptococcus magnus*, *Peptococcus G*, *AU-2*; *Streptococcus intermedius*, *Ruminococcus lactaris*, *Ruminococcus CO Gemmiger X*, *Coprococcus BH*, -CC; *Eubacterium*
45 *tenue*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium AE*, -AG-H, -AG-M, -AJ, -BN-1; *Bacteroides clostridiiformis ss. clostridiiformis*, *Bacteroides coagulans*, *Bacteroides orails*, *Bacteroides ruminicola ss. brevis*, -ss. *ruminicola*, *Bacteroides splanchnicus*, *Desulfomonas pigra*, *Bacteroides L-4*, -N-i; *Fusobacterium H*, *Lactobacillus G* и *Succinivibrio A*. Согласно альтернативному

варианту реализации по меньшей мере какой-либо один из вышеперечисленных видов по существу не присутствует в указанной бактериальной композиции.

Бактериальные композиции, определенные через функциональные таксономические единицы (OTU)

[0141] Могут быть получены бактериальные композиции, содержащие по меньшей мере два типа выделенных бактерий, выбранные из видов в таблице 1.

[0142] Согласно одному варианту реализации OTU могут характеризоваться одной или большим количеством переменных областей последовательности 16S (V1-V9). Указанные области у бактерий определяют нуклеотиды 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 и 1435-1465, соответственно, с применением нумерации на основе системы номенклатуры *E. coli*. (См., например, Brosius et al., Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, PNAS 75 (10):4801-4805 (1978)). Согласно некоторым вариантам реализации для определения OTU используют по меньшей мере какую-либо одну из областей V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 и V9. Согласно одному варианту реализации области V1, V2, и V3 используют для определения OTU. Согласно другому варианту реализации области V3, V4, и V5 используют для определения OTU. Согласно другому варианту реализации область V4 используют для определения OTU.

Бактериальные композиции, не содержащие определенных бактериальных видов или штаммов

[0143] Согласно одному варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Enterococcus faecalis* (ранее была известна как *Streptococcus faecalis*), *Clostridium innocuum*, *Clostridium ramosum*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Escherichia coli* (1109 и 1108-1), *Clostridium bifementans* и *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus*).

[0144] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Acidaminococcus intestinalis*, *Bacteroides ovatus*, два вида *Bifidobacterium adolescentis*, два вида *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens*, два вида *Dorea longicatena*, *Escherichia coli*, *Eubacterium eligens*, *Eubacterium limosum*, четыре вида *Eubacterium rectale*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Paracateroides distasonis*, *Raoultella* sp., один вид *Roseburia* (выбранный из *Roseburia faecalis* или *Rosebuna faecis*), *Roseburia intestinalis*, два вида *Ruminococcus torques* и *Streptococcus mitis*.

[0145] Согласно еще одному варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Barnesiella intestinihominis*; *Lactobacillus reuteri*; вид, описанный как один из *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*, или *Enterococcus durans*; вид, описанный как один из *Anaerostipes caccae* или *Clostridium indolis*; вид, описанный как один из *Staphylococcus warneri* или *Staphylococcus pasteurii*; и *Adiercreutzia equolifaciens*.

[0146] Согласно другим вариантам реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере что-либо одно из *Clostridium absonum*, *Clostridium argentinense*, *Clostridium baratii*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium camis*, *Clostridium celatum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium difficile*, *Clostridium fallax*, *Clostridium felsineum*, *Clostridium ghonii*, *Clostridium glycolicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium hastiforme*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium indolis*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium irregulare*, *Clostridium limosum*, *Clostridium malenominatum*, *Clostridium novyi*,

Clostridium oroticum, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium piliforme*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium putrificum*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium sardiniense*, *Clostridium sartagoforme*, *Clostridium scindens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sphenoides*, *Clostridium spiroforme*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium tertium*, *Clostridium tetani*, *Clostridium welchii* и *Clostridium villosum*.

[0147] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Clostridium innocuum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, три штамма *Escherichia coli* и *Lactobacillus sp.*

[0148] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Clostridium bifermentans*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium butyricum*, три штамма *Escherichia coli*, три штамма *Bacteroides* и *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus*).

[0149] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Bacteroides sp.*, *Escherichia coli*, и непатогенной *Clostridia*, в том числе *Clostridium innocuum*, *Clostridium bifermentans* и *Clostridium ramosum*.

[0150] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из более чем одного вида *Bacteroides*, *Escherichia coli* и непатогенной *Clostridia*, например, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifermentans* и *Clostridium innocuum*.

[0151] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Bacteroides caccae*, *Bacteroides capillosus*, *Bacteroides coagulans*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides forsythus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides fragilis-ryhm*, *Bacteroides gracilis*, *Bacteroides levii*, *Bacteroides macacae*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides pneumosintes*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides pyogenes*, *Bacteroides splanchnicus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides tectum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ureolyticus* и *Bacteroides vulgatus*.

[0152] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Fusobacteria*, *Propionibacteria*, *Lactobacilli*, анаэробных кокков, *Ruminococcus*, *Escherichia coli*, *Gemmiger*, *Desulfomonas* и *Peptostreptococcus*.

[0153] Согласно другому варианту реализации указанная бактериальная композиция не содержит по меньшей мере какую-либо одну бактерию из *Bacteroides fragilis ss. Vulgatus*, *Eubacterium aerofaciens*, *Bacteroides fragilis ss. Thetaiotaomicron*, *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus II*), *Bacteroides fragilis ss. Distasonis*, *Fusobacterium prausnitzii*, *Coprococcus eutactus*, *Eubacterium aerofaciens III*, *Blautia producta* (ранее была известна как *Peptostreptococcus productus I*), *Ruminococcus bromii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Gemmiger formicilis*, *Bifidobacterium longum*, *Eubacterium siraeum*, *Ruminococcus torques*, *Eubacterium rectale III-H*, *Eubacterium rectale IV*, *Eubacterium eligens*, *Bacteroides eggerthii*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis ss. A*, *Eubacterium biforme*, *Bifidobacterium infantis*, *Eubacterium rectale III-F*, *Coprococcus comes*, *Bacteroides capillosus*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium formicigenerans*, *Eubacterium hallii*, *Eubacterium ventriosum I*, *Fusobacterium russii*, *Ruminococcus obeum*, *Eubacterium rectale II*, *Clostridium ramosum I*, *Lactobacillus leichmanii*, *Ruminococcus cailidus*, *Butyrivibrio crossotus*, *Acidaminococcus fermentans*, *Eubacterium ventriosum*, *Bacteroides fragilis ss. fragilis*, *Bacteroides AR*, *Coprococcus*

catus, *Eubacterium hadrum*, *Eubacterium cylindroides*, *Eubacterium ruminantium*, *Eubacterium* CH-1, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus BL*, *Eubacterium limosum*, *Bacteroides praeacutus*, *Bacteroides L*, *Fusobacterium mortiferum I*, *Fusobacterium naviforme*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium ramosum*, *Propionibacterium acnes*, *Ruminococcus flavefaciens*,
 5 *Ruminococcus AT*, *Peptococcus AU-1*, *Eubacterium AG*, -AK, -AL, -AL-1, -AN; *Bacteroides fragilis* ss. *ovatus*, -ss. d, -ss. f; *Bacteroides L-1*, L-5; *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum*, *Escherichia coli*. *Streptococcus morbillorum*, *Peptococcus magnus*, *Peptococcus G*, AU-2; *Streptococcus intermedius*, *Ruminococcus lactaris*, *Ruminococcus CO Gemmiger X*, *Coprococcus BH*, -CC; *Eubacterium tenue*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium AE*, -AG-H, -AG-
 10 M, -AJ, -BN-1; *Bacteroides clostridiiformis* ss. *clostridiiformis*, *Bacteroides coagulans*, *Bacteroides orails*, *Bacteroides ruminicola* ss. *brevis*, -ss. *ruminicola*, *Bacteroides splanchnicus*, *Desulfomonas pigra*, *Bacteroides L-4*, -N-i; *Fusobacterium H*, *Lactobacillus G* и *Succinivibrio A*.

Ингибирование бактериальных патогенов

[0154] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бактериальная
 15 композиция обеспечивает защитный или терапевтический эффект от инфекции одним или большим количеством представляющих интерес патогенов ЖКТ.

[0155] Перечень типовых бактериальных патогенов приведен в таблице 1, на что указывает патогенный статус.

[0156] Согласно некоторым вариантам реализации указанная патогенная бактерия
 20 выбрана из группы, состоящей из *Yersinia*, *Vibrio*, *Treponema*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Rickettsia*, *Orientia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Leptospira*, *Legionella*, *Klebsiella*, *Helicobacter*, *Haemophilus*, *Francisella*, *Escherichia*, *Ehrlichia*, *Enterococcus*, *Coxiella*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Campylobacter*, *Burkholderia*, *Brucella*, *Borrelia*, *Bordetella*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*,
 25 обладающих множественной лекарственной устойчивостью бактерий, устойчивых к бета-лактамам расширенного спектра энтерококков (ESBL), устойчивых к карбапенемам *Enterobacteriaceae* (CRE) и устойчивых к ванкомицину энтерококков (VRE).

[0157] Согласно некоторым вариантам реализации указанные патогены включают, не ограничиваясь перечисленными, *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter fetus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*,
 30 *Clostridium perfringens*, энтероагрегативную *Escherichia coli*, энтерогеморрагическую *Escherichia coli*, энтероинвазивную *Escherichia coli*, энтеротоксигенную *Escherichia coli* (например, но не ограничиваясь перечисленными, LT и/или ST), *Escherichia coli* 0157:H7, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lysteria monocytogenes*, *Plesiomonas shigelloides*,
 35 *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, устойчивые к ванкомицину *Enterococcus* spp., *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* и *Yersinia enterocolitica*.

[0158] Согласно одному варианту реализации представляющий интерес патоген представляет собой по меньшей мере один патоген, выбранный из *Clostridium difficile*,
 40 *Salmonella* spp., патогенной *Escherichia coli*, устойчивых к ванкомицину *Enterococcus* spp. и устойчивых к бета-лактамам расширенного спектра *Enterococci* (ESBL).

Очищенные популяции спор

[0159] Согласно некоторым вариантам реализации бактериальные композиции содержат очищенные популяции спор. Очищенные популяции спор содержат комбинации
 45 комменсальных бактерий кишечной микробиоты человека, обладающие способностью значительно способствовать функциям нормальной микробиоты при введении субъекту-млекопитающему. Считается, что, не ограничиваясь конкретным механизмом, такие композиции ингибируют рост патогена, такого как *C. difficile*, *Salmonella* spp.,

энтеропатогенных *E. coli* и устойчивых к ванкомицину *Enterococcus spp.*, поддерживая таким образом здоровую разнообразную защитную микробиоту, или, в случае инфекций патогенными бактериями, например, инфекции *C. difficile*, позволяя ей заново заселять просвет кишечника для восстановления экологического контроля над потенциальными патогенами. Согласно некоторым вариантам реализации споры дрожжей и другие грибные споры также очищают и отбирают для терапевтического применения.

[0160] Раскрытые в настоящем изобретении терапевтические композиции, содержащие непатогенные способные к прорастанию бактериальные споры, для предотвращения, контроля и лечения заболеваний, расстройств и состояний ЖКТ и поддержания общего здоровья в области пищеварения. Указанные композиции обладают полезными свойствами, поскольку подходят для безопасного введения человеку и другим субъектам-млекопитающим, а также эффективны при многочисленных желудочно-кишечных заболеваниях, расстройствах и состояниях и для поддержания общего здоровья в области пищеварения. Хотя композиции на основе спор известны, их обычно получают с применением других техник, таких как лиофилизация или высушивание распылением жидких бактериальных культур, что приводит к неудовлетворительной эффективности, нестабильности, существенной вариабельности и отсутствию адекватной безопасности.

[0161] Было обнаружено, что популяции бактериальных спор могут быть получены из биологических материалов, полученных от субъектов-млекопитающих, в том числе человека. Указанные популяции вводят в состав композиций согласно настоящему изобретению и вводят субъектам-млекопитающим с применением способов согласно описанию в настоящем документе.

[0162] Предложены терапевтические композиции, содержащие очищенную популяцию бактериальных спор. В настоящем документе термины «очищать», «очищенный» и «очищать» относятся к состоянию популяции (например, совокупности известной или неизвестной численности и/или концентрации) требуемых бактериальных спор, подвергнутых одному или нескольким процессам очищения, например, отбору или обогащению по требуемым бактериальным спорам, или, как вариант, к удалению или уменьшению количества остаточных продуктов среды обитания согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в очищенной популяции отсутствует детектируемая нежелательная активность или, как вариант, уровень или количество нежелательной активности являются приемлемыми или ниже приемлемых уровня или количества. Согласно другим вариантам реализации очищенная популяция содержит приемлемое(ую) количество и/или концентрацию требуемых бактериальных спор или большее(ую) количество и/или концентрацию. Согласно другим вариантам реализации указанный очищенная популяция бактериальных спор обогащена относительно исходного материала (например, фекального материала), из которого получают указанную популяцию. Указанное обогащение может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999%, или более чем 99,9999% по сравнению с исходным материалом.

[0163] Согласно определенным вариантам реализации в указанных очищенных популяциях бактериальных спор наблюдаются пониженные или недетектируемые уровни одной или большего числа патогенных активностей, таких как токсичность, способность вызывать инфекцию у реципиента - субъекта-млекопитающего, нежелательная иммуномодулирующая активность, аутоиммунный ответ, метаболический ответ, или воспалительный ответ, или неврологическая реакция. Такое уменьшение патогенной активности может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999%, или более чем на 99,9999%

по сравнению с исходным материалом. Согласно другим вариантам реализации в очищенных популяциях бактериальных спор содержится меньше органолептических компонентов по сравнению с фекальным материалом, например, менее выраженный запах, вкус, внешний вид и умами.

5 [0164] Предложены очищенные популяции бактериальных спор, которые по существу не содержат остаточных продуктов среды обитания. Согласно определенным вариантам реализации это означает, что композиция с бактериальными спорами уже не содержит
10 существенного количества биологического вещества, связанного с сообществом микроорганизмов, обитающих на организме или в организме субъекта-человека или животного, и очищенная популяция спор может быть на 100%, 99%, 98%, 97%, 96% или 95% очищена от каких-либо загрязнений биологическим веществом, связанным с указанным сообществом микроорганизмов. «По существу не содержащие остаточные продукты среды обитания» может также означать, что композиция с бактериальными спорами не содержит детектируемых клеток человека или животного, и что
15 детектируются исключительно клетки микроорганизмов, в частности, детектируются только требуемые клетки микроорганизмов. Согласно другому варианту реализации это означает, что менее чем $1 \times 10^{-2}\%$, $1 \times 10^{-3}\%$, $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$, $1 \times 10^{-6}\%$, $1 \times 10^{-7}\%$, $1 \times 10^{-8}\%$ клеток в бактериальной композиции принадлежат человеку или животному, а не микроорганизмам. Согласно другому варианту реализации количество остаточного
20 продукта среды обитания, присутствующего в очищенной популяции, уменьшается по меньшей мере до определенного уровня относительно фекального материала, полученного от донора - субъекта-млекопитающего, например, уменьшается по меньшей мере приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999%, 99,9999%, или более чем на 99,9999%.

25 [0165] Согласно одному варианту реализации «по существу не содержащие остаточных продуктов среды обитания» или «по существу не содержащие на детектируемом уровне патогенного материала» означает, что бактериальная композиция не содержит детектируемых вирусных загрязнений (в том числе бактериальных вирусов (т.е. фагов)), грибных, микоплазменных или токсоплазменных загрязнений, или
30 эукариотических паразитов, таких как гельминты. Как вариант, очищенные популяции спор по существу не содержат бесклеточного материала, например, ДНК, материала вирусной оболочки, или нежизнеспособного бактериального материала.

[0166] Согласно описанию в настоящем документе очищение популяций спор может
35 быть продемонстрировано с помощью генетического анализа (например, ПЦР, секвенирования ДНК), серологического и антигенного анализа, и способов с применением таких инструментов, как проточная цитометрия с реагентами для различения требуемых бактериальных спор и нежелательных загрязняющих материалов.

[0167] Примеры биологических материалов включают фекальные материалы, такие
40 как кал, или материалы, выделенные из различных сегментов тонкого и толстого кишечника. Фекальные материалы получают от донора - субъекта-млекопитающего, или они могут быть получены от более чем одного субъекта-донора, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 или от более чем 1000 доноров, при этом такие материалы затем объединяют до очищения
45 требуемых бактериальных спор.

[0168] Согласно альтернативным вариантам реализации указанный требуемые бактериальные споры очищают из одного образца фекального материала, полученного от единственного донора, и после такого очищения комбинируют с очищенными популяциями спор, также полученными при очищении, либо от одного и того же донора

в разные моменты времени, или от одного или нескольких разных доноров, или используют оба варианта.

[0169] Предпочтительные бактериальные роды включают Acetonema, Alkaliphilus, Alicyclobacillus, Amphibacillus, Ammonifex, Anaerobacter, Anaerofustis, Anaerostipes, 5 Anaerotruncus, Anoxybacillus, Bacillus, Blautia, Brevibacillus, Bryantella, Caldicellulosiruptor, Caloramator, Candidatus, Carboxydibrachium, Carboxydotherrmus, Clostridium, Cohnella, Coprococcus, Dendrosporobacter Desulfitobacterium, Desulfosporosinus, Desulfotomaculum, Dorea, Eubacterium, Faecalibacterium, Filifactor, Geobacillus, Halobacteroides, Heliobacillus, Heliobacterium, Heliophilum, Heliorestis, Lachnoanaerobaculum, Lysinibacillus, Moorella, 10 Oceanobacillus, Orenia (S.), Oxalophagus, Oxobacter, Paenibacillus, Pelospora, Pelotomaculum, Propionispora, Roseburia, Ruminococcus, Sarcina, Sporobacterium, Sporohalobacter, Sporolactobacillus, Sporomusa, Sporosarcina, Sporotomaculum, Subdoligranulum, Symbiobacterium, Syntrophobotulus, Syntrophospora, Terribacillus, Thermoanaerobacter и Thermosinus.

15 [0170] Предпочтительные бактериальные виды представлены в таблице X4. В тех случаях, когда приведены конкретные штаммы вида, специалисту в данной области техники будет понятно, что приведенный штамм может быть заменен на другие штаммы указанного вида.

[0171] Согласно некоторым вариантам реализации споробразующие бактерии 20 идентифицируют по присутствию последовательностей нуклеиновых кислот, которые модулируют споруляцию. В частности, характерные для споруляции гены высококонсервативны у всех представителей дальнородственных родов, в том числе Clostridium и Bacillus. С применением традиционных подходов «прямой» генетики были идентифицированы многие, если не все, гены, критически важные для споруляции (spo). 25 Программа развития споруляции частично управляется последовательным действием четырех компартмент-специфических сигма-факторов (наблюдаемых в следующем порядке: σ^F , σ^E , σ^G и σ^K), активность которых ограничена протспорой (σ^F и σ^G) или материнской клеткой (σ^E и σ^K).

[0172] Предложены популяции спор, содержащие более одного типа бактерий. В 30 настоящем документе «тип» или более одного «типа» бактерий может различаться на уровне рода, вида, подвида, штамма или с применением любого другого таксономического метода, согласно описанию в настоящем документе и иными известными в данной области техники способами.

[0173] Согласно некоторым вариантам реализации все или по существу все 35 бактериальные споры, присутствующие в очищенной популяции, получены из фекального материала, обработанного согласно описанию в настоящем документе или иным известным способом в данной области техники. Согласно альтернативным вариантам реализации одну или большее количество бактериальных спор или типов бактериальных спор получают в культуре и комбинируют для получения очищенной 40 популяции спор. Согласно другим альтернативным вариантам реализации одну или большее количество указанных полученных в культуре популяций спор комбинируют с полученной из фекального материала популяцией спор для получения гибридной популяции спор. Бактериальные композиции могут содержать по меньшей мере два типа указанных предпочтительных бактерий, в том числе штаммы одного вида. 45 Например, бактериальная композиция может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по

меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, или по меньшей мере 20 или более чем 20 типов бактерий, по оценке на основании видов или функциональных таксономических единиц (OTU), включающих такие виды.

[0174] Таким образом, предложены способы получения композиций, содержащих популяцию бактериальных спор, подходящую для терапевтического введения нуждающемуся в этом субъекту-млекопитающему. Указанную композицию получают, как правило, путем проведения этапов: (а) получения фекального материала от донора - субъекта-млекопитающего; и (b) проведения по меньшей мере одного варианта очищения или этапа очищения указанного фекального материала в таких условиях, чтобы получить из указанного фекального материала популяцию бактериальных спор.

Состав с указанной композицией получают таким образом, что одна доза для перорального приема содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^4 колониеобразующих единиц указанных бактериальных спор, и одна доза для

перорального приема, как правило, содержит приблизительно 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , или более чем на 1×10^{15} КОЕ указанных бактериальных спор. Присутствие и/или концентрация определенного типа бактериальных спор может быть известно или неизвестно для определенной очищенной популяции спор. Если известна, например, концентрация спор определенного штамма или совокупности всех штаммов, она составляет, например, 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} или более чем 1×10^{15} жизнеспособных бактериальных спор на грамм композиции или на введенную дозу.

[0175] В некоторых составах композиция содержит по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более чем 90% спор по массе. В некоторых составах введенная доза не превышает 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мг или 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; или 1,9 г по массе.

[0176] Бактериальные споровые композиции обычно вводят в составы для перорального или гастрального введения, как правило, субъекту-млекопитающему. Согласно конкретным вариантам реализации указанную композицию вводят в состав для перорального введения в виде твердой, полутвердой, гелевой или жидкой формы, например, в форме пилюли, таблетки, капсулы или пастилки. Согласно некоторым вариантам реализации такие составы содержат кишечнорастворимое покрытие или покрыты кишечнорастворимым покрытием для защиты бактерии при прохождении через желудок и тонкий кишечник, хотя споры обычно устойчивы в желудке и тонком кишечнике.

[0177] Бактериальные споровые композиции могут быть введены в состав, эффективный у определенного субъекта-млекопитающего при однократном введении или при многократном введении. Например, однократное введение по существу эффективно для уменьшения содержания токсина *Cl. difficile* и/или *Cl. difficile* у субъекта-млекопитающего, которому вводят указанную композицию. «По существу эффективный» означает, что содержание токсина *Cl. difficile* и/или *Cl. difficile* у субъекта уменьшается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или более чем на 99% после введения указанной композиции.

СПОСОБЫ

Способы определения последовательностей 16S

[0178] OTU могут быть определены либо посредством полного 16S-секвенирования гена рРНК, секвенированием конкретной гипервариабельной области указанного гена (т.е. V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 или V9), или посредством секвенирования любой

комбинации гипервариабельных областей указанного гена (например, V1-3 или V3-5). Длина бактериальных 16S рРНК составляет приблизительно 1500 нуклеотидов, и их используют для реконструкции эволюционных взаимосвязей и сходства последовательностей между бактериальными изолятами с применением

5 филогенетических методов. Последовательности 16S используют для филогенетической реконструкции, поскольку они обычно высококонсервативны, однако содержат специфические гипервариабельные области, содержащие достаточно разнообразные нуклеотиды для различения родов и видов большинства микроорганизмов.

[0179] Используя хорошо известные техники, для определения полной

10 последовательности 16S или последовательности любой гипервариабельной области последовательности 16S, геномную ДНК экстрагируют из бактериального образца, 16S рРНК (полностью или специфические гипервариабельные области) амплифицировали с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР), очищали продукты ПЦР и определяли нуклеотидные последовательности для определения генетического состава

15 гена 16S или субдомена указанного гена. В том случае, если проводится полное 16S-секвенирование, используемый метод секвенирования может быть представлен, не ограничиваясь указанным, секвенированием по Сэнгеру. В том случае, если используется одна или большее количество гипервариабельных областей, таких как область V4, секвенирование может быть проведено, не ограничиваясь перечисленным, с применением

20 метода Сэнгера или метода секвенирования нового поколения, например, метода от Illumina (секвенирование синтезом) с применением штрихкодированных праймеров, позволяющих проводить несколько реакций.

[0180] OTU могут быть определены по комбинации нуклеотидных маркеров или генов, в частности, высококонсервативных генов (например, генов «домашнего

25 хозяйства») или их комбинации, полной последовательности генома или части последовательности генома, полученной с применением амплифицированных генетических продуктов, или последовательности всего генома (WGS). С применением хорошо известных способов специфические геномные области ДНК, экстрагированной из бактериального образца, амплифицируют с применением ПЦР и секвенируют для

30 определения нуклеотидной последовательности амплифицированных продуктов. При секвенировании полного генома методом дробовика (WGS) экстрагированную ДНК прямо секвенируют без амплификации. Информация о последовательностях может быть получена с применением любой технологии секвенирования, включая, но не ограничиваясь перечисленными, метод Сэнгера, метод от Illumina, 454 Life Sciences, Ion

35 Torrent, ABI, Pacific Biosciences и/или Oxford Nanopore.

Способы получения бактериальной композиции для введения субъекту

[0181] Способы получения бактериальных композиций могут включать три основных этапа обработки в сочетании с одним или несколькими этапами смешивания. Указанные этапы включают создания банков организмов, получения организмов и их сохранение.

40 [0182] Для получения банков штаммы, входящие в бактериальную композицию, могут (1) быть выделены прямо из образца или взяты из банкированного основного раствора, (2) необязательно культивироваться на питательном агаре или бульоне, который обеспечивает рост, для получения жизнеспособной биомассы, и (3) указанную биомассу необязательно сохраняют в виде нескольких аликвот для долгосрочного

45 хранения.

[0183] Согласно вариантам реализации, в которых используется этап культивирования, агар или бульон могут содержать питательные вещества, обеспечивающие существенные элементы и специфические факторы, которые

обеспечивают рост. Примером является среда, состоящая из 20 г/л глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л соевого пептона, 2 г/л лимонной кислоты, 1.5 г/л одноосновного фосфата натрия, 100 мг/л цитрата аммония железа, 80 мг/л сульфата магния, 10 мг/л геминхлорида, 2 мг/л хлорида кальция, 1 мг/л менадиона. Разнообразные микробиологические среды и варианты хорошо известны в данной области техники (например, R.M. Atlas, Handbook of Microbiological Media (2010) CRC Press). Среда может быть добавлена в культуру в начале, может быть во время культивирования или может протекать через культуру периодически/постоянно. Штаммы в бактериальной композиции могут культивироваться по отдельности, в виде подгруппы бактериальной композиции или как целая коллекция, содержащая указанную бактериальную композицию. Например, первый штамм может культивироваться вместо с вторым штаммом в смешанной непрерывной культуре, при скорости разведения ниже максимальной скорости роста любой клетки для предотвращения вымывания культуры из культуральной среды.

[0184] Инокулированную культуру инкубируют в благоприятных условиях на протяжении времени, достаточного для наращивания биомассы. В случае бактериальных композиций для применения у человека это часто соответствует температуре 37°C, pH, и другим показателям со значениями, сходными с нормальной нишей в организме человека. Среда может активно контролироваться, пассивно контролироваться (например, с помощью буферов), либо ей позволяют произвольно изменяться. Например, для анаэробных бактериальных композиций (например, микробиоты кишечника) может использоваться бескислородная/восстановительная среда. Это может достигаться путем добавления восстановительных агентов, таких как цистеин, в бульон, и/или удаление из него кислорода. Например, культура бактериальной композиции может культивироваться при 37°C, pH 7, в описанной выше среде, предварительно восстановленной 1 г/л цистеина HCl.

[0185] При достижении культурой достаточной биомассы, указанная культура может быть подвергнута предохраняющей обработке для банкирования. Указанные организмы могут быть помещены в химическую среду, защищающую их от замерзания (добавление 'криопротекторов'), высыхания ('лиопротекторы') и/или осмотического шока ('осмопротекторы'), распределены по нескольким (необязательно идентичным) контейнерам для получения однородного банка, и затем культура может быть обработана для предохранения. Контейнеры обычно непроницаемы и снабжены механизмом закрытия, обеспечивающим изоляцию от окружающей среды.

Криоконсервацию проводят путем замораживания жидкости при сверхнизких температурах (например, при -80°C или ниже). При консервации высушиванием воду из культуры удаляют путем испарения (в случае высушивания распылением или «холодной сушки») или сублимацией (например, при лиофилизации, лиофильной распылительной сушке). Удаление воды улучшает стабильность бактериальной композиции при долгосрочном хранении при температурах выше криогенных. Если бактериальная композиция содержит спорообразующие виды и обеспечивает образование спор, конечная композиция может быть очищена дополнительными способами, например, законсервирована центрифугированием в градиенте плотности с применением описанных выше техник. Банкирование бактериальной композиции может быть выполнено путем культивирования и консервации штаммов по отдельности, или путем смешивания штаммов друг с другом с получением комбинированного банка. В примере криоконсервации культура бактериальной композиции может быть собрана путем центрифугирования для осаждения клеток из культуральной среды, супернатант

декантирован и заменен свежим культуральным бульоном, содержащим 15% глицерина. Затем аликвоты культуры могут быть помещены в криопробирки объемом 1 мл, запечатаны и помещены в среду с температурой -80°C для длительного сохранения жизнеспособности. Указанная процедура обеспечивает приемлемую жизнеспособность

при восстановлении из замороженного состояния.

[0186] Получение организмов может проводиться с применением аналогичных банкированию этапов культивирования, в том числе в аналогичного состава среды и условий культивирования. Оно может проводиться в большем масштабе, в частности для клинических разработок или коммерческого производства. При больших масштабах может проводиться несколько субкультиваций бактериальной композиции перед итоговой культивацией. В конце культивации культуру собирают для дальнейшего включения в лекарственную форму для введения. Последнее может включать концентрацию, удаление нежелательных компонентов среды и/или введение в химическую среду, сохраняющую бактериальную композицию и придающую ей надлежащие качества для введения выбранным способом. Например, бактериальная композиция может культивироваться до концентрации 10^{10} КОЕ/мл, затем быть сконцентрирована 20-кратно с применением тангенциальной проточной микрофльтрации; отработанная среда может быть заменена диафильтрацией на консервирующую среду, состоящую из 2% желатина, 100 мМ трегалозы, и 10 мМ натрий-фосфатного буфера. Затем суспензия может быть лиофилизирована с получением порошка и титрована.

[0187] После высушивания порошок может быть перемолот до подходящей степени, смешан с другими культурами и/или наполнителем, таким как микрокристаллическая целлюлоза, для обеспечения структуры и удобства использования, и получен состав с бактериальной композицией согласно описанию в настоящем документе.

Введение бактериальных композиций.

[0188] Бактериальные композиции, предложенные в настоящем изобретении, подходят для введения нуждающимся в этом млекопитающим и не являющимся млекопитающими животным. Согласно определенным вариантам реализации указанный субъект-млекопитающее представляет собой субъекта-человека, у которого имеются один или большее количество симптомов дисбиоза, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, избыточный рост нежелательного патобионта или патогена, уменьшение представленности ключевых бактериальных таксонов, таких как Bacteroidetes или Firmicutes, или соответствующих им родов или видов, или уменьшение разнообразия видов микроорганизмов по сравнению со здоровым индивидуумом, или уменьшение общей распространенности анаэробных бактерий.

[0189] В том случае, если субъект-млекопитающее страдает заболеванием, расстройством или состоянием, характеризующимся аберрантной микробиотой, бактериальные композиции, описанные в настоящем документе, подходят для лечения указанного заболевания, расстройства или состояния. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект-млекопитающее не получал антибиотики до лечения указанными бактериальными композициями. Например, указанному субъекту-млекопитающему не вводили по меньшей мере две дозы ванкомицина, метронидазола и/или аналогичного соединения с антибиотической активностью в течение одной недели перед введением указанной терапевтической композиции. Согласно другим вариантам реализации указанный субъект-млекопитающее ранее не получал соединения с антибиотической активностью в течение месяца перед введением указанной терапевтической композиции. Согласно другим вариантам реализации указанный

субъект-млекопитающее получал один или большее количество вариантов лечения одним или несколькими разными соединениями с антибиотической активностью, и такое лечение не приводило к улучшению или приводило к ухудшению симптомов. Согласно некоторым вариантам реализации указанную композицию со спорами вводят
 5 после успешного курса антибиотиков для предотвращения дисбиоза и улучшения восстановления разнообразной нормальной микробиоты.

[0190] Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание расстройство или состояние ЖКТ представляет собой диарею, вызываемую *C. difficile*, в том числе рецидивирующую инфекцию *C. difficile*, язвенный колит, колит, болезнь
 10 Крона или синдром раздраженного кишечника. Благоприятным образом, указанную терапевтическую композицию вводят всего один раз до улучшения состояния при заболевании, расстройстве или состоянии. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическую композицию вводят с интервалами более чем два дня, например, один раз каждые три, четыре, пять или шесть дней, или еженедельно, или реже, чем
 15 еженедельно. Состав также может вводиться периодически в соответствии с установленной схемой, например, один раз в сутки, еженедельно или один раз в месяц, или тогда, когда у субъекта происходит рецидив первичной болезни. Согласно другому варианту реализации указанный состав может вводиться на долговременной основе индивидуумам, у которых имеется риск инфекции указанными патогенами, или
 20 индивидуумам, которые могут быть носителями указанных патогенов, в том числе индивидуумам, у которых будет проведена инвазивная медицинская процедура (такая как хирургическое вмешательство), подлежащим госпитализации, живущим в учреждении для долгосрочной медицинской помощи или реабилитации, контактирующим с патогенами по роду профессиональной деятельности (индивидуумы, работа которых
 25 связана с сельскохозяйственными животными и переработкой животных продуктов) или потенциальным носителям патогенов (в том числе работникам больниц, таким как врачи, медицинские сестры и другие медицинские специалисты).

[0191] Также предложены способы лечения или профилактики у субъекта-млекопитающего, страдающего заболеванием, расстройством или состоянием обмена
 30 веществ, или имеющего риск развития заболевания, расстройства или состояния обмена веществ, выбранного из группы, состоящей из диабета, метаболического синдрома, ожирения, заболевания сердца, аутоиммунного заболевания, заболевания печени и аутизма с применением терапевтических композиций, описанных в настоящем документе.

[0192] Согласно вариантам реализации композицию с бактериальными спорами
 35 вводят энтерально. Это преимущественно включает пероральное введение или введение через оральный или назальный зонд (в том числе назогастральный, назоеюнальный, орогастральный или ороеюнальный). Согласно другим вариантам реализации введение включает ректальное введение (в том числе с применением клизмы, суппозитория или колоноскопии). Бактериальная композиция может вводиться по меньшей мере в одну
 40 область желудочно-кишечного тракта, в том числе рот, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник и прямую кишку. Согласно некоторым вариантам реализации ее вводят во все области желудочно-кишечного тракта. Бактериальные композиции могут вводиться перорально в форме медикаментов, таких как порошки, капсулы, таблетки, гели или жидкости. Бактериальные композиции могут также
 45 вводиться в гелевой или жидкой форме перорально или через назогастральный зонд, или ректально в гелевой или жидкой форме, через клизму или путем инстилляции через колоноскоп, или в виде суппозитория.

[0193] Если композицию вводят колоноскопически и, необязательно, если

бактериальную композицию вводят ректально иным способом (например, с применением клизмы или суппозитория) или субъект может получать состав для очищения толстой кишки даже если у указанного субъекта используется пероральное введение. Состав для очищения толстой кишки может облегчать надлежащее использование колоноскопа или другого устройства для введения, однако даже если он не выполняет механическую функцию, он может максимизировать долю бактериальной композиции относительно других организмов, ранее присутствовавших в желудочно-кишечном тракте указанного субъекта. Может быть использован любой легкодоступный состав для очищения толстой кишки, например, состав, обычно используемый при проведении у субъекта колоноскопии.

[0194] Для оценки субъекта симптомы дисбиоза оценивают после лечения в диапазоне времени от 1 дня до 6 месяцев после введения очищенной популяции спор. В течение указанного периода собирают фекальный материал, и микроорганизмы, присутствующие в желудочно-кишечном тракте, могут быть проанализированы с помощью анализа секвенирования 16S рРНК или метагеномного секвенирования или других анализов, общепотребительных среди специалистов. В указанный период времени наблюдается восстановление популяции видов, происходящих из популяции спор, а также стимуляция комменсальных микроорганизмов, не присутствующих в популяции спор, поскольку популяция спор катализирует восстановление состояния экогруппы пищеварительного тракта, соответствующее здоровому биоцу. Наилучшим образом понять приведенное описание можно в свете информации из цитируемых в описании источников.

Представленные в описании варианты реализации иллюстрируют варианты реализации и не предназначены для ограничения объема. Для специалиста будет ясно, что включены многие другие варианты реализации. Все публикации и патент, цитируемые в настоящем описании, полностью включены посредством ссылки. В тех случаях, когда включенный посредством ссылки материал противоречит или не согласуется с настоящим описанием, настоящее описание имеет преимущественную силу относительно любого такого материала. Цитирование каких-либо источников не означает, что такие источники представляют предшествующий уровень техники.

Способы лечения субъекта

[0195] Согласно некоторым вариантам реализации раскрытые в настоящем изобретении композиции вводят пациенту или потребителю (иногда называемому общим термином «субъект»). В настоящем документе «вводить» и «введение» охватывает варианты реализации, в которых один индивидуум направляет другого с целью потребления последним бактериальной композиции определенным образом и/или для определенной цели, а также ситуации, в которых потребитель использует бактериальную композицию определенным образом и/или для определенной цели независимо или противоречащим каким-либо полученным от второго индивидуума инструкциям образом. Неограничивающие примеры вариантов реализации, согласно которым один индивидуум направляет другого с целью потребления последним бактериальной композиции определенным образом и/или для определенной цели, включают варианты, когда лечащий врач прописывает курс действий и/или лечения пациенту, когда родитель руководит потреблением бактериальной композиции несовершеннолетним потребителем (например, ребенком), когда тренер рекомендует потребителю (например, спортсмену) конкретный курс действий и/или лечения, и когда производитель, распространитель или поставщик рекомендует условия применения конечному потребителю, например, с использованием рекламы или этикетки на упаковке или на других материалах, предлагаемых вместе с продаваемым или поставляемым на рынок продуктом.

[0196] Указанные бактериальные композиции обеспечивают защитный и/или терапевтический эффект от инфекции одним или большим количеством представляющих интерес патогенов ЖКТ и могут вводиться после окончания эпизода острой инфекции для предотвращения рецидива, во время эпизода острой инфекции в качестве дополнения к терапии антибиотиками, если бактериальная композиция не чувствительная к тем же антибиотикам, что и патоген ЖКТ, или для предотвращения инфекции или уменьшения передачи от носителей заболевания.

[0197] Предлагаемые бактериальные композиции могут подходить для применения в разнообразных клинических ситуациях. Например, указанные бактериальные композиции могут вводиться в качестве дополнительного лечения вместе с антибиотиками, если пациент страдает острой инфекцией, для снижения риска рецидива после ослабления острой инфекции или в том случае, когда пациент находится в непосредственной близости от других индивидуумов, у которых имеются серьезные желудочно-кишечные инфекции или риск их развития (врачи, медицинские сестры, работники больниц, члены семей больных или госпитализированных субъектов).

[0198] Предлагаемые бактериальные композиции могут вводиться животным, в том числе человеку, лабораторным животным (например, приматам, крысам, мышам), сельскохозяйственным животным (например, коровам, овцам, козам, свиньям, индейкам, курам) и домашним животным (например, собакам, кошкам, грызунам).

[0199] Согласно предложенному способу бактериальная композиция может вводиться энтерально, другими словами, с доступом в желудочно-кишечный тракт. Это включает пероральное введение, ректальное введение (в том числе через клизму, в виде суппозитория или с применением колоноскопии), введение через оральный или назальный зонд (назогастральный, назоюнальный, орогастральный, или ороюнальный), как более подробно изложено в настоящем документе.

Протоколы предварительной обработки

[0200] Перед введением бактериальной композиции необязательно проводят предварительную обработку пациента согласно протоколу для подготовки желудочно-кишечного тракта к получению бактериальной композиции. Указанный протокол предварительной обработки целесообразен при определенных вариантах реализации, например, если у пациента имеется острая инфекция высокоустойчивым патогеном. Согласно другим вариантам реализации указанный протокол предварительной обработки является полностью необязательным, например, если патоген, вызывающий инфекцию, не является устойчивым, или в тех случаях, когда у указанного пациента имелась острая инфекция, которая была успешно излечена, однако лечащий врач опасается, что инфекция может рецидивировать. В таких случаях протокол предварительной обработки может повысить способность бактериальной композиции оказывать воздействие на микробном пациента.

[0201] Одним из способов подготовки пациента к введению экосистемы микроорганизмов может быть введение по меньшей мере одного антибиотика для изменения состава бактерий у пациента. Другим способом подготовки пациента к введению экосистемы микроорганизмов может быть введение указанному пациенту состава для очищения толстой кишки для опустошения толстой кишки по существу, например, состава, используемого при подготовке пациентов к колоноскопии. Под «опустошением толстой кишки по существу» в настоящей заявке подразумевается удаление по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или приблизительно 100% содержимого обычного объема толстой кишки. Лечение антибиотиками может предшествовать осуществлению протокола очищения

толстой кишки.

[0202] В том случае, если пациент получал антибиотик для лечения инфекции, или если пациент получал антибиотик в ходе осуществления конкретного протокола предварительной обработки, согласно одному варианту реализации введение указанного антибиотика может быть заблаговременно прекращено, чтобы обеспечить снижение в кишечнике концентрации антибиотика по существу до введения бактериальной композиции. Согласно одному варианту реализации введение антибиотика может быть прекращено за 1, 2 или 3 дня до введения бактериальной композиции. Согласно другому варианту реализации введение антибиотика может быть прекращено за 3, 4, 5, 6 или 7 периодов полу жизни указанного антибиотика до введения бактериальной композиции. Согласно другому варианту реализации антибиотик может быть выбран таким образом, что компоненты бактериальной композиции имеют MIC50, превышающую концентрацию указанного антибиотика в кишечнике.

[0203] MIC50 бактериальной композиции или элементов указанной композиции может быть определена с применением способов, хорошо известных в данной области техники. Reller et al., Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, Clinical Infectious Diseases 49(11):1749-1755 (2009). Согласно такому варианту реализации дополнительный период времени между введением антибиотика и введением бактериальной композиции не является необходимым. Если в лечение острой инфекции включен протокол предварительной обработки, антибиотик может быть подобран так, что указанная инфекция будет чувствительна к указанному антибиотику, а компоненты бактериальной композиции будут нечувствительны к указанному антибиотику.

Способы введения

[0204] Бактериальные композиции, предложенные в настоящем изобретении, подходят для введения нуждающемуся в этом млекопитающим и не являющимся млекопитающими животным. Согласно определенным вариантам реализации указанный субъект-млекопитающее представляет собой субъекта-человека, у которого присутствуют один или большее количество симптомов дисбиоза.

[0205] Если субъект-млекопитающее страдает заболеванием, расстройством или состоянием, характеризующимся аберрантной микробиотой, для его лечения подходят бактериальные композиции, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект-млекопитающее не получал антибиотика до лечения бактериальными композициями. Например, указанному субъекту-млекопитающему не вводили по меньшей мере две дозы ванкомицина, метронидазола и/или аналогичного соединения с антибиотической активностью в течение одной недели перед введением указанной терапевтической композиции. Согласно другим вариантам реализации указанный субъект-млекопитающее ранее не получал соединения с антибиотической активностью в течение месяца перед введением указанной терапевтической композиции. Согласно другим вариантам реализации проводили лечение указанного субъекта-млекопитающего один или большее количество раз одним или несколькими разными соединениями с антибиотической активностью, и такое лечение не привело к улучшению или привело к ухудшению симптомов.

[0206] Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание, расстройство или состояние ЖКТ представляет собой диарею, вызванную *C. difficile*, в том числе рецидивирующей инфекцией *C. difficile*, язвенный колит, колит, болезнь Крона или синдром раздраженного кишечника. Благоприятным образом, терапевтическую композицию вводят только один раз до улучшения состояния при

указанном заболевании, расстройстве или состоянии. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическую композицию вводят с интервалами более чем два дня, например, один раз в три, четыре, пять или шесть дней, каждую неделю или реже, чем еженедельно. Согласно другим вариантам реализации указанный состав может вводиться периодически в соответствии с заданной схемой, например, один раз в сутки, один раз в неделю или один раз в месяц, или тогда, когда у субъекта происходит рецидив первичного заболевания. Согласно другому варианту реализации указанный состав может вводиться на долгосрочной основе субъектам, у которых имеется риск инфекции указанными патогенами или субъектам, которые могут являться носителями указанных патогенов, в том числе субъектам, у которых будет проведена инвазивная медицинская процедура (такая как хирургическое вмешательство), подлежащим госпитализации, живущим в учреждении для долгосрочной медицинской помощи или реабилитации, контактирующим с патогенами по роду профессиональной деятельности (субъекты, работа которых связана с сельскохозяйственными животными и переработкой животных продуктов), или потенциальным носителям патогенов (в том числе работникам больниц, таким как врачи, медицинские сестры и другие медицинские специалисты).

[0207] Согласно определенным вариантам реализации указанную бактериальную композицию вводят энтерально. Это преимущественно включает пероральное введение, или введение через оральный или назальный зонд (в том числе назогастральный, назоеюнальный, орогастральный или ороеюнальный). Согласно другим вариантам реализации введение включает ректальное введение (в том числе клизму, суппозитории или колоноскопию). Бактериальная композиция может вводиться по меньшей мере в одну область желудочно-кишечного тракта, в том числе в рот, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник и прямую кишку. Согласно некоторым вариантам реализации ее вводят во все области желудочно-кишечного тракта. Бактериальные композиции могут вводиться перорально в форме таких медикаментов, как порошки, капсулы, таблетки, гели или жидкости. Бактериальные композиции могут также вводиться в гелевой или жидкой форме перорально или через назогастральный зонд, или ректально в гелевой или жидкой форме, с помощью клизмы, или путем инстилляции через колоноскоп, или в форме суппозитория.

[0208] Если композицию вводят колоноскопически и, необязательно, если бактериальную композицию вводят ректально иным способом (например, с применением клизмы или суппозитория) или даже если у субъекта используется пероральное введение, указанный субъект может получать состав для очищения толстой кишки. Состав для очищения толстой кишки может облегчать надлежащее использование колоноскопа или других устройств для введения, но даже если он не выполняет механическую функцию, он может максимизировать долю бактериальной композиции относительно других организмов, ранее присутствовавших в желудочно-кишечном тракте указанного субъекта. Может быть использован любой легкодоступный состав для очищения толстой кишки, например, составы, обычно используемые у субъекта при колоноскопии.

Дозировки и схема введения

[0209] Согласно некоторым вариантам реализации предложены бактерии и бактериальные композиции в дозированной лекарственной форме. Согласно определенным вариантам реализации указанная лекарственная форма предназначена для введения по меньшей мере одной OTU или их комбинации, раскрытых в настоящем изобретении, при этом указанное общее количество введенной бактериальной композиции выбирают из 0,1 нг - 10 г, 10 нг - 1 г, 100 нг - 0,1 г, 0,1-500 мг, 1-100 мг или 10-15 мг. Согласно другим вариантам реализации указанная бактериальная композиция

потребляется со скоростью от 0,1 нг до 10 г в день, от 10 нг до 1 г в день, 100 нг до 0,3 г в день, 0,1 мг - 500 мг в день, 1-100 мг в день, или 10-15 мг в день, или более.

[0210] Согласно определенным вариантам реализации период лечения составляет по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 1 неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 4 недели, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев или по меньшей мере 1 год. Согласно некоторым вариантам реализации период лечения составляет от 1 дня до 1 недели, от 1 недели до 4 недель, от 1 месяца до 3 месяцев, от 3 месяцев до 6 месяцев, от 6 месяцев до 1 года, или более года.

[0211] Согласно одному варианту реализации пациенту в виде определенной лекарственной формы может вводиться общее количество микроорганизмов 10^5 и 10^{12} . Согласно другому варианту реализации эффективное количество может обеспечиваться в виде 1-500 мл или 1-500 г бактериальной композиции, содержащей от 10^7 до 10^{11} бактерий на мл или на грамм, или в виде капсулы, таблетки или суппозитория, содержащей(его) от 1 мг до 1000 мг лиофилизированного порошка, содержащего от 10^7 до 10^{11} бактерий. Получающим острое лечение пациентам могут вводиться более высокие дозы по сравнению с получающими хроническое лечение (например, работниками больниц или пациентами учреждений долгосрочной медицинской помощи).

[0212] Любые составы, описанные в настоящем документе, могут вводиться в виде одной дозы однократно или многократно, например, один раз в сутки на протяжении нескольких дней, или более чем один раз в сутки в день введения (в том числе дважды в сутки, трижды в сутки, или до пяти раз в сутки). Согласно другому варианту реализации указанный состав может вводиться периодически в соответствии с принятой схемой, например, один раз еженедельно, один раз в месяц, или тогда, когда у субъекта происходит рецидив первичного заболевания. Согласно одному варианту реализации указанный состав может вводиться на долгосрочной основе индивидуумам, у которых имеется риск инфекции указанными патогенами или индивидуумам, которые могут являться носителями указанных патогенов, в том числе индивидуумам, у которых будет проведена инвазивная медицинская процедура (такая как хирургическое вмешательство), подлежащим госпитализации, живущим в учреждении для долгосрочной медицинской помощи или реабилитации, индивидуумам, контактирующим с патогенами по роду профессиональной деятельности (индивидуумам, работа которых связана с сельскохозяйственными животными и переработкой животных продуктов), или потенциальным носителям патогенов (в том числе работникам больниц, таким как врачи, медицинские сестры и другие медицинские специалисты).

Выбор пациентов

[0213] Конкретные бактериальные композиции могут быть выбраны для индивидуальных пациентов или для пациентов с конкретными профилями. Например, у определенного пациента может быть проведено 16S-секвенирование для идентификации бактерий, присутствующих в его/ее микробиоте. Указанное секвенирование может либо обеспечивать профилирование полного микробиома пациента с применением 16S-секвенирования (до уровня семейства, рода или вида), части микробиома пациента с применением 16S-секвенирования, или может использоваться для детекции присутствия или отсутствия специфических кандидатных бактерий, которые являются биомаркерами здоровья или конкретного болезненного состояния, например, маркерами обладающих

множественной лекарственной устойчивостью организмов или конкретных представляющих интерес родов, таких как *Escherichia*. На основании информации о биомаркерах может быть выбрана конкретные композиции для введения пациенту для расширения или дополнения микробиоты пациента, для восстановления здоровья, или

лечения или предотвращения заболевания. Согласно другому варианту реализации может проводиться скрининг пациентов для определения состава их микробиоты для определения вероятности успешного лечения.

Комбинированная терапия

[0214] Бактериальные композиции могут вводиться с другими агентами в режиме комбинированной терапии, в том числе с противомикробными агентами и пребиотиками. Введение может быть последовательным, на протяжении периода нескольких часов или дней, или одновременным.

[0215] Согласно одному варианту реализации бактериальные композиции включают в комбинированную терапию одним или несколькими противомикробными агентами, которые включают антибактериальные агенты, фунгицидные агенты, противовирусные агенты и противопаразитарные агенты.

[0216] Антибактериальные агенты могут включать цефалоспориновые антибиотики (цефалексин, цефуроксим, цефадроксил, цефазолин, цефалотин, цефаклор, цефамандол, цефокситин, цефprozил и цефтобипрол); фторхинолоновые антибиотики (ципро, левакин, флоксин, текин, авелокс и норфлокс); тетрациклиновые антибиотики (тетрациклин, миноциклин, окситетрациклин и доксициклин); пенициллиновые антибиотики (амоксциллин, ампициллин, пенициллин V, диклоксациллин, карбенициллин, ванкомицин и метициллин); и карбапенемовые антибиотики (эртапенем, дорипенем, имипенем/циластатин и меропенем).

[0217] Противовирусные агенты могут включать абакавир, ацикловир, адефовир, ампренавир, атазанавир, цидофовир, дарунавир, делавирдин, диданозин, докозанол, эфавиренц, элвитегравир, эмтрицитабин, энфувиртид, этравирин, фамцикловир, фоскарнет, фомивирсен, ганцикловир, индинавир, идоксуридин, ламивудин, лопинавир, маравирок, МК-2048, нелфинавир, невирапин, пенцикловир, ралтегравир, рилпивиридин, ритонавир, саквинавир, ставудин, тенофовир, трифлуридин, валакцикловир, валганцикловир, видарабин, ибацитабин, амантадин, озелтамивир, римантадин, тилпранавир, зальцитабин, занамивир и зидовудин.

[0218] Примеры фунгицидных соединений включают, не ограничиваясь перечисленными, полиеновые фунгицидные средства, такие как натамицин, римоцидин, филиппин, нистатин, амфотерицин, кандицин и хамицин; имидазольные фунгицидные средства, такие как миконазол, кетоконазол, клотримазол, эконазол, омокконазол, бифоназол, бутконазол, фентиконазол, изоконазол, оксиконазол, сертакконазол, сульконазол и тиокконазол; триазольные фунгицидные средства, такие как флуконазол, итраконазол, изавуконазол, равуконазол, позакконазол, вориконазол, терконазол и альбаконазол; тиазольные фунгицидные средства, такие как абафунгин; аллиламиновые фунгицидные средства, такие как тербинафин, нафтифин и бутенафин; и эхинокандиновые фунгицидные средства, такие как анидулафунгин, каспофунгин и микафунгин. Другие соединения, обладающие фунгицидными свойствами, включают, не ограничиваясь перечисленными, полигодиал, бензойную кислоту, циклопирокс, толнафат, ундециленовую кислоту, флуцитозин или 5-фторцитозин, гризеофульвин и галопротин.

[0219] Согласно одному варианту реализации бактериальные композиции включены в комбинированную терапию с одним или несколькими кортикостероидами,

месалазином, месаламином, сульфасалазином, производными сульфасалазина, иммуносупрессивными лекарственными средствами, циклоспорином А, меркаптопурином, преднизолоном, азатиопурином, метотрексатом, антигистаминными средствами, глюкокортикоидами, адреналином, теофиллином, кромолином натрия, антилейкотриенами, антихолинергическими лекарственными средствами для лечения ринитов, антихолинергическими противоотечными средствами, стабилизаторами тучных клеток, вакцинами с моноклональными антителами против IgE и их комбинациями.

[0220] Пребиотик представляет собой избирательно ферментируемый ингредиент, обеспечивающий специфические изменения и состава, и/или активности микробиоты ЖКТ, благоприятные для самочувствия и состояния здоровья хозяина. Пребиотики могут включать сложные углеводы, аминокислоты, пептиды или другие необходимые питательные компоненты для выживания бактериальной композиции. Пребиотики включают, не ограничиваясь перечисленными, аминокислоты, биотин, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, инулин, лактулозу, маннанные олигосахариды, обогащенный олигофруктозой инулин, олигофруктозу, олигодекстрозу, тагатозу, транс-галактоолигосахарид и ксилоолигосахариды.

Способы тестирования способности бактериальных композиций к заселению

Анализ *in vivo* для оценки заселения желудочно-кишечного тракта субъекта бактериальной композицией

[0221] Для определения того, заселяет ли бактериальная композиция желудочно-кишечного тракта субъекта, может использоваться модель на животных, например, модель на мышах. Реализация модели может начинаться с оценки микробиоты мышей. Качественную оценку можно получить с применением 16S-профилирования сообщества микроорганизмов в экскрементах здоровых мышей. С этой целью может также использоваться полногеномное секвенирование, полногеномное секвенирование методом «дробовика» (WGS) или традиционные микробиологические техники. Количественную оценку можно получить с применением количественной ПЦР (кПЦР), описанной ниже, или с применением традиционных микробиологических техник и подсчета образующихся колоний.

[0222] Мыши необязательно могут получать лечение антибиотиками для имитации состояния дисбиоза. Лечение антибиотиками может снижать таксономическое изобилие, разнообразие и равномерность распределения сообщества, в том числе снижение распространенности значительного числа бактериальных таксонов. Dethlefsen et al., The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing, PLoS Biology 6(11):3280 (2008). По меньшей мере один антибиотик может использоваться, и антибиотики хорошо известны. Антибиотики могут включать аминогликозидный антибиотик (амикацин, арбекацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, паромомицин, родострептомицин, стрептомицин, тобрамицин и апрамицин), амоксициллин, ампициллин, аугментин (комбинация амоксициллина/клавуланата калия), цефалоспорин (цефаклор, цефадроксил, цефазолин, цефиксим, цефокситин, цефпрозил, цефтазидим, цефуроксим, цефалексин), клавуланат калия, клиндамицин, колистин, гентамицин, канамицин, метронидазол или ванкомицин. В качестве индивидуального неограничивающего конкретного примера, мышам может предоставляться питьевая вода, содержащая смесь антибиотиков канамицина, колистина, гентамицина, метронидазола и ванкомицина в концентрации 40 мг/кг, 4,2 мг/кг, 3,5 мг/кг, 21,5 мг/кг и 4,5 мг/кг (мг на среднюю массу тела мыши), соответственно, в течение 7 дней. Как вариант, мышам может вводиться ципрофлоксацин в дозе 15-20 мг/кг (мг на среднюю массу тела мыши) в течение 7 дней.

В том случае, если мыши получают антибиотик, может выдерживаться «отмывочный период» продолжительностью от одного дня до трех дней, без лечения антибиотиками и без лечения бактериальной композицией.

[0223] Затем тестируемую бактериальную композицию вводят мышам через оральный зонд. Тестируемая бактериальная композиция может вводиться в объеме 0,2 мл, содержащем 10^4 КОЕ бактерий каждого типа, входящего в бактериальную композицию. Зависимость доза-ответ может оцениваться с использованием диапазона доз, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 и/или 10^{10} .

[0224] Может проводиться исследование мышей с применением 16S-секвенирования, полногеномного секвенирования, полногеномного секвенирования методом «дробовика» (WGS) или традиционных микробиологических техник для определения того, заселяет ли тестируемая бактериальная композиция желудочно-кишечный тракт мышей. Например, через день, через три дня, через неделю, через две недели и через один месяц после введения бактериальной композиции мышам, проводят 16S-профилирование для определения того, заселила ли тестируемая бактериальная композиция желудочно-кишечный тракт мышей. Дополнительно или в альтернативных вариантах в те же периоды времени может проводиться количественный анализ, в том числе с применением кПЦР и традиционных микробиологических техник, таких как подсчет колоний.

[0225] Кроме того, может оцениваться зависимость числа секвенированных последовательностей, точно соответствующих последовательностям бактериальной композиции, от времени, для определения того, какие конкретно компоненты бактериальной композиции остаются в желудочно-кишечном тракте через конкретный период времени. Согласно одному варианту реализации штаммы бактериальной композиции сохраняются на протяжении требуемого периода времени. Согласно другому варианту реализации указанные компоненты бактериальной композиции сохраняются на протяжении требуемого периода времени, в то же время повышая способность других микроорганизмов (например, присутствующих в окружающей среде, пище и т.п.) заселять желудочно-кишечный тракт, что дополнительно увеличивает общее разнообразие, согласно описанию ниже.

Способность бактериальных композиций заселять различные области желудочно-кишечного тракта

[0226] Также может оцениваться способность предложенных бактериальных композиций заселять различные области желудочно-кишечного тракта. Согласно одному варианту реализации бактериальная композиция может быть выбрана исходя из способности заселять одну или более чем одну область желудочно-кишечного тракта, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, желудок, тонкий кишечник (двенадцатиперстная кишка, тощая кишка и подвздошная кишка), толстый кишечник (слепая кишка, ободочная кишка (восходящая кишка, поперечноободочная кишка, нисходящая кишка и сигмовидная кишка) и прямая кишка).

[0227] Может проводиться исследование *in vivo* для определения того, какие области желудочно-кишечного тракта заселяет определенная бактериальная композиция. Может использоваться модель на мышах, аналогичная вышеописанной, за исключением того, что вместо анализа экскрементов, продуцируемых мышами, могут быть извлечены и исследованы по отдельности конкретные области желудочно-кишечного тракта. Например, может быть извлечена по меньшей мере одна конкретная область желудочно-

кишечного тракта, и может быть проведено качественное или количественное определение содержимого указанной области желудочно-кишечного тракта. Согласно другому варианту реализации необязательно может быть извлечено указанное содержимое, и может проводиться качественное или количественное определение

5 извлеченных тканей мышцы.

кПЦР

[0228] Одним из количественных методов для определения того, заселяет ли бактериальная композиция желудочно-кишечный тракт, может быть количественная ПЦР (кПЦР). Могут использоваться стандартные техники получения стандартной

10 кривой для представляющей интерес бактериальной композиции, для всех компонентов бактериальной композиции совместно, либо индивидуально, либо для подгрупп (если это применимо). Геномная ДНК может быть экстрагирована из образцов с применением коммерчески доступных наборов, таких как набор для выделения ДНК Mo Bio Powersoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния),

15 набор для выделения ДНК Mo Bio Powersoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) или мининабор для выделения ДНК из кала QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Валенсия, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя.

[0229] Согласно некоторым вариантам реализации кПЦР может проводиться с применением HotMasterMix (5PRIME, Гейтерсберг, Мэриленд) и праймера, специфических в отношении представляющей интерес бактериальной композиции, и может проводиться на 96-луночном штрихкодированном реакционном планшете

20 MicroAmp® (MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode) (0,1 мл) (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) и выполняться на термоциклере BioRad C1000™, оснащенном системой реального времени CFX96™ (BioRad, Геркулес, Калифорния), с

25 регистрацией флуоресценции в каналах FAM и ROX. Значение Cq для каждой лунки в канале FAM определяют с помощью программного обеспечения CFX Manager™, версия 2.1. $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ для каждого экспериментального образца рассчитывают

30 подстановкой значений Cq для определенного образца в установленную по стандартной кривой линейную регрессионную модель, сравнивающую значения Cq для лунок, использованных для построения стандартной кривой, с известной $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ для

указанных образцов. Специалист может использовать и другие альтернативные режимы кПЦР.

Способы характеристики бактериальных композиций

[0230] Согласно определенным вариантам реализации предложены способы тестирования определенных характеристик бактериальных композиций. Например, определяют чувствительность бактериальных композиций к определенным параметрам окружающей среды, например, для отбора конкретных желательных характеристик для определенной композиции, состава и/или использования. Например, компоненты

40 бактериальной композиции могут тестироваться на pH-устойчивость, устойчивость к желчным кислотам и/или чувствительность к антибиотикам, либо индивидуально, то есть поочередно тестируется чувствительность каждого компонента, либо совместно, поскольку бактериальная композиция содержит несколько бактериальных компонентов (совместно называемых в данном разделе бактериальной композицией).

45 Тестирование на pH-чувствительность

[0231] Если предполагается введение бактериальной композиции не через толстую или прямую кишку (т.е., например, перорально), необязательное тестирование на pH-устойчивость улучшает качество отбора бактериальных композиций с максимальной

выживаемостью в условиях варьирующих значений pH различных областей ЖКТ. Понимание того, как бактериальные композиции реагируют на значения pH в ЖКТ, также помогает при приготовлении составов, то есть количество бактерий в лекарственной форме может быть увеличено, если это целесообразно, и/или композиция может вводиться в покрытой кишечнорастворимым покрытием капсуле или таблетке, либо с буферной или защитной композицией. Поскольку значения pH в желудке могут на непродолжительное время опускаться до pH 1-2 после приема богатой белком пищи и до того, как физиологические механизмы обеспечат коррекцию до pH 3-4, а в состоянии покоя значения pH часто составляют pH 4-5, а значения pH в тонком кишечнике могут варьировать от pH 6 до 7,4, могут быть получены бактериальные композиции, выживающие в указанных варьирующих диапазонах значений pH (в частности, отличающиеся тем, что по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или до 100% бактерий способны выживать в течение времени прохождения по ЖКТ в различных диапазонах значений pH). Эта способность может быть протестирована путем воздействия на бактериальную композицию значений pH в варьирующих диапазонах, на протяжении ожидаемого времени прохождения через ЖКТ при значениях pH в указанных диапазонах. Соответственно, согласно неограничивающему примеру, культуры бактериальных композиций возрастом 18 часов могут культивироваться на стандартной среде, например, среде для кишечной микробиоты («GMM», см. Goodman et al., Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice, PNAS 108(15):6252-6257 (2011)) или другой не содержащей продуктов животного происхождения среде, с добавлением корректирующих pH агентов для обеспечения значений pH 1-2 на протяжении 30 минут, pH 3-4 на протяжении 1 часа, pH 4-5 на протяжении 1-2 часов и pH 6-7,4 на протяжении 2,5-3 часов. Альтернативный способ тестирования устойчивости к кислотам описан в патенте США №4839281. Выживаемость бактерий может быть определена путем культивирования указанных бактерий и подсчета колоний на подходящих селективных или неселективных средах.

Тестирование на чувствительность к желчным кислотам

[0232] Дополнительно, согласно некоторым вариантам реализации тестирование на чувствительность к желчным кислотам улучшает качество отбора бактериальных композиций, выживающих при воздействии желчной кислоты при прохождении через ЖКТ. Желчные кислоты секретируются в тонкий кишечник и могут, как и значения pH, влиять на выживаемость бактериальных композиций. Указанная способность может быть протестирована путем воздействия на бактериальные композиции желчными кислотами на протяжении ожидаемого времени воздействия желчных кислот в ЖКТ. Например, могут быть получены растворы желчных кислот в нужных концентрациях с применением 0,05 mM Tris при pH 9 в качестве растворителя. После растворения желчной кислоты pH раствора может быть доведен до значения 7,2 добавлением 10% HCl. Бактериальные композиции могут культивироваться в 2,2 мл состава с желчными кислотами, имитирующего концентрацию и тип желчных кислот у пациента, 1,0 мл среды с 10% стерилизованных фильтрацией экскрементов и 0,1 мл 18-часовой культуры определенного штамма бактерий. Инкубирование может проводиться в течение 2,5-3 часов или дольше. Альтернативный способ тестирования стабильности при воздействии желчной кислотой описан в патенте США №4839281. Выживаемость бактерий может быть определена путем культивирования указанных бактерий и подсчета колоний на подходящих селективных или неселективных средах.

Тестирование на чувствительность к антибиотикам

[0233] Дополнительным необязательным тестом на чувствительность может быть тестирование бактериальных композиций на чувствительность к антибиотикам. Согласно одному варианту реализации бактериальные композиции могут быть выбраны таким образом, что бактериальные компоненты чувствительны к антибиотикам, соответственно, при необходимости они могут быть элиминированы или их количество в желудочно-кишечном тракте пациента по существу уменьшено при применении по меньшей мере одного антибиотика, направленно воздействующего на указанную бактериальную композицию.

Адгезивность в отношении клеток ЖКТ

[0234] Необязательно может проводиться тестирование бактериальных композиций на способность прикрепляться к клеткам ЖКТ. Способ тестирования адгезии к клеткам ЖКТ описан в патенте США №4839281.

Способы очищения спор

Обработка растворителем

[0235] Для очищения бактериальных спор фекальный материал один или несколько раз обрабатывают растворителем. Обработка растворителем представляет собой обработку смешивающимся растворителем (частично смешивающимся или полностью смешивающимся) или обработка несмешивающимся растворителем. Смешиваемость представляет собой способность двух жидкостей смешиваться друг с другом с образованием гомогенного раствора. Вода и этанол, например, полностью смешиваются, так что смесь, содержащая воду и этанол в любом соотношении, будет однофазной. Смешиваемость выражают через массовые % или через массу одного из растворителей на 100 г конечного раствора. Если два растворителя полностью смешиваются в любых пропорциях, их смешиваемость составляет 100%. Полностью смешивающиеся с водой растворы образуют спирты, например, метанол, этанол, изопропанол, бутанол и т.п. Спирты могут быть заранее соединены с водой; например, могут быть представлены 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 89%, 85%, 90%, 95% или более чем 95% раствором. Другие растворители являются только частично смешивающимися, что означает, что только определенная часть растворяется в воде. Простой диэтилэфир, например, частично способен смешиваться с водой. До 7 г простого диэтилэфира растворяются в 93 г воды с получением 7% (масс. %) раствора. Если добавить большее количество диэтилэфира, образуется двухфазный раствор с отдельным слоем диэтилэфира над водой. Другие смешиваемые материалы включают простые эфиры, диметоксиэтан или тетрагидрофуран. Напротив, масло, такое как алкан, и вода являются несмешиваемыми и образуют две фазы. Также обработку несмешивающимся растворителем необязательно комбинируют с детергентом, либо ионогенным, либо неионогенным. Примеры детергентов включают Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Nonidet P40, плюроник или полиол.

Хроматографическая обработка

[0236] Для очищения популяций спор фекальный материал подвергают одной или нескольким хроматографическим обработкам последовательно или параллельно. При хроматографической обработке раствор, содержащий фекальный материал, приводят в контакт с твердой средой, содержащей среду для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (НИС) или среду для аффинной хроматографии. Согласно альтернативному варианту реализации твердую среду, способную абсорбировать остаточный продукт среды обитания, присутствующий в фекальном материале, приводят в контакт с твердой средой, которая адсорбирует остаточный продукт среды обитания. Согласно определенным вариантам реализации указанная среда для НИС содержит

сефарозу или дериватизированную сефарозу, например, бутилсефарозу, октилсефарозу, фенилсефарозу или бутил-s-сефарозу. Согласно другим вариантам реализации указанная среда для аффинной хроматографии содержит материал, дериватизированный муцином типа I, II, III, IV, V или VI, или олигосахаридами, происходящими из муцинов или аналогичные происходящим из муцинов типа I, II, III, IV, V или VI. Как вариант, среда для аффинной хроматографии содержит материал, дериватизированный антителами, распознающими споробразующие бактерии.

Механическая обработка

[0237] Предложено физическое разрушение фекального материала, в частности, путем одной или нескольких механических обработок, таких как смешивание, перемешивание, встряхивание, обработка на вортексе, ударная пульверизация и обработка ультразвуком. Согласно настоящему изобретению указанная обработка с механическим разрушением по существу разрушает неспорный материал, присутствующий в фекальном материале, и по существу не разрушает споры, присутствующие в фекальном материале. Механическая обработка необязательно включает обработку фильтрацией, при которой нужные популяции спор остаются на фильтре, а нежелательные (неспорные) фекальные компоненты проходят через фильтр, и спорную фракцию извлекают из фильтрующей среды. Как вариант, нежелательные частицы и эукариотические клетки могут оставаться на фильтре, а бактериальные клетки, в том числе споры, могут проходить через фильтр. Согласно некоторым вариантам реализации спорную фракцию, оставшуюся на фильтрующей среде, подвергают диафильтрации, при этом указанные оставшиеся споры приводят в контакт с жидкостью для промывания, как правило, стерильным содержащим соли раствором или другим разбавителем, для дополнительного уменьшения количества или устранения нежелательных фекальных компонентой.

Термообработка

[0238] Предложено термическое разрушение фекального материала. Обычно фекальный материал смешивают с содержащим соли раствором, таким как забуференный фосфатом солевой раствор (ФСБ), и помещают в среду с повышенной температурой, например, в теплую комнату, инкубатор, на водяную баню, или т.п., таким образом, чтобы между нагретой средой и фекальным материалом происходил эффективный теплообмен. Предпочтительно раствор фекального материала перемешивают во время инкубирования для увеличения теплопроводности и разрушения агрегатов частиц. Термообработка может модулироваться за счет температуры окружающей среды и/или продолжительности термообработки. Например, фекальный материал или жидкость, содержащую фекальный материал, подвергают воздействию среды с повышенной температурой, например, горячей водяной бани, температура которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более чем 100°C, в течение по меньшей мере приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 секунд, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 минут, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 часов. Согласно определенным вариантам реализации термообработка происходит при двух различных температурах, например, в течение 30 секунд в среде с температурой 100 градусов Цельсия, а затем в течение 10 минут в среде с температурой 50 градусов Цельсия. Согласно предпочтительным вариантам реализации температура и продолжительность термообработки являются достаточными для гибели или удаления патогенных материалов, и при этом по существу не повреждают или не уменьшают количество способных к прорастанию спор.

Обработка облучением

[0239] Предложены способы обработки фекального материала или разделенных компонентов фекального материала ионизирующим излучением, как правило, гамма-излучением, ультрафиолетовым излучением или облучением электронным пучком с обеспечением уровня энергии, достаточного для гибели патогенных материалов, но по существу не повреждающего нужные популяции спор. Например, ультрафиолетовое излучение с длиной волны 254 нм с обеспечением уровня энергии, составляющим менее чем приблизительно 22000 мкВт на см² в секунду, обычно не разрушает требуемые споры.

Обработка центрифугированием и разделение по плотности

[0240] Предложены способы отделения требуемых популяций спор от других компонентов фекального материала путем центрифугирования. Раствор, содержащий фекальный материал, один или несколько раз обрабатывают центрифугированием, например, приблизительно при 1000×g, 2000×g, 3000×g, 4000×g, 5000×g, 6000×g, 7000×g, 8000×g или более чем 8000×g. Дифференциальное центрифугирование обеспечивает отделение требуемых спор от ненужного неспорового материала; при малых мощностях споры остаются в растворе, а при более высоких мощностях споры осаждаются, тогда как примеси меньшего размера (например, вирусные частицы, фаги) остаются в растворе. Например, при первом центрифугировании с малой мощностью осаждаются волокнистые материалы; при втором центрифугировании с большей мощностью осаждаются нежелательные эукариотические клетки, а при третьем центрифугировании с еще большей мощностью осаждаются требуемые споры, хотя загрязняющие примеси небольших размеров остаются в суспензии. Согласно некоторым вариантам реализации используются градиенты или «подушки» для разделения в градиенте плотности или подвижности (например, «ступенчатые подушки»), например, градиенты перколлы, фиколла, никоденза, гистоденза или сахарозы, для разделения требуемых популяций спор и других материалов в фекальном материале.

[0241] Также в настоящем документе предложены способы получения популяций спор, сочетающие два или большее число вариантов обработки, описанных в настоящем документе, для синергетического очищения требуемых спор наряду с уничтожением или удалением нежелательных материалов и/или активностей из популяции спор. Как правило, желательно сохранение популяций спор в не способствующих прорастанию и росту условиях и средах для минимизации роста патогенных бактерий, присутствующих в указанных популяциях спор, и для минимизации прорастания спор с образованием вегетативных бактериальных клеток.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

Составы

[0242] Предложены составы для введения человеку и другим нуждающимся в этом субъектам. Обычно бактериальные композиции комбинируют с дополнительными активными и/или неактивными материалами для получения конечного продукта, которые могут быть представлены единичной дозированной формой или многодозовым форматом.

[0243] Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция содержит по меньшей мере один углевод. «Углевод» относится к сахару или полимеру сахаров. Термины «сахарид», «полисахарид», «углевод» и «олигосахарид» могут быть использованы взаимозаменяемо. Большинство углеводов представляют собой альдегиды или кетоны с многочисленными гидроксильными группами, как правило, по одной на каждом атоме углерода в молекуле. Углеводы обычно имеют молекулярную формулу

$C_nH_{2n}O_n$. Углевод может представлять собой моносахарид, дисахарид, трисахарид, олигосахарид или полисахарид. Большинство основных углеводов представляют собой моносахариды, например, глюкоза, сахароза, галактоза, манноза, рибоза, арабиноза, ксилоза и фруктоза. Дисахариды представляют собой два соединенных моносахаридз.

Примеры дисахаридов включают сахарозу, мальтозу, целлобиозу и лактозу. Как правило, олигосахарид включает от трех до шести моносахаридных единиц (например, раффиноза, стахиоза), а полисахариды включают шесть или более моносахаридных единиц. Примеры полисахаридов включают крахмал, гликоген и целлюлозу. Углеводы могут содержать модифицированные сахаридные единицы, например, 2'-дезоксирибозу, где удалена гидроксильная группа, 2'-фторрибозу, где гидроксильная группа заменена на фтор, или N-ацетилглюкозамин, азотсодержащую форму глюкозы (например, 2'-фторрибоза, дезоксирибоза и гексоза). Углеводы могут существовать в виде множества различных форм, например, конформеров, циклических форм, ациклических форм, стереоизомеров, таутомеров, аномеров и изомеров.

[0244] Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция содержит по меньшей мере один липид. В настоящем документе «липид» включает жиры, масла, триглицериды, холестерин, фосфолипиды, жирные кислоты в любой форме, включая свободные жирные кислоты. Жиры, масла и жирные кислоты могут быть насыщенными, ненасыщенными (цис или транс) или частично ненасыщенными (цис или транс). Согласно некоторым вариантам реализации указанный липид содержит по меньшей мере одну жирную кислоту, выбранную из лауриновой кислоты (12:0), миристиновой кислоты (14:0), пальмитиновой кислоты (16:0), пальмитолеиновой кислоты (16:1), маргариновой кислоты (17:0), гептадеценовой кислоты (17:1), стеариновой кислоты (18:0), олеиновой кислоты (18:1), линолевой кислоты (18:2), линоленовой кислоты (18:3), октадекатетраеновой кислоты (18:4), арахидоновой кислоты (20:0), эйкозеновой кислоты (20:1), эйкозодиеновой кислоты (20:2), эйкозатетраеновой кислоты (20:4), эйкозапентаеновой кислоты (20:5) (ЭПК), докозановой кислоты (22:0), докозеновой кислоты (22:1), докозапентаеновой кислоты (22:5), докозагексановой кислоты (22:6) (ДГК), и тетракозановой кислоты (24:0). Согласно другим вариантам реализации указанная композиция содержит по меньшей мере один модифицированный липид, например, липид, который был модифицирован посредством кулинарной обработки.

[0245] Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция содержит по меньшей мере один дополнительный минеральное вещество или источник минерального вещества. Примеры минеральных веществ включают, без ограничения: хлорид, натрий, кальций, железо, хром, медь, йод, цинк, магний, марганец, молибден, фосфор, калий и селен. Подходящий формы любых из перечисленных минеральных веществ включают растворимые минеральные соли, малорастворимые минеральные соли, нерастворимые минеральные соли, хелатированные минеральные вещества, минеральные комплексы, нереакционноспособные минеральные вещества, такие как карбонильные минеральные вещества, и восстановленные минеральные вещества и их комбинации.

[0246] Согласно определенным вариантам реализации указанная композиция содержит по меньшей мере один дополнительный витамин. Указанный по меньшей мере один витамин может относиться к жирорастворимым или водорастворимым витаминам. Подходящие витамины включают, не ограничиваясь перечисленными, витамин С, витамин А, витамин Е, витамин В12, витамин К, рибофлавин, ниацин, витамин D, витамин В6, фолиевую кислоту, пиридоксин, тиамин, пантотеновую кислоту и биотин. Подходящие формы любых из перечисленных витаминов представлены солями

витамина, производными витамина, компонентами, обладающими идентичной или аналогичной витамину активностью, и метаболитами витамина.

[0247] Согласно другим вариантам реализации указанная композиция содержит вспомогательное вещество. Неограничивающие примеры подходящих вспомогательных веществ включают буферизующий агент, консервант, стабилизатор, связывающее вещество, уплотняющий агент, смазывающее вещество, усилитель диспергирования, улучшающий распадаемость агент, вкусоароматический агент, подсластитель и красящий агент.

[0248] Согласно другому варианту реализации указанное вспомогательное вещество представляет собой буферизующий агент. Неограничивающие примеры подходящих буферизующих агентов включают цитрат натрия, карбонат магния, бикарбонат магния, карбонат кальция и бикарбонат кальция.

[0249] Согласно некоторым вариантам реализации указанное вспомогательное вещество содержит консервант. Неограничивающие примеры подходящих консервантов включают антиоксиданты, такие как альфа-токоферол и аскорбат, и противомикробные средства, такие как парабены, хлорбутанол и фенол.

[0250] Согласно другим вариантам реализации указанная композиция содержит связывающее вещество в качестве вспомогательного вещества. Неограничивающие примеры подходящих связывающих веществ включают крахмал, прежелатинизированный крахмал, желатин, поливинилпирролидон, целлюлозу, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, этилцеллюлозу, полиакриламиды, поливинилоксоазолидон, поливиниловые спирты, спирт жирной кислоты C₁₂-C₁₈, полиэтиленгликоль, полиолы, сахараиды, олигосахарида и их комбинации.

[0251] Согласно другому варианту реализации указанная композиция содержит смазывающее вещество в качестве вспомогательное вещество. Неограничивающие примеры подходящих смазывающих веществ включают стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, гидрогенизированные растительные масла, стеротекс, полиоксиэтилена моностеарат, тальк, полиэтиленгликоль, бензоат натрия, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния и легкое минеральное масло.

[0252] Согласно другим вариантам реализации указанная композиция содержит усилитель диспергирования в качестве вспомогательного вещества. Неограничивающие примеры подходящих диспергирующих агентов включают крахмал, альгиновую кислоту, поливинилпирролидоны, гуаровую камедь, каолин, бентонит, очищенную древесную целлюлозу, натрия крахмала гликолят, изоаморфный силикат и микрокристаллическую целлюлозу как эмульгирующие поверхностно-активные вещества с высоким ГЛБ.

[0253] Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция содержит разрыхлитель в качестве вспомогательного вещества. Согласно другим вариантам реализации указанный разрыхлитель представляет собой нешипучий разрыхлитель. Неограничивающие примеры подходящих нешипучих разрыхлителей включают крахмал, например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, их прежелатинизированный и модифицированный крахмал, подсластители, глины, такие как бентонит, микрокристаллическую целлюлозу, альгинаты, натрия крахмала гликолят, камеди, такие как агар-агар, гуаровая камедь, камедь плодов рожкового дерева, камедь карайя, пектин и трагакант. Согласно другому варианту реализации указанный разрыхлитель представляет собой шипучий разрыхлитель. Неограничивающие примеры подходящих шипучих разрыхлителей включают бикарбонат натрия в комбинации с лимонной кислотой, и бикарбонат натрия в комбинации с винной кислотой.

[0254] Согласно другому варианту реализации указанное вспомогательное вещество

содержит вкусоароматический агент. Вкусоароматические агенты могут быть выбраны из синтетических ароматических масел и вкусоароматических веществ; природных масел; экстрактов растений, листьев, цветов и плодов; и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации вкусоароматический агент выбирают из коричневых масел; масла гаультерии; перечно-мятных масел; масла клевера; масла плевела пастбищного; масла аниса; эвкалипта; ванили; цитрусового масла, например, масла лимона, масла апельсина, винограда, грейпфрута; и фруктовых эссенций, в том числе яблока, персика, груши, клубники, малины, вишни, сливы, ананаса и абрикоса.

[0255] Согласно другим вариантам реализации указанное вспомогательное вещество включает подсластитель. Неограничивающие примеры подходящих подсластителей включают глюкозу (кукурузный сироп), декстрозу, инвертный сахар, фруктозу и их смеси (когда они не используются в качестве носителя); сахарин и различные соли сахарина, такие как натриевая соль; дипептидные подсластители, такие как аспартам; дигидрохалконовые компоненты, глицирризин; *Stevia Rebaudiana* (стевиозид); хлорные производные сахарозы, такие как сукралоза; и сахарные спирты, такие как сорбит, маннит, силит, и т.п. Также включены гидрогенизированные гидролизаты крахмала и синтетический подсластитель 3,6-дигидро-6-метил-1,2,3-оксатиазин-4-он-2,2-диоксид, в частности, его калиевая соль (ацесульфам-К), а также натриевые и кальциевые соли.

[0256] Согласно другим вариантам реализации указанная композиция содержит красящий агент. Неограничивающие примеры подходящих красящих агентов включают пищевые, лекарственные и косметические красители (FD&C), лекарственные и косметические красители (D&C), и лекарственные и косметические красители для наружного применения (Ext. D&C). Красящие агенты могут использоваться в форме красителей или соответствующих им пигментов.

[0257] Массовая доля вспомогательного вещества или комбинации вспомогательных веществ в составе составляет обычно приблизительно 99% или менее, например, приблизительно 95% или менее, приблизительно 90% или менее, приблизительно 85% или менее, приблизительно 80% или менее, приблизительно 75% или менее, приблизительно 70% или менее, приблизительно 65% или менее, приблизительно 60% или менее, приблизительно 55% или менее, 50% или менее, приблизительно 45% или менее, приблизительно 40% или менее, приблизительно 35% или менее, приблизительно 30% или менее, приблизительно 25% или менее, приблизительно 20% или менее, приблизительно 15% или менее, приблизительно 10% или менее, приблизительно 5% или менее, приблизительно 2% или менее, или приблизительно 1% или менее от общей массы указанной композиции.

[0258] Бактериальные композиции, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть введены в разнообразные составы и могут вводиться с применением ряда различных способов. Указанные композиции могут вводиться перорально, ректально или парентерально, в виде составов, при необходимости содержащих стандартные приемлемые носители, адъюванты и основы. Термин «парентеральный» в настоящем документе включает техники подкожного, внутривенного, внутримышечного или внутригрудного инъектирования и инфузии. Согласно примеру варианта реализации бактериальную композицию вводят перорально.

[0259] Твердые дозированные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, капли, пилюли, драже, пастилки, порошки и гранулы. Капсула, как правило, содержит материал сердцевин, содержащий бактериальную композицию, и оболочку, которая инкапсулирует материал сердцевин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный материал сердцевин содержит по меньшей мере что-либо одно

из твердого вещества, жидкости и эмульсии. Согласно другим вариантам реализации указанный материал оболочки содержит по меньшей мере что-либо одно из мягкого желатина, твердого желатина и полимера. Подходящие полимеры включают, не ограничиваясь перечисленными: полимеры целлюлозы, такие как

- 5 гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза (НРМС), метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы, фталат ацетата целлюлозы, тримеллитат ацетата целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлоза натрия; полимеры и сополимеры акриловой кислоты, такие как образованные из акриловой кислоты, метакриловой кислоты, метилакрилата, метилакрилата аммония, этилакрилата, метилметакрилата и/или этилметакрилата (например, сополимеры, продаваемые под торговым наименованием «Эудрагит» (Eudragit)); виниловые полимеры и сополимеры, такие как полвинилпирролидон, поливинилацетат, поливинилацетатфталат, сополимер винилацетата и кротоновой кислоты и сополимеры этилена и винилацетата; и шеллак (очищенный сырой шеллак). Согласно другим вариантам реализации по меньшей мере один полимер функционирует в качестве маскирующего вкус агента.

- [0260] Таблетки, пилюли и т.п. могут быть прессованными, многократно прессованными, многослойными и/или покрытыми оболочкой. Покрытие может быть однослойным или многослойным. Согласно одному варианту реализации материал для покрытия содержит по меньшей мере что-либо одно из сахара, полисахарида и гликопротеинов, экстрагированных по меньшей мере из чего-либо одного из растения, гриба и микроорганизма. Неограничивающие примеры включают кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, картофельный крахмал, тапиоковый крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза, декстраны, мальтодекстрин, циклодекстрины, инулины, пектин, маннаны, гуммиарабик, камедь плодов рожкового дерева, камедь мескитового дерева, гуаровую камедь, камедь карайя, камедь гхатти, трагакантовую камедь, фунори, каррагинаны, агар-агар, альгинаты, хитозаны или геллановую камедь. Согласно некоторым вариантам реализации материал для покрытия содержит белок. Согласно другому варианту реализации указанный материал для покрытия содержит по меньшей мере что-либо одно из жира и масла. Согласно другим вариантам реализации указанное по меньшей мере что-либо одно из жира и масла имеет высокую температуру плавления. Согласно еще одному варианту реализации указанное по меньшей мере что-либо одно из жира и масла гидрогенизировано или частично гидрогенизировано. Согласно одному варианту реализации по меньшей мере что-либо одно из жира и масла получено из растения. Согласно другим вариантам реализации указанный по меньшей мере что-либо одно из жира и масла содержит по меньшей мере что-либо одно из глицеридов, свободных жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот. Согласно некоторым вариантам реализации указанный материал для покрытия содержит по меньшей мере один пищевой воск. Указанный пищевой воск может быть получен из животных, насекомых или растений. Неограничивающие примеры включают пчелиный воск, ланолин, воск мирики, карнаубский воск и воск рисовых отрубей. Кроме того, могут быть получены таблетки и пилюли с кишечнорастворимыми покрытиями.

- [0261] Как вариант, порошки или гранулы, в форме которых реализованы бактериальные композиции, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть включены в пищевой продукт. Согласно некоторым вариантам реализации указанный пищевой продукт представляет собой напиток для перорального приема. Неограничивающие примеры подходящих напитков включают фруктовый сок, фруктовый напиток, искусственно ароматизированный напиток, искусственно подслащенный напиток

газированный напиток, спортивный напиток, жидкий молочный продукт, коктейль, алкогольный напиток, напиток с кофеином, детское питание и т.д. Другие подходящие способы перорального введения включают водные и неводные растворы, эмульсии, суспензии, а также растворы и/или суспензии, восстанавливаемые из нешипучих гранул, содержащих по меньшей мере что-либо одно из подходящих растворителей, консервантов, эмульгирующих агентов, суспендирующих агентов, разбавителей, подсластителей, красящих агентов и вкусоароматических агентов.

[0262] Согласно некоторым вариантам реализации указанный пищевой продукт может представлять собой твердый пищевой продукт. Подходящие примеры твердого пищевого продукта включают без ограничения питательный батончик, закусочный батончик, печенье, брауни, маффин, крекер, брикет мороженого, замороженный йогуртовый брикет и т.п.

[0263] Согласно другим вариантам реализации раскрытые в настоящем изобретении композиции включены в продукты лечебного питания. Согласно некоторым вариантам реализации указанные продукты лечебного питания представляют собой готовый к применению пищевой продукт, который необязательно содержит некоторые или все необходимые макроэлементы и микроэлементы. Согласно другому варианту реализации раскрытые в настоящем изобретении композиции включены в пищевую добавку, предназначенную для смешивания с обычной пищей. Согласно одному варианту реализации указанная пищевая добавка содержит некоторые или все необходимые макроэлементы и микроэлементы. Согласно другому варианту реализации раскрытые в настоящем изобретении бактериальные композиции смешивают или добавляют в обычную пищу для повышения белковой ценности пищи. Примеры включают основные виды продовольствия (зерновые продукты, соль, сахар, масло для приготовления пищи, маргарин), напитки (кофе, чай, газированные напитки, пиво, спиртные напитки, спортивные напитки), снежки, сладости и другие пищевые продукты.

[0264] Согласно одному варианту реализации указанными составами наполняют желатиновые капсулы для перорального введения. Примером подходящей капсулы является желатиновая капсула массой 250 мг, содержащая от 10 (до 100 мг)

лиофилизированного порошка (от 10^8 до 10^{11} бактерий), 160 мг микрокристаллической целлюлозы, 77,5 мг желатина и 2,5 мг стеарата магния. Согласно альтернативному варианту реализации может быть использовано от 10^5 до 10^{12} , от 10^5 до 10^7 , от 10^6 до 10^7 , или от 10^8 до 10^{10} бактерий, с соответствующими корректировками вспомогательных веществ при необходимости. Согласно альтернативному варианту реализации может использоваться капсула или таблетка с кишечнорастворимым покрытием или с буферной или защитной композицией.

ПРИМЕРЫ

[0265] Ниже приведены примеры конкретных вариантов реализации настоящего изобретения. Указанные примеры предложены исключительно в иллюстративных целях, и не предназначены для какого-либо ограничения объема настоящего изобретения. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность приводимых численных значений (например, количеств, температур и т.п.), однако следует, разумеется, учитывать возможность определенных экспериментальных ошибок и погрешностей.

[0266] При реализации настоящего изобретения используются, если не указано иное, стандартные способы химии белков, биохимии, техник рекомбинантной ДНК и фармакологии на существующем уровне техники. Такие техники подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*

(W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., текущее издание); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992).

Пример 1. Получение фекального материала.

[0267] Свежие образцы фекалий получали от здоровых доноров-людей, прошедших скрининг на общее хорошее состояние здоровья и отсутствие инфекционных заболеваний, отвечающих критериям включения и исключения, при этом критерии включения включают хорошее состояние здоровья, отсутствие серьезных заболеваний в анамнезе, по результатам физического осмотра или аномальных клинических показателей, регулярное опорожнение кишечника со стулом, внешний вид которого соответствует, как правило, 2, 3, 4, 5 или 6 типу согласно Бристольской шкале стула, и имеющих ИМТ ≥ 18 кг/м² и ≤ 25 кг/м². Критерии исключения, как правило, предусматривали значимые хронические или острые медицинские состояния, в том числе заболевания почек, печени, легких, ЖКТ, сердечно-сосудистой системы, мочеполовой системы, эндокринной системы, иммунной системы, обмена веществ, неврологическое или гематологическое заболевание, наличие в семейном анамнезе воспалительного заболевания кишечника, в том числе болезни Крона и язвенного колита, синдрома раздраженного кишечника, злокачественные новообразования толстой кишки, желудка или другой области ЖКТ, или синдрома полипоза желудочно-кишечного тракта, или недавнее употребление йогурта или коммерческих пробиотических материалов, где первичным(и) компонентом(ами) является организм (ы). Образцы собирали непосредственно с применением системы сбора образцов на основе кресла-туалета, включающей пластиковый держатель, устанавливаемый на туалетное сиденье, и контейнер для сбора образцов, установленный на держателе. Экскременты попадали в контейнер, после чего на контейнер помещали крышку и плотно закрывали. Затем помещенный на лед образец не позднее чем через 1-4 часов доставляли для обработки. Образцы перемешивали стерильным одноразовым инструментом, и аликвоты массой 2-4 г взвешивали, помещали в пробирки и мгновенно замораживали на ледяной бане с сухим льдом/этанолом. Аликвоты хранили в замороженном состоянии при -80°C до использования.

[0268] Необязательно фекальный материал суспендировали в растворе, и/или удаляли волокна и/или частицы. Извлекали замороженную хранящуюся при -80°C аликвоту, содержащую известную массу экскрементов, и размораживали при комнатной температуре. Добавляли стерильный 1×ФСБ для получения 10% суспензии (масса/объем), и интенсивно перемешивали на вортексе для суспендирования фекального материала до достижения гомогенного внешнего вида материала. Затем материалу позволяли отстояться в течение 10 минут при комнатной температуре для осаждения волокон и частиц. После этого суспензию над осадком аккуратно забирали в новую пробирку, и она содержала очищенную популяцию спор. Необязательно, затем суспензию центрифугировали на низкой скорости, например, 1000×g, в течение 5 минут для осаждения частиц, в том числе волокон. Осадок утилизировали, а супернатант, содержащий вегетативные организмы и споры, помещали в новую пробирку. Затем супернатант центрифугировали при 6000×g в течение 10 минут для осаждения вегетативных организмов и спор. Затем осадок ресуспендировали в 1×ФСБ при интенсивном перемешивании на вортексе до достижения гомогенного внешнего вида

материала.

Пример 2. Очищение спор из обработанного спиртом фекального материала.

[0269] 10% суспензию (масса/объем) фекального материала человека в ФСБ смешивали с абсолютным этанолом в соотношении 1:1 и перемешивали на вортексе в течение 1 минуты. Суспензию инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После инкубирования суспензию центрифугировали на 13000 об/мин в течение 5 минут для осаждения спор. Супернатант утилизировали, а осадок ресуспендировали в равном объеме ФСБ. Добавляли глицерин до конечной концентрации 15% и помещали очищенную споровую фракцию на хранение при -80°C.

Пример 2А. Получение состава со спорами из обработанного спиртом фекального материала.

[0270] 10% суспензию (масса/объем) фекального материала человека в ФСБ смешивали с абсолютным этанолом в соотношении 1:1 и перемешивали на вортексе в течение 1 минуты. Суспензию инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После инкубирования суспензию центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут для концентрации спор в осадке, содержащем очищенный споровый состав. Супернатант утилизировали, а осадок ресуспендировали в равном объеме ФСБ. Добавляли глицерин до конечной концентрации 15% и помещали очищенный состав со спорами на хранение при -80°C.

Пример 3. Очищение спор из термообработанного фекального материала.

[0271] 10% суспензию (масса/объем) фекального материала человека в ФСБ инкубировали на водяной бане при 80°C в течение 30 минут. Добавляли глицерин до конечной концентрации 15% и помещали обогащенный споросодержащий материал на хранение при -80°C.

Пример 4. Очищение спор из обработанного спиртом и термообработанного фекального материала.

[0272] 10% суспензию (масса/объем) экскрементов человека в ФСБ смешивали с абсолютным этанолом в соотношении 1:1 и перемешивали на вортексе в течение 1 минуты. Суспензию инкубировали на водяной бане в аэробных условиях при 37°C в течение 1 часа. После инкубирования суспензию центрифугировали на 13000 об/мин в течение 5 минут для осаждения спор. Супернатант утилизировали, а осадок ресуспендировали в равном объеме ФСБ. Затем обработанную этанолом популяцию спор инкубировали на водяной бане при 80°C в течение 30 минут. Добавляли глицерин до конечной концентрации 15% и помещали очищенную споровую фракцию на хранение при -80 C.

Пример 5. Очищение спор из обработанного детергентом фекального материала.

[0273] Получают 10% суспензию (масса/объем) экскрементов человека в ФСБ, содержащую конечную концентрацию Triton X-100 от 0,5 до 2%. После инкубирования при встряхивании в течение 30 минут при 25-37°C образец центрифугировали на 1000 g в течение 5-10 минут для осаждения частиц и больших клеток. Бактериальные споры извлекают из фракции супернатанта, при этом очищенная популяция спор может необязательно подвергаться дополнительной обработке, например, согласно примеру 4. Без привязки к конкретной теории, добавление детергента к фекальной смеси обеспечивает получение более качественных популяций спор, по меньшей мере отчасти за счет улучшения отделения спор от частиц, что приводит к большему выходу спор.

Пример 6. Очищение спор путем хроматографического разделения фекального материала.

[0274] Обогащенную спорами популяцию, например, полученную согласно примерам

1-5 выше, смешивают с NaCl до конечной общей концентрации соли 4М и приводят в контакт с октилсефарозой 4 Fast Flow для связывания гидрофобной споровой фракции. Смола промывают 4М NaCl для удаления менее гидрофобных компонентов, споры элюируют дистиллированной водой, и собирают нужную обогащенную споровую

фракцию на основании УФ-поглощения.

Пример 7. Очищение спор путем фильтрации фекального материала.

[0275] Обогащенную спорами популяцию, например, полученную согласно примерам 1-6 выше, разбавляют ФСБ до 1:10 и помещают в резервуар системы для тангенциальной проточной микрофильтрации. Гидрофильный тангенциальный фильтр из смешанного эфира целлюлозы с размером пор 0,2 мкм соединяют с резервуаром, например, посредством трубки, замкнутой в петлю. Разбавленный состав со спорами многократно прокачивают по петле насосом, и под действием градиента давления на стенках микрофилтра жидкость супернатанта проходит через поры фильтра. При правильном выборе размера пор фильтра требуемые бактериальные споры удерживаются, а загрязняющие примеси меньшего размера, такие как клеточный дебрис, и другие загрязняющие примеси в экскрементах, такие как бактериофаги, проходят через фильтр. Периодически в резервуар добавляют свежий ФСБ-буфер для улучшения вымывания загрязняющих примесей. В конце диафильтрации споры концентрируют приблизительно десятикратно до исходной концентрации. Очищенные споры собирали из резервуара и хранили согласно описанию в настоящем документе.

Пример 8. Характеризация очищенных популяций спор.

[0276] Количество жизнеспособных спор подсчитывают, выполняя 10-кратные серийные разведения в ФСБ и высевая в чашки Петри на кровяной агар для Brucella или подходящую твердую среду. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 2 дней. Подсчитывают колонии на чашке для разведения с 50-400 колоний и используют для обратного подсчета числа жизнеспособных спор в популяции. Также продемонстрирована способность к росту с образованием вегетативных бактерий. Визуально количество подсчитывают с применением фазово-контрастной микроскопии. Состав со спорами либо разводят в ФСБ, либо концентрируют путем центрифугирования, и аликвоту объемом 5 мкл помещают в счетную камеру Петрова-Хауссера для визуализации при увеличении 400x. Подсчитывают споры в полях сетки размером 0,05 мм × 0,05 мм, определяют среднее подсчитанное число спор на поле и используют для расчета количества спор на мл состава. Уменьшение количества липополисахарида (ЛПС) в очищенных популяциях спор измеряют с применением анализа с лизатом амебоцитов мечехвоста (LAL), например, коммерчески доступного набора ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript, Пискатауэй, Нью-Джерси) или других стандартных способов, известных специалистам в данной области техники.

Пример 9. Определение бактериальных патогенов в очищенных популяциях спор.

[0277] Бактериальные патогены, присутствующие в очищенной популяции спор, определяют с помощью кПЦР с применением специфических олигонуклеотидных праймеров следующим образом.

[0278] Получение стандартных кривых. Стандартную кривую строят на основании лунок, содержащих представляющий интерес патоген в известной концентрации, или одновременно количественно определяют с применением селективного посева бляшкой. Серийные разведения культур в двух повторностях выполняют в стерильном забуференном фосфатом солевом растворе. Затем из образцов для стандартной кривой наряду с другими образцами экстрагируют геномную ДНК.

Экстракция геномной ДНК.

[0279] Геномная ДНК может быть экстрагирована из 100 мкл образцов фекалий, происходящих из фекалий образцов или очищенных составов со спорами с применением набора для выделения ДНК Mo Bio Powersoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя, с двумя исключениями: измельчение гранулами выполняют в течение 2×4:40 минут с применением гомогенизатора BioSpec Mini-Beadbeater-96 (BioSpec Products, Бартлзвилль, Оклахома) и ДНК элюируют в 50 мкл раствора С6. Как вариант, геномная ДНК может быть выделена с применением набора для выделения ДНК Mo Bio Powersoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния), набора для ПЦР Sigma-Aldrich Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit, мининабора QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Валенсия, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителей.

Состав и условия для кПЦР.

[0280] Реакция кПЦР для детекции *C. difficile* включает 1× HotMasterMix (5PRIME, Гейтерсберг, Мэриленд), 900 нМ Wt-tcdB-F (AGCAGTTGAATATAGTGGTTTAGTTAG AGTTG, IDT, Коралвилль, Айова), 900 нМ Wt-tcdB-R (CATGCTTTTTTAGTTTCTGGATTGAA, IDT, Коралвилль, Айова), 250 нМ We-tcdB-P (6FAM-CATCCAGTCTCAATTGTATATGTTTCTCCA-MGB, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) и воду для ПЦР (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) до 18 мкл (модифицированные праймеры на основе: Wroblewski, D. et al. Rapid Molecular Characterization of *Clostridium difficile* and Assessment of Populations of *C. difficile* in Stool Specimens. Journal of Clinical Microbiology 47:2142-2148 (2009)). Аликвоты указанной реакционной смеси распределяют в лунки 96-луночного штрихкодированного реакционного планшета MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (0,1 мл) (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк). К указанной реакционной смеси добавляют 2 мкл экстрагированной геномной ДНК. Проводят кПЦР на термоциклере BioRad C1000™, оборудованном системой реального времени CFX96™ Real-Time System (BioRad, Геркулес, Калифорния). Используют следующие условия термоциклирования: 95°C в течение 2 минут с последующими 45 циклами при 95°C по 3 секунды, 60°C по 30 секунд, и регистрируют флуоресценцию в каналах FAM и ROX. Другие бактериальные патогены могут быть детектированы с применением праймеров и зонда, специфических в отношении представляющего интерес патогена.

Анализ данных.

[0281] Значение Cq для каждой лунки канала FAM определяют с применением программного обеспечения CFX Manager™, версия 2.1. Значение log10(КОЕ/мл) для каждого экспериментального образца рассчитывают путем подстановки значения Cq определенного образца в линейную регрессионную модель, установленную по стандартной кривой, сравнивающую значения Cq лунок, использованных для стандартной кривой, с известными log10(КОЕ/мл) для указанных образцов.

[0282] Вирусные патогены, присутствующие в очищенной популяции спор, определяют с помощью кПЦР согласно описанию в настоящем документе, а также иными известными в данной области техники способами.

Пример 10: Идентификация видов

[0283] Идентичность спорообразующих видов, выросших из комплексной фракции, может быть определена несколькими способами. Во-первых, индивидуальные колонии могут высеваться уколом в жидкую среду в формате 96-луночных планшетов, культивироваться и храниться в виде основных растворов в 15% глицерине при -80C. Аликвоты указанных культур могут быть помещены в лизирующий клеточный буфер,

и могут использоваться методы ПЦР колоний для амплификации и секвенирования гена 16S рРНК (Пример 2). Как вариант, колонии могут быть полностью очищены несколькими пересевами методом штриха на твердой среде. Хорошо выраженные колонии высевают методом штриха на новые чашки того же типа и инкубируют в течение 48-72 часов при 37°C. Процесс повторяют несколько раз для подтверждения полной чистоты. Чистые культуры могут анализироваться с применением фенотипических методов или секвенирования, в том числе амплификации и секвенирования 16S рРНК согласно описанию в примерах 11 и 12. Определение последовательностей в чистых изолятах или смешанных сообществах, например, соскобах с чашек и споровых фракциях, может также включать полногеномное секвенирование методом «дробовика». Последний метод подходит для определения присутствия генов, связанных со споруляцией, устойчивостью к антибиотикам, патогенности и вирулентности. Колонии могут также собираться соскобом с чашек *en masse* и секвенироваться с применением метода массивного параллельного секвенирования согласно описанию в примерах 11 и 12, что обеспечивает идентификацию индивидуальных 16S-«сигнатур» в комплексной смеси. Необязательно образец может быть секвенирован до прорастания (при использовании подходящих процедур выделения ДНК для лизиса и высвобождения ДНК из спор) для сравнения разнообразия способных к прорастанию видов с общим числом видов в споровом образце. В качестве альтернативного варианта или как дополнение к анализу 16S может также использоваться времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией лазерной десорбцией при содействии матрицы (МАЛДИ) для идентификации видов (см. обзор в *Anaerobe* 22: 123).

Пример 11: 16S-секвенирование для определения функциональных таксономических единиц (OTU)

Способ определения последовательности 16S

[0284] OTU могут быть определены посредством полного 16S-секвенирования гена рРНК, посредством секвенирования конкретной гипервариабельной области указанного гена (т.е. V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 или V9) или посредством секвенирования любой комбинации гипервариабельных областей указанного гена (например, V1-3 или V3-5). Длина бактериальных 16S рРНК составляет приблизительно 1500 нуклеотидов и их используют для реконструкции эволюционных взаимосвязей и сходства последовательностей между бактериальными изолятами с применением филогенетических методов. Последовательности 16S используют для филогенетической реконструкции, поскольку они обычно высококонсервативны, однако содержат специфические гипервариабельные области, содержащие достаточно разнообразные нуклеотиды для различения родов и видов большинства микроорганизмов.

[0285] С применением хорошо известных техник, для определения полной последовательности 16S или последовательности любой гипервариабельной области последовательности 16S, геномную ДНК экстрагируют из бактериального образца, 16S рРНК (полную область или конкретные гипервариабельные области) амплифицировали с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР), очищали продукты ПЦР и устанавливали нуклеотидные последовательности для определения генетического состава гена 16S или суб домена указанного гена. При проведении 16S-секвенирования используемый способ секвенирования может представлять собой, не ограничиваясь указанным, секвенирование по Сэнгеру. Если используются одна или большее количество гипервариабельных областей, таких как область V4, секвенирование может проводиться с применением, не ограничиваясь перечисленными, метода Сэнгера

или метода секвенирования нового поколения, такого как секвенирование Illumina (секвенирование путем синтеза) с применением штрихкодированных праймеров, позволяющих проводить несколько реакций.

[0286] Помимо гена рРНК 16S, OTU можно определять путем секвенирования выбранной группы генов, которые известны как маркерные гены определенного вида или таксономической группы OTU. Указанные гены могут, как вариант, анализироваться с применением стратегии скрининга на основе ПЦР. Например, различные штаммы патогенной *Escherichia coli* можно отличить, используя ДНК генов, кодирующих термолабильные (LTI, LTIa и LTIb) и термостабильные (STI и STII) токсины, веротоксин типов 1, 2 и 2e (VT1, VT2 и VT2e, соответственно), цитотоксические некротизирующие факторы (CNF1 и CNF2), механизмы прикрепления и сглаживания (eaeA), энтероагрегативные механизмы (Eagg) и энтероинвазивные механизмы (Einv). Специалистам в области таксономической идентификации на основе секвенирования известны оптимальные гены для использования в качестве маркерных генов при определении таксономической принадлежности OTU.

Экстракция геномной ДНК

[0287] Геномную ДНК экстрагируют из чистых культур микроорганизмов с применением метода горячего щелочного лизиса. 1 мкл культуры микроорганизмов добавляют к 9 мкл лизирующего буфера (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA), и смесь инкубируют при 95°C в течение 30 минут. Затем образцы охлаждают до 4°C и нейтрализуют добавлением 10 мкл нейтрализующего буфера (40 mM Tris-HCl), и 10-кратно разводят элюирующим буфером (10 mM Tris-HCl). Как вариант, геномную ДНК экстрагируют из чистых культур микроорганизмов с применением коммерчески доступных наборов, таких как набор для выделения ДНК Mo Bio Ultraclean® Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния), или с помощью стандартных способов, известных специалистам в данной области техники.

Амплификация последовательностей 16S для прямого секвенирования по Сэнгеру

[0288] Для амплификации бактериальных 16S рРНК (фиг. 1А) 2 мкл экстрагированной гДНК добавляют в 20 мкл конечного объема ПЦР-реакции. В случае полноразмерного 16S-секвенирования реакция ПЦР также включает 1× HotMasterMix (5PRIME, Гейтерсберг, Мэриленд), 250 нМ 27f (AGRGTTTGATCMTGGCTCAG, IDT, Коралвилль, Айова) и 250 нМ 1492г (TACGGYTACCTTGTTAYGACTT, IDT, Коралвилль, Айова) с водой для ПЦР (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) для уравнивания объема. Как вариант, используют другие универсальные бактериальные праймеры или термостабильные полимеразы, известные специалистам в данной области техники. Например, специалистам в данной области техники доступны праймеры для секвенирования «V1-V9-областей» 16S рРНК (фиг. 1А). Указанные области относятся к первым девяти гипервариабельным областям гена 16S рРНК, которые используют для генотипирования бактериальных образцов. Указанные области у бактерий определяют нуклеотиды 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 и 1435-1465, соответственно, с применением нумерации на основе системы номенклатуры *E. coli*. Brosius et al., Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, PNAS 75(10):4801-4805 (1978). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере какую-либо одну из областей V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 и V9 используют для определения OTU. Согласно одному варианту реализации области V1, V2, и V3 используют для определения OTU. Согласно другому варианту реализации области V3, V4, и V5 используют для определения OTU. Согласно другому варианту реализации область V4 используют для определения OTU. Специалист в данной

области техники может идентифицировать специфические гипервариабельные области кандидатной 16S рРНК (на фиг. 1А) путем сравнения представляющей интерес кандидатной последовательности с референсной последовательностью (фиг. 1В) и идентификации гипервариабельных областей на основании сходства с референсными гипервариабельными областями.

[0289] ПЦР выполняют на коммерчески доступных термоциклерах, например, BioRad MyCycler™ (BioRad, Геркулес, Калифорния). Реакции проводят при 94°C в течение 2 минут с последующими 30 циклами при 94°C в течение 30 секунд, 51°C в течение 30 секунд, и 68°C в течение 1 минуты и 30 секунд, с последующим 7-минутным удлинением при 72°C и периодом неопределенной продолжительности при 4°C. После ПЦР проводят гель-электрофорез части реакционных продуктов для подтверждения успешной амплификации продукта размером ~1,5 кБ.

[0290] Для удаления нуклеотидов и олигонуклеотидов из продуктов ПЦР 2 мкл НТ ExoSap-IT (Affymetrix, Санта-Клара, Калифорния) добавляют к 5 мкл продукта ПЦР с последующим 15-минутным инкубированием при 37°C, и затем 15-минутной инактивацией при 80°C.

Амплификация последовательностей 16S для прямого определения с применением технологий массивного параллельного секвенирования

[0291] Для проведения амплификации для прямого секвенирования с использованием технологий на основе коротких прочтений, такой как Illumina, требуется применение праймеров, известных специалистам в данной области техники, дополнительно включающих основанную на последовательностях штрихкодированную метку.

Например, для амплификации гипервариабельной области V4 16s бактериальной 16S рРНК, 2 мкл экстрагированной гДНК добавляют к 20 мкл конечного объема реакции ПЦР. Реакция ПЦР также включает 1× HotMasterMix (5PRIME, Гейтерсберг, Мэриленд), 200 нМ V4_515f_adapt (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, IDT, Коралвилль, Айова), 200 нМ штрихкодированный 806rbc (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT_12bpGolayBarcode_AGTCAGTCAGCCGG ACTACHVGGGTWTCTAAT, IDT, Коралвилль, Айова) с водой для ПЦР (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) для уравнивания объема. Указанные праймеры включают штрихкодированные адаптеры для секвенирования синтезом от Illumina. Необязательно может проводиться две, три или четыре идентичных параллельных реакции. Как вариант, используют другие универсальные бактериальные праймеры или термостабильные полимеразы, известные специалистам в данной области техники, для получения других уровней погрешности при амплификации и секвенировании, а также результатов для альтернативных технологий секвенирования.

[0292] ПЦР-амплификацию выполняют на коммерчески доступных термоциклерах, таких как BioRad MyCycler™ (BioRad, Геркулес, Калифорния). Реакции проводят при 94°C в течение 3 минут с последующими 25 циклами при 94°C в течение 45 секунд, 50°C в течение 1 минуты, и 72°C в течение 1 минуты и 30 секунд, с последующим 10-минутным удлинением при 72°C и периодом неопределенной продолжительности при 4°C. После ПЦР проводят гель-электрофорез части реакционных продуктов для подтверждения успешной амплификации продукта размером ~1,5 кБ. Очищение продуктов ПЦР выполняют согласно описанию в предыдущем примере.

Секвенирование по Сэнгеру целевых ампликонов из чистых гомогенных образцов

[0293] Для детекции нуклеиновых кислот для каждого образца проводят две реакции секвенирования для получения прямого и обратного прочтения последовательности. Для полноразмерного 16S-секвенирования используют праймеры 27f и 1492r. 40 нг

очищенных ExoSap-IT продуктов ПЦР смешивают с 25 пмоль праймера для секвенирования и водой для молекулярной биологии от Mo Bio (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) с получением общего объема 15 мкл. Указанную реакционную смесь отправляют для проведения секвенирования по Сэнгеру в коммерческую организацию, такую как Genewiz (Саут-Плейнфилд, Нью-Джерси).

Массивное параллельное секвенирование целевых ампликонов из гетерогенных образцов

[0294] Количественное определение ДНК и конструирование библиотеки. Очищенные продукты ПЦР-амплификации количественно определяют с применением аналитического набора Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) в соответствии с инструкциями производителя. После количественного определения очищенные штрихкодированные продукты ПЦР комбинируют таким образом, что все отдельные продукты ПЦР присутствуют в эквимольных отношениях, для получения готовой библиотеки Illumina.

[0295] Детекция нуклеиновых кислот. Полученную библиотеку секвенируют на секвенаторах Illumina HiSeq или MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния), с определением кластеров, гибридизацией на матрице, изотермальной амплификацией, линеаризацией, блокированием, денатурацией и гибридизацией праймеров секвенирования в соответствии с инструкциями производителя. Для секвенирования используют 16SV4SeqFw (TATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA), 16SV4SeqRev (AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT) и 16SV4Index (ATTAGAWACCCBDGTAGTCCGGCTGACTGACT) (IDT, Коралвилль, Айова). Могут использоваться другие технологии секвенирования, например, но не ограничиваясь перечисленными, 454, Pacific Biosciences, Helicos, Ion Torrent и Nanopore, с применением протоколов, стандартных для специалиста в области геномного секвенирования.

Пример 12: Определение принадлежности прочтений секвенирования

[0296] Определение принадлежности первичных прочтений

[0297] Последовательности нуклеиновых кислот анализируют и определяют таксономическую принадлежность с использованием сходства последовательностей и методов филогенетической классификации, или комбинации указанных двух стратегий. Аналогичный подход может использоваться для присвоения наименований белкам, транскрипционным факторам и любых других схем классификации последовательностей нуклеиновых кислот. Способы на основе сходства последовательностей включают способы, известные специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, BLAST, BLASTx, tBLASTn, tBLASTx, RDP-классификатор, DNAClust и различные варианты реализации указанных алгоритмов, такие как Qiime или Mothur. Указанные способы основаны на картировании прочтений секвенирования на референсную базу данных и отборе совпадений с лучшим показателем и собственным значением. Стандартные базы данных включают, не ограничиваясь перечисленными, Human Microbiome Project, избыточную базу данных NCBI, Greengenes, RDP и Silva. Филогенетические способы могут использоваться в комбинации с методами на основе сходства последовательностей для улучшения точности прогнозирования принадлежности или таксономического определения. В настоящей работе древовидная топология и узловая структура используются для увеличения разрешающей способности анализа. При указанном подходе авторы анализируют последовательности нуклеиновых кислот с применением одного из многочисленных методов на основе сходства последовательностей и действенных филогенетических способов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь

перечисленными, филогенетической реконструкции методом максимального правдоподобия (см., например, Liu K, Under CR, and Warnow T. 2011. RAxML and FastTree: Comparing Two Methods for Large-Scale Maximum Likelihood Phylogeny Estimation. PLoS ONE 6: e27731. McGuire G, Denham MC, and Balding DJ. 2001. Models of sequence evolution for DNA sequences containing gaps. Mol. Biol. Evol 18: 481-490. Wrobel B. 2008. Statistical measures of uncertainty for branches in phylogenetic trees inferred from molecular sequences by using model-based methods. J. Appl. Genet. 49: 49-67.) Прочтения последовательностей располагают в референсной филогенетической системе, содержащей подходящие референсные последовательности. Определение принадлежности осуществляют на основании расположения прочтения на филогенетическом дереве. Определенность или значимость установленной принадлежности OTU определяют на основе сходства последовательностей OTU с референсной последовательностью нуклеиновых кислот, и близости последовательности OTU к одной или нескольким референсным последовательностям в филогенетической системе. Например, специфичность определения таксономической принадлежности определяют со степенью достоверности на уровне семейства, рода, вида или штамма, при этом степень достоверности основана на положении ветвей с бутстреп-поддержкой на референсном филогенетическом дереве относительно расположения последовательности исследуемой OTU.

[0298] Распределение клад

[0299] Возможность идентификации по 16S-V4 принадлежности OTU к конкретному виду зависит отчасти от разрешающей способности области 16S-V4 гена 16S для конкретного вида или группы видов. Как плотность доступных референсных последовательностей 16S для разных областей указанного дерева, так и природная вариабельность гена 16S у разных видов определяет точность таксономической классификации. С учетом топологической природы филогенетического дерева и того факта, что указанное дерево отражает иерархические взаимоотношения OTU, основанные на сходстве их последовательностей и базовой эволюционной модели, таксономическая классификация прочтения может быть распространена на более высокий уровень с применением основанной на кладах процедуры определения принадлежности (таблица 1). При применении указанного подхода клады определяют на основании топологии филогенетического дерева, сконструированного на основании полноразмерных последовательностей 16S с применением максимального правдоподобия или других филогенетических моделей, известных специалистам в области филогенетики. Кладу конструируют для подтверждения того, что все OTU в определенной кладе: (i) в пределах определенного числа узлов с бутстреп-поддержкой друг от друга (обычно, 1-5 значений бутстрепа), и (ii) отличаются не более чем на 5% в отношении генетического сходства OTU, принадлежащие одной кладе, можно определить как генетически и филогенетически отличные от OTU другой клады на основании данных секвенирования 16S-V4. OTU, попадающие в одну кладу, являются эволюционно близкородственными и могут быть отличимы или неотличимы друг от друга при применении данных секвенирования 16S-V4. Мощност основанного на кладах анализа заключается в том, что представители одной клады, благодаря эволюционному родству, предположительно играют аналогичные функциональные роли в экогруппе микроорганизмов, например, обнаруживаемых в кишечнике человека. Композиции, где одни виды замещены другими из той же клады, предположительно сохраняют консервативную экологическую функцию и, соответственно, подходят для применения в настоящем изобретении.

[0300] Примечательно, что последовательности 16S из изолятов определенных OTU

филогенетически располагаются в соответствующих кладах, что иногда противоречит определению до вида и рода на основе микробиологических методов, которое может предшествовать определению на основе 16S. Расхождения между таксономическим определением на основании микробиологических характеристик относительно

5 определения на основе генетического секвенирования известны из литературы.

Пример 13: Проращивание спор

[0301] Проращивание споровой фракции увеличивает число жизнеспособных спор, которые растут на разных типах сред. Для проращивания популяции спор образец перемещают в анаэробную камеру, ресуспендируют в предварительно восстановленном

10 ФСБ, перемешивают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C для обеспечения прорастания. Способствующие прорастанию вещества могут включать аминокислоты (например, аланин, глицин), сахара (например, фруктоза), нуклеозиды (например, инозин), соли желчных кислот (например, холат и таурохолат), катионы металлов (например, Mg²⁺, Ca²⁺), жирные кислоты и длинноцепочечные алкиламины (например,

15 додециламин, «Germination of bacterial spores with alkyl primary amines» J. Bacteriology, 1961). Указанные смеси или более сложные природные смеси, такие как сок рубца или бычья желчь, могут использоваться для индуцирования прорастания. Бычья желчь представляет собой дегидратированную бычью желчь, состоящую из жирных кислот, желчные кислоты, неорганические соли, сульфаты, желчные пигменты, холестерин,

20 муцин, лецитин, глюкуроновые кислоты, порфирины и мочевины. Прорастание может также осуществляться в ростовой среде, такой как предварительно восстановленная среда BHIS с бычьей желчью для прорастания, в которой за счет BHIS (порошок сердечно-мозгового бульона (37 г/л), дрожжевого экстракта (5 г/л), L-цистеина HCl (1 г/л)) обеспечиваются пептиды, аминокислоты, неорганические ионы и сахара в

25 комплексных смесях ВНІ и дрожжевых экстрактах, а бычья желчь обеспечивает дополнительные способствующие прорастанию желчные кислоты.

[0302] Кроме того, для проращивания спор может применяться давление. Выбор способствующих прорастанию веществ могут варьировать в зависимости от требуемого микроорганизма. Для разных видов требуются разные способствующие прорастанию

30 вещества; и разные способствующие прорастанию вещества могут требоваться для оптимального прорастания разных изолятов одного и того же вида. Наконец, важно разводить смесь до посева, поскольку некоторые способствующие прорастанию вещества ингибируют рост микроорганизмов в вегетативном состоянии. Например, было показано, что алкиламины должны быть нейтрализованы анионными липофилами

35 для стимуляции оптимального роста. Желчные кислоты могут также ингибировать рост некоторых организмов, несмотря на то, что они способствуют их прорастанию, и их необходимо разводить перед посевом для получения жизнеспособных клеток.

[0303] Например, раствор BHIS/бычьей желчи используют в качестве способствующего прорастанию вещества; он содержит 0,5X среды BHIS с 0,25% бычьей

40 желчи (дегидратированной бычьей желчи), где 1x среда BHIS содержит на литр раствора следующее: 6 г сердечно-мозгового бульона из сухого вещества, 7 г пептического гидролизата животной ткани, 14,5 г панкреатического гидролизата казеина, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г хлорида натрия, 2 г глюкозы, 2,5 г динатрия фосфата и 1 г цистеина. Кроме того, Ca-ДПК представляет собой способствующее прорастанию

45 вещество и содержит 40 mM CaCl₂ и 40 mM дипиколиновой кислоты (ДПК). Сок рубца (Bar Diamond, Inc.) также представляет собой способствующее прорастанию вещество. Искусственный желудочный сок (Ricca Chemical) представляет собой способствующее прорастанию вещество и состоит из 0,2% (масса/объем) хлорида натрия в 0,7% (об/об)

соляной кислоты. Муциновая среда представляет собой способствующее прорастанию вещество, и ее получают путем добавления следующих компонентов к 1 л дистиллированной стерильной воды: 0,4 г KH_2PO_4 , 0,53 г Na_2HPO_4 , 0,3 г NH_4Cl , 0,3 г NaCl , 0,1 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,11 г CaCl_2 , 1 мл раствора щелочных микроэлементов, 1 мл раствора кислых микроэлементов, 1 мл витаминного раствора, 0,5 мг резазурина, 4 г NaHCO_3 , 0,25 г $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$. Растворы микроэлементов и витаминов получали согласно существующему описанию (Stams et al., 1993). Все компоненты автоклавировали, за исключением витаминов, которые стерилизовали фильтрацией. К базовой среде добавляли 0,7% (об/об) осветленного стерильного сока рубца и 0,25% (об/об) коммерческого свиного желудочного муцина (тип III; Sigma), очищенного осаждением в этаноле согласно существующему описанию (Miller & Hoskins, 1981). Указанная среда в настоящем документе называется муциновой средой.

[0304] Фетальная бычья сыворотка (Gibco) может использоваться в качестве способствующего прорастанию вещества, и содержит 5% термоинактивированной ФБС, в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ, Fisher Scientific), содержащем 0,137М хлорида натрия, 0,0027М хлорида натрия, 0,0119М фосфатного буфера. Тиогликолят представляет собой способствующее прорастанию вещество согласно существующему описанию (Kamiya et al Journal of Medical Microbiology 1989) и содержит 0,25М (рН10) тиогликолята натрия. Раствор додециламина, содержащий 1 мМ додециламин в ФСБ, представляет собой способствующее прорастанию вещество. Раствор сахара может использоваться в качестве способствующего прорастанию вещества и содержит 0,2% фруктозы, 0,2% глюкозы и 0,2% маннита. Раствор аминокислот может также применяться в качестве способствующего прорастанию вещества; он содержит 5 мМ аланин, 1 мМ аргинин, 1 мМ гистидин, 1 мМ лизин, 1 мМ пролин, 1 мМ аспарагин, 1 мМ аспарагиновой кислоты, 1 мМ фенилаланин. Способствующая прорастанию смесь, называемая здесь Germix 3, может представлять собой способствующее прорастанию вещество; она содержит 5 мМ аланин, 1 мМ аргинин, 1 мМ гистидин, 1 мМ лизин, 1 мМ пролин, 1 мМ аспарагин, 1 мМ аспарагиновой кислоты, 1 мМ фенилаланин, 0,2% таурохолата, 0,2% фруктозы, 0,2% маннита, 0,2% глюкозы, 1 мМ инозин, 2,5 мМ Са-ДПК и 5 мМ KCl. Среда BHIS+ДПК представляет собой способствующую прорастанию смесь и содержит среду BHIS и 2 мМ Са-ДПК. Супернатант отработанной среды от *Escherichia coli*, называемый здесь EcSN, представляет собой способствующее прорастанию вещество; его получают путем культивирования *E. coli* MG1655 на среде SweetB/Fos с инулином в анаэробных условиях в течение 48 часов, осаждения клеток центрифугированием при 20000 ОСЦ в течение 20 минут, сбора супернатанта и нагревания до 60°C на протяжении 40 минут. Наконец, указанный раствор стерилизуют фильтрацией и используют в качестве способствующего прорастанию раствора.

Пример 14: Выбор сред для роста

[0305] Важно подобрать подходящие среды для поддержания роста, в том числе предпочтительные источники углерода. Например, некоторые организмы предпочитают сложные сахара, такие как целлобиоза, простым сахарам. Примеры сред, используемых для выделения спорующих организмов включают EYA, BNI, BHIS и GAM (см. ниже полные названия и ссылки). Ряд разведений высевает для подтверждения того, что на некоторых планшетах образуются хорошо изолированные колонии для анализа, или как вариант, с планшетов с плотными колониями может быть взят соскоб и суспендирован в ФСБ для получения смешанного разнообразного сообщества.

[0306] Планшеты инкубируют в анаэробных условиях или в аэробных условиях при 37°C в течение 48-72 или более часов, при ориентации на анаэробные или аэробные спорообразующие бактерии, соответственно.

[0307] Твердые среды для планшетов включают:

- 5 - Анаэробную среду Гифу (GAM, Nissui) без декстрозы с добавлением фруктоолигосахаридов/инулина (0,4%), маннита (0,4%), инулина (0,4%), или фруктозы (0,4%), или их комбинации.
 - Модифицированную Sweet GAM [Анаэробная среда Гифу (GAM, Nissui)], с добавлением глюкозы, целлобиозы, мальтозы, L-арабинозы, фруктозы,
 - 10 фруктоолигосахаридов/инулина, маннита и лактата натрия)
 - Кровяной агар для Brucella (BBA, Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010)
 - ФЭА-среду с овечьей кровью (Anaerobe Systems; 5% агар с овечьей кровью с фенилэтиловым спиртом)
 - 15 - Яично-желточный агар (EYA) (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010)
 - Сульфитный молочный агар с полимиксином (Mevissen-Verhage et al., J. Clin. Microbiol. 25:285-289(1987))
 - Муциновый агар (Derrien et al., IJSEM 54: 1469-1476 (2004))
 - 20 - Полигалактуронатный агар (Jensen & Canale-Parola, Appl. Environ. Microbiol. 52:880-997 (1986))
 - M2GSC (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010)
 - Агар M2 (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010) с добавлением крахмала (1%), маннита (0,4%), лактата (1,5 г/л) или лактозы (0,4%)
 - 25 - Sweet B - Сердечно-мозговой агар (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010) с добавлением дрожжевого экстракта (0,5%), гемина, цистеина (0,1%), мальтозы (0,1%), целлобиозы (0,1%), растворимого крахмала (Sigma, 1%), морфолинпропансульфоновая кислота (MOPS) (50 мМ, pH 7).
 - ПДА с салицином (пептонно-дрожжевой агар с добавлением салицина) (Atlas,
 - 30 Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010).
 - Модифицированный сердечно-мозговой бульон (М-ВНІ) [[сладкий и кислый]] содержит на литр: 37,5 г порошка сердечно-мозгового бульона (Remel), 5 г дрожжевого экстракта, 2,2 г мясного экстракта, 1,2 г экстракта печени, 1 г цистеина HCl, 0,3 г гиогликолята натрия, 10 мг гемина, 2 г растворимого крахмала, 2 г ФОС/инулина, 1 г
 - 35 целлобиозы, 1 г L-арабинозы, 1 г маннита, 1 Na-лактата, 1 мл Tween 80, 0,6 г MgSO₄×7H₂O, 0,6 г CaCl₂, 6 г (NH₄)₂SO₄, 3 г KH₂PO₄, 0,5 г K₂HPO₄, 33 мМ уксусную кислоту, 9 мМ пропионовую кислоту, 1 мМ изомасляную кислоту, 1 мМ изовалериановую кислоту, 15 г агара, и после автоклавирования добавляют 50 мл 8% раствора NaHCO₃ и 50 мл 1М MOPS-KOH (pH 7).
 - 40 - Агар для Eubacterium по Noack-Blaut (см. Noack et al. J. Nutr. (1998) 128:1385-1391)
 - Агар BHIS az1/ge2 - BHIS az/ge (Reeves et. al. Infect. Immun. 80:3786-3794 (2012))
 - [Сердечно-мозговой агар (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010) с добавлением дрожжевого экстракта 0,5%, цистеина 0,1%, 0,1% целлобиозы, 0,1% инулина, 0,1% мальтозы, азтреонама 1 мг/л, гентамицина 2 мг/л]
 - 45 - BHIS CInM az1/ge2 - BHIS CInM [Сердечно-мозговой агар (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010) с добавлением дрожжевого экстракта 0,5%, цистеина 0,1%, 0,1% целлобиозы, 0,1% инулина, 0,1% мальтозы, азтреонама 1 мг/л, гентамицина 2 мг/л]

Пример 15: Очищение и выделение спорообразующей фракции из экскрементов

[0308] Для очищения и избирательного выделения эффективных спор из фекального материала донорский материал сначала смешивают с солевым раствором с применением устройства гомогенизации (например, лабораторного блендера) для получения 20% суспензии (масса/объем). Добавляют 100% этанол в качестве инактивирующей обработки, продолжающейся от 10 секунд до 1 часа. Конечная концентрация спирта может варьировать от 30-90%, предпочтительно 50-70%. Выполняют высокоскоростное центрифугирование (3200 ОСЦ в течение 10 мин) для удаления растворителя; осадок сохраняют и промывают. Затем, после того как промытый осадок ресуспендирован, проводят этап центрифугирования на низкой скорости (200 ОСЦ в течение 4 мин) для удаления растительных частиц большого размера, и сохраняют супернатант, содержащий споры. Выполняют высокоскоростное центрифугирование (3200 ОСЦ в течение 10 мин) супернатанта для концентрирования спорового материала. Затем промывают и ресуспендируют осадок для получения 20% суспензии. Указанная суспензия представляет собой обработанный этанолом состав со спорами. Концентрированную суспензию отделяют в градиенте плотности, например, в градиенте CsCl, сахаразы или с использованием их комбинации, с получением обработанного этанолом очищенного в градиенте состава со спорами. Например, очищение в градиенте CsCl проводят, загружая 20% объема суспензии спор сверху на 80% объема последовательного градиента CsCl (масса/объем), содержащего уровни 64%, 50%, 40% CsCl (масса/объем), и центрифугуя в течение 20 минут на 3200 ОСЦ. Затем споровую фракцию пропускают через градиент сахаразы с уровнями 67%, 50%, 40% и 30% (масса/объем). При центрифугировании в качающемся бакет-роторе в течение 10 мин при 3200 ОСЦ. Споры остаются в основном в 30% и 40% фракциях сахаразы. Нижнюю споровую фракцию (фиг. 2) извлекали и промывали с получением концентрированного обработанного этанолом очищенного в градиенте состава со спорами. Используя светоотражающие свойства спор, наблюдаемые при применении фазово-контрастной микроскопии (споры яркие и отражают свет, в то же время проросшие споры и вегетативные клетки выглядят темными), можно наблюдать обогащение споровой фракцией бактериальных клеток из суспензии фекалий (фиг. 3, слева) по сравнению с обработанным этанолом очищенном в градиенте CsCl составом со спорами (фиг. 3, в центре) и обработанным этанолом очищенном в градиенте CsCl и в градиенте сахаразы составом со спорами (фиг. 3, справа).

[0309] Кроме того, рост спор после обработки способствующим прорастанию веществом может также использоваться для количественного определения жизнеспособной популяции спор. Вкратце, образцы инкубировали со способствующим прорастанию веществом (бычья желчь, 0,5%, до 1 часа), разводили и высевали в анаэробных условиях на ВВА (кровяной агар для *Brucella*) или аналогичную среду (см., например, примеры 4 и 5). Точечно отбирали индивидуальные колонии и выделяли ДНК для полноразмерного 16S-секвенирования для идентификации видового состава (см., например, примеры 2 и 3). Анализ показал, что всего присутствовало 22 вида (таблица 2), большинство из которых присутствует и в материале, очищенном с применением градиента, так и в материале, очищенном без применения градиента, что указывает на отсутствие сдвига или на присутствие незначительного сдвига экогруппы в результате очищения в градиенте. Подсчет выхода спор демонстрирует эффективное выделение 38% спор исходного фекального материала, как показывает прорастание и посев спор на ВВА или измерение уровня ДПК в образце.

Пример 16: Бактериальные композиции предотвращают инфекцию *C. difficile* в модели

на мышах

[0310] Для тестирования терапевтического потенциала бактериальных композиций использовали модель на мышах профилактики инфекции *C. difficile* (модель на основе Chen, et al., A mouse model of Clostridium difficile associated disease, Gastroenterology 135(6): 1984-1992). Две клетки, каждая с пятью мышами, использовали для тестирования для каждой группы эксперимента. Все мыши получали коктейль антибиотиков, состоящий из 10% глюкозы, канамицина (0,5 мг/мл), гентамицина (0,044 мг/мл), колистина (1062,5 ед/мл), метронидазола (0,269 мг/мл), ципрофлоксацина (0,156 мг/мл), ампициллина (0,1 мг/мл) и ванкомицина (0,056 мг/мл) в питьевой воде с -14 по -5 день включительно, и дозу 10 мг/кг клиндамицина через оральный зонд на -3 день. На -1 день они получали либо тестируемый состав, либо контроль-носитель через оральный зонд. На 0 день их стимулировали введением приблизительно $4,5 \log_{10}$ КОЕ *C. difficile* (ATCC 43255) через оральный зонд. Необязательно группа положительного контроля получала ванкомицин с -1 по 3 день помимо антибиотика и описанной выше стимуляции *C. difficile*.

Экскременты собирали из клеток для анализа носительства бактерий, смертность оценивали каждый день с 0 по 6 день, и оценивали массу тела и последующее изменение массы тела у животного, при этом снижение массы тела считали связанным с инфекцией *C. difficile*. Смертность и уменьшение снижения массы тела при применении тестируемого состава по сравнению с основой использовали для оценки успешности применения тестируемого состава. Кроме того, проводили оценку симптомов *C. difficile* ежедневно, с -1 по 6 день включительно. Клинический показатель присваивали по шкале от 0 до 4, комбинируя показатели внешнего вида (0-2 пункта на основании нормального внешнего вида, сгорбленности, пилоэрекции или летаргического состояния) и клинические признаки (0-2 пункта на основании нормального внешнего вида, мокрого хвоста, пониженной на ощупь температуры или изоляции от других животных).

[0311] В нестимулированной контрольной группе животных стимулировали *C. difficile*. В группе положительного контроля с ванкомицином животные получали дозу *C. difficile* и лечение ванкомицином с -1 по 3 день включительно. Отрицательный контроль получал через зонд только ФСБ без бактерий. В экспериментальных группах тестировали разведения $1 \times$, $0,1 \times$, $0,01 \times$ происходящие из состава с обработанными этанолом спорами от одного донора (см., например, пример 6) или термообработанные экскременты, полученные путем нагревания 20% суспензии в течение 30 минут при 80°C. Дозы для подсчитанных КОЕ определяли по конечным обработанным этанолом спорам; вводили разведения от общего числа спор, дозы $1 \times$, $0,1 \times$, $0,01 \times$ споровой смеси для обработанной этанолом фракции, и дозу $1 \times$ для термообработанной фракции.

[0312] Снижение массы тела и смертность оценивали на 3 день. У отрицательного контроля, получавшего только *C. difficile*, наблюдалась 20% смертность и снижение массы тела на 3 день, тогда как у положительного контроля, получавшего 10% суспензию фекалий человека, не наблюдалось смертей или снижения массы тела на 3 день (Таблица 3). Обработанные EtOH экскременты предотвращают смертность и снижение массы тела в трех разведениях, а термообработанная фракция оказывала защитный эффект в единственной протестированной дозировке. Эти данные указывают на то, что споровая фракция эффективна для предотвращения инфекции *C. difficile* у мышей.

Пример 17: Модель профилактики и предотвращения рецидивов на хомяках

[0313] Предыдущие исследования на хомяках с применением токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. difficile* показали, что модель на хомяках подходит для изучения рецидивов после лечения антибиотиками и эффектов профилактического

лечения флорой слепой кишки при инфекции *C. difficile* (Wilson et al. 1981, Wilson et al. 1983, Borriello et al. 1985) и, в более широком смысле, инфекционной болезни желудочно-кишечного тракта. Для демонстрации профилактического применения тестируемого

5 В профилактической модели клиндамицин (10 мг/кг п/к) вводят на -5 день, тестируемый состав или контроль вводят на -3 день, а стимуляция *C. difficile* происходит на 0 день. В группе положительного контроля затем вводили ванкомицин на 1-5 день (а контроль-носитель вводили на -3 день). Экскременты собирают на -5, -4, -1, 1, 3, 5, 7, 9 день и оценивают носительство и снижение уровня патогена в образцах фекалий с помощью
10 микробиологических методов, 16S-секвенирования или других способов, используемых специалистами в данной области техники. Смертность оценивают на протяжении эксперимента в течение 21 дня после стимуляции *C. difficile*. Кривые процента выживаемости показывают, что обработанные этанолом споры и обработанные этанолом очищенные в градиенте споры оказывают лучший защитный эффект на
15 хомяков по сравнению с ванкомициновым контролем и контролем-носителем.

[0314] См. фиг. 4: Профилактическая модель с обработанным этанолом составом со спорами и обработанным этанолом очищенным в градиенте составом со спорами.

[0315] В модели предотвращения рецидива хомяков стимулируют токсигенными штаммами *C. difficile* на 0 день, вводят клиндамицин через оральный зонд на 1 день и
20 дозируют ванкомицином на 2-6 день. Затем вводят экспериментальное или контрольное лечение на 7, 8 и 9 день. Состав хомяков для каждой группы включал 8 хомяков на группу. Фекальный материал собирают на -1, 1, 3, 5, 7, 10 и 13 день и оценивают смертность у хомяков на протяжении всего эксперимента. Кривые выживаемости используют для оценки успешности применения тестируемого состава, например,
25 обработанных этанолом спор, или обработанных этанолом очищенных в градиенте спор относительно контрольного лечения для предотвращения смертности у хомяков. Кривые выживаемости демонстрируют максимальную эффективность обработанных этанолом очищенных в градиенте спор, затем идут обработанные этанолом споры. Оба варианта лечения увеличивали процент выживаемости по сравнению с лечением
30 только ванкомицином

[0316] См. фиг. 5: Модель предотвращения рецидива с обработанными этанолом спорами и обработанными этанолом очищенными в градиенте спорами

Пример 18: Клиническое лечение рецидивирующей *C. difficile* у пациентов

[0317] Для оценки эффективности тестируемого состава (например, обработанных
35 этанолом составов со спорами, см. пример 15) для лечения рецидивирующей *C. difficile* у пациентов-людей выполняли следующую процедуру: брали экскременты от здорового донора, инактивировали с применением описанного ниже протокола обработки этанолом состава со спорами, и лечили рецидивирующую *C. difficile* у пациентов, имеющих такие показания. Проводили скрининг общего анамнеза не являющихся
40 родственниками доноров на отсутствие хронических медицинских состояний (в том числе воспалительного заболевания кишечника; синдрома раздраженного кишечника; целиакии; или любых злокачественных новообразований ЖКТ или полипоза в анамнезе), отсутствие факторов риска в отношении передаваемых инфекций, отсутствие использования антибиотиков в течение предшествующих 6 месяцев, и отрицательные
45 результаты лабораторных анализов на передаваемые с кровью патогены (ВИЧ, ТЛВЧ, ВГС, ВГВ, ЦМВ, ВГА и *Treponema pallidum*) и фекальные бактериальные патогены (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *E. coli* 0157), яйца паразитов и паразиты, и другие инфекционные агенты (*Giardia*, *Cryptosporidium* *Cyclospora*, *Isospora*) до сдачи

стула.

[0318] Экскременты донора быстро замораживали после получения и готовили образцы для тестирования. Для использования приблизительно 75 г экскрементов донора размораживали и ресуспендировали в 500 мл небактериостатического нормального солевого раствора и перемешивали в одноразовом стеклянном или 5 пластиковом блендере. Полученную суспензию последовательно проводили через стерильные одноразовые сита, устраняющие частицы размером 600, 300 и 200 микрон. Затем суспензию непродолжительно центрифугировали (200 ОСЦ в течение 4 мин) для разделения волокнистого материала и частиц, и супернатант (содержащий 10 бактериальные клетки и споры) переносили в новый контейнер. Этанол добавляли до конечной концентрации 50% и полученную ~1500 мл суспензию инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 часа при непрерывном перемешивании для инактивации вегетативных бактериальных клеток. В середине инактивации суспензию переносили в новый сосуд для подтверждения полного контакта с этанолом. Твердое 15 вещество осаждали центрифугированием и троекратно промывали нормальным солевым раствором для удаления остаточного этанола. Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме 100% стерильного глицерина чистоты USP и наполняли приблизительно 30 капсул для отсроченного высвобождения размера 0 (гипромеллозные капсулы DRcaps, Capsugel, Inc.), по 0,65 мл суспензии в каждую капсулу. Капсулы 20 немедленно закрывали и помещали на замораживающий алюминиевый блок с сухим льдом при температуре -80°C для замораживания. Замороженные капсулы, в свою очередь, заключали в капсулы DRcaps размера 00 для повышения стабильности капсул, наносили метки и немедленно помещали на хранение при температуре <-65°C. Конечный продукт хранили при <-65°C до дня и момента использования. Инкапсулированный 25 продукт может храниться неопределенно долго при <-65°C. В день дозирования капсулы нагревали на водном льду в течение 1-2 часов для улучшения переносимости, и затем вводили с водой ad libitum.

[0319] Пациент 1 представляет собой женщину возрастом 45 лет с инфекцией *C. difficile* и диареей в анамнезе по меньшей мере за 1 год до лечения. Ранее она получала 30 лечение несколькими курсами антибиотиков, после которых каждый раз возникал рецидив связанной с *C. difficile* диареи.

[0320] Пациент 2 представляет собой женщину в возрасте 81 года, страдавшую рецидивирующей инфекцией *C. difficile* на протяжении 6 месяцев до лечения, несмотря на адекватную терапию антибиотиками после каждого рецидива.

35 [0321] За 24 часа до начала перорального лечения терапию антибиотиками против CDAD прекращали. У каждого пациента проводили подготовку толстой кишки с целью уменьшить конкурентную микробную нагрузку в желудочно-кишечном тракте и облегчить восстановление популяции спорообразующими организмами в исследуемом 40 продукте.

[0322] Утром первого дня лечения пациенты получали дозу в виде капсул с отсроченным высвобождением, содержащих исследуемый продукт, с водой ad libitum. Пациентов просили воздержаться от приема пищи в течение 1 часа после приема. На 45 следующий день пациент возвращался в клинику для получения дополнительной дозы. Пациентов просили воздержаться от приема пищи в течение 4 часов до получения второй дозы и в течение 1 часа после дозирования.

[0323] Проводилось тщательное наблюдение за обеими пациентками для обнаружения признаков рецидива или нежелательных симптомов после лечения. Пациенткам звонили по телефону на 2 день, 4 день и через 1, 2 и 4 недели, и каждую пациентку опрашивали

относительно общего состояния и состояния CDAD и связанных симптомов. Образцы стула собирали в исходный момент и через 1, 2, 4 и 8 недель после лечения для оценки изменений в микробиоте кишечника путем 16S-секвенирования и подсчета спор с помощью описанных ранее способов (см., например, примеры 11 и 12). На протяжении 4 недель после лечения у каждой пациентки наблюдалось постепенное улучшение без признаков рецидива *C. difficile*.

[0324] Шестеро других пациентов с рецидивирующей связанной с *C. difficile* диарей получали аналогичное лечение, рецидивы CDI отсутствовали и не требовалось возобновление применения антибиотиков (всего 8 пациентов). Кроме того, отсутствовали связанные с лечением серьезные нежелательные явления.

Пример 19: обработка суспензии фекалий этанолом или термообработка значительно уменьшает число вегетативных клеток и приводит к обогащению спорообразующими видами

[0325] Обработка образца, предпочтительно образца фекалий человека, для инактивации или гибели по существу всех вегетативных форм бактерий, присутствующих в указанном образце, приводит к отбору и обогащению по споровой фракции. Способы инактивации могут включать нагревание, сонификацию (обработку ультразвуком), лизирование детергентами, ферментативное расщепление (например, лизоцимом и/или протеиназой К), обработку этанолом или кислотой, воздействие растворителями (тетрагидрофураном, 1-бутанолом, 2-бутанолом, 1,2 пропандиолом, 1,3 пропандиолом, бутаноатом, пропаноатом, хлороформом, простым диметилэфиром и детергентом наподобие Тритона X-100, простым диэтилэфиром), или комбинацию указанных способов. Чтобы показать эффективность индуцированной этанолом инактивации вегетативных клеток, 10% суспензию фекалий смешивали с абсолютным этанолом в соотношении 1:1 и перемешивали на вортексе в течение 1 минуты. Суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, 1 ч, 4 ч или 24 ч. После инкубирования суспензию центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут для осаждения спор. Супернатант утилизируют, а осадок ресуспендируют в равном объеме ФСБ. Жизнеспособные клетки подсчитывали согласно приведенному ниже описанию.

[0326] Чтобы показать эффективность термообработки для инактивации вегетативных клеток, 10-20% суспензию фекалий инкубировали при 70°C, 80°C, 90°C или 100°C в течение 10 мин или 1 часа.

[0327] После обработки этанолом или термообработки оставшиеся жизнеспособные клетки подсчитывали после 24 часов инкубирования на планшетах путем определения зависимости титра бактерий на кровяном агаре для *Brucella* (BBA) от обработки и времени (см. фиг. 6). Обработка этанолом в течение 1 часа и 25 часов оказывала аналогичный эффект, уменьшая число жизнеспособных клеток приблизительно на 4 log, тогда как повышение температуры и времени воздействия высокими температурами приводит к большему уменьшению числа жизнеспособных клеток, при отсутствии детектируемых колоний при воздействии 100°C на протяжении либо 10 минут, либо 1 часа. В данном эксперименте не использовались способствующие прорастанию вещества. Через несколько дней дополнительного культивирования на планшетах несколько колоний отбирали точечным методом из обработанных образцов и идентифицировали посредством анализа 16S рРНК (см., например, примеры 11 и 12). Они включали известные спорообразующие *Clostridium* spp. а также виды, ранее не описанные как спорообразующие бактерии, в том числе *Ruminococcus bromii* и *Anaerotruncus colihominis* (Lawson, et al 2004), и *Eubacterium* sp. (таблица 4). См. фиг. 6: Термообработка и обработка этанолом уменьшают жизнеспособность клеток

[0328] Чтобы показать, что число вегетативных клеток значительно уменьшается при обработке этанолом, известные неспорообразующие бактерии обрабатывает этанолом согласно приведенному описанию (см., например, пример 15) и определяли жизнеспособность путем посева на ВВА в анаэробных условиях (см., например, пример 14). Фекальный материал от четырех независимых доноров подвергали действию температуры 60°C в течение 5 минут, а затем высевали на три типа селективных сред либо в аэробных (+O₂), либо в анаэробных условиях (-O₂) (ВВА + аэробная среда, Мак-Конки с лактозой + аэробная среда, среда для *Bacteroides* с желчными кислотами и эскулином + анаэробная среда) для идентификации известных неспорообразующих *Enterobacteria* (выживающих на агаре Мак-Конки) и бактерий группы *Bacteroides fragilis* (выживающих на чашках с агаром для *Bacteroides* с желчными кислотами и эскулином). Предел детекции данных анализов составляет приблизительно 20 КОЕ/мл.

Способствующие прорастанию вещества не использовались в данном эксперименте (фиг. 7). И обработка этанолом, и термоактивации значительно снижают жизнеспособность клеток из фекального материала до порога детекции при применении лактозного агара Мак-Конки и агара ВВЕ. Оставшиеся клетки, идентифицированные на среде ВВА при культивировании в анаэробных условиях, содержат независимые от способствующих прорастанию веществ спорообразующие виды. См. фиг. 7: Уменьшение количества неспорообразующих вегетативных клеток при обработке температурой 60°C в течение 5 минут

[0329] Кроме того, при обработке этанолом, как было показано, быстро гибнут как аэробные, так и неспорообразующие анаэробные колониеобразующие единицы в 10% суспензии фекалий, как было определено путем посева на богатую среду (ВВА).

Уменьшение количества высеваемых КОЕ составляет 4 порядка величины за секунды, как показано на фиг. 8.

[0330] См. фиг. 8: Видно, что с течением времени обработка этанолом уменьшает число КОЕ как анаэробных, так и аэробных бактерий

Пример 20: Виды, идентифицированные и выделенные как спорообразующие бактерии при обработке этанолом

[0331] Чтобы показать, что при применении способов термообработки или обработки этанолом происходит обогащение спорообразующими видами, проводили сравнение >7000 изолятов колоний с повторностями для идентификации видов (например, идентифицировали независимым образом в нескольких составах, см. примеры 1, 2 и 3), выделенных только из суспензии фекалий, обработанной 50% этанолом или термообработанной, и не выделенных из необработанной суспензии фекалий (таблица 5). Эти данные указывают на возможность отбора спорообразующих видов из фекального материала, и идентифицируют как спорообразующие бактерии организмы, ранее не описанные как спорообразующие в литературе. В каждом случае организмы отбирали точечным методом в виде изолированных колоний, культивировали в анаэробных условиях, а затем проводили полноразмерное 16S-секвенирование для идентификации видов.

[0332] Для дальнейшей идентификации спорообразующих бактерий обработанные этанолом образцы фекалий от доноров А, В, С, D, Е и F высевали на разнообразные типы твердых сред, одиночные колонии собирали точечным методом и культивировали в бульоне в формате 96-луночных планшетов (таблицы 6-11). Затем амплифицировали посредством ПЦР ген 16S рРНК и выполняли прямое циклическое секвенирование (см. примеры 11 и 12). Идентификация основана на прямых прочтениях, полученных при прямом циклическом секвенировании гена 16S рРНК.

[0333] У разных индивидуумов наблюдается неожиданная гетерогенность микробиомов (Clemente et al., 2012), что оказывает влияние на определение потенциальной эффективности различных доноров для получения подходящих споровых композиций. Описанный ниже способ подходит для скрининга доноров, в тех случаях, когда, например, целесообразно или необходимо получение конкретного количества или разнообразия спорообразующих организмов для репопуляции микробиома после лечения антибиотиками или лечения конкретного заболевания или состояния. Кроме того, такой скрининг целесообразен в случаях, когда существует потребность в проведении скрининга доноров с целью выделения микроорганизмов, способных к спорообразованию, или в случаях, когда требуется получить очищенный состав спорообразующих организмов от конкретного донора.

[0334] Общее число спор также представляет собой меру активности конкретного донорского материала или очищенного состава со спорами, и критически важен для определения качества материала, необходимого для обеспечения требуемого уровня дозы. Для исследования вариабельности общего числа спор донорские образцы получали и обрабатывали согласно описанию в предыдущих примерах. Затем определяли число спор в материалах донора в КОЕ/г путем культивирования на чашках со средой в различных титрах для определения содержания спор в донорском материале. Кроме того, для оценки содержания спор использовали анализ ДПК (обозначено как «споровый эквивалент») согласно описанию в примере 21. Как видно на фиг. 9, у индивидуальных доноров в течение времени наблюдается различие, составляющее 2log, а между разными донорами возможны отличия, составляющие до 3log. Одной из возможных причин различий в содержании спор является то, что нежизнеспособные споры и неспособные к прорастанию споры не выявляются при посеве, однако содержат достаточно ДПК для измерения. Другая возможность заключается в том, что из-за межвидовой вариабельности содержания ДПК в спорах некоторые сложные смеси содержат богатые ДПК споры, тогда как другие смеси содержат бедные ДПК споры. Отбор доноров, обеспечивающих высокое число спор, важен для определения продуктивности выделения спор из образцов донорских фекалий путем идентификации предпочтительных доноров.

[0335] См. фиг. 9: Концентрация спор в донорском материале от клинических доноров

[0336] Свежий образец фекалий от донора F обрабатывали согласно описанию в примере 15 для получения обработанной этанолом споровой фракции, проращивали обработкой BHIS с бычьей желчью в течение 1 ч согласно описанию (см., например, Пример 13), а затем высевали на разнообразные среды (см., например, пример 14).

Колонии высевали точечным методом, следя за тем, чтобы несколько колоний каждого морфологически отличного типа попало в каждую чашку для захвата максимально возможного разнообразия. Колонии подсчитывают на чашках с каждым типом среды с хорошо изолированными колониями для подсчета числа колониеобразующих единиц на мл (таблица 12). Колонии высевали точечным методом на одну из нескольких жидких сред, определяли 16S рРНК последовательности (см., например, примеры 11 и 12) и анализировали согласно описанию выше. Число уникальных OTU для каждого типа среды приведено внизу, первыми указаны среды с наибольшим числом уникальных OTU (таблица 12). Комбинации 3-5 первых 5 типов сред обеспечивают разнообразие, а некоторые другие могут быть выбраны для нацеливания на конкретные представляющие интерес виды. Колониеобразующие единицы могут быть подсчитаны для определенного вида с использованием данных 16S, и указанные значения могут использоваться для определения того, представлен ли на достаточной уровне определенный организм. Совокупность спор от донора F согласно определению в

данном эксперименте включает указанные 52 вида согласно данным 16S-секвенирования (таблица 12).

[0337] Для скрининга доноров-людей на присутствие разнообразия спорообразующих бактерий и/или на специфические спорообразующие бактерии, образцы фекалий
5 подготавливали с применением способствующих прорастанию веществ и селективных методов культивирования, собирали колонии точечным методом (см., например, примеры 13 и 14) и анализировали разнообразие 16S согласно приведенному описанию (см. примеры 11 и 12). Оценка разнообразия у донора может включать подсчет КОЕ/
10 мл устойчивых к этанолу клеток на среде определенного типа, или КОЕ/мл определенного вида, с применением анализа 16S полученных на указанной среде точечным методом колоний для определения уровня спор определенного представляющего интерес вида. Указанный тип основанного на культивировании анализа может быть дополнен независимыми от культивирования способами, такими как кПЦР с зондами, специфическими в отношении видов или родов, представляющих
15 интерес, или метагеномное секвенирование составов со спорами, или 16S-профилирование составов со спорами с применением методов секвенирования переменных областей от Illumina 16S (см., например, примеры 11 и 12).

Пример 21: Количественное определение концентрации спор с применением анализа на ДПК

[0338] Способы оценки концентрации спор в сложных смесях, как правило, требуют
20 разделения и отбора спор с последующим культивированием индивидуальных видов для определения числа колониеобразующих единиц. На существующем уровне техники отсутствуют способы количественного проращивания всех спор сложной смеси, поскольку для многих видов не были идентифицированы подходящие способствующие
25 прорастанию вещества. Кроме того, споруляция предположительно является стохастическим процессом в результате эволюционного отбора, что означает, что не все споры одного вида прорастают с одинаковым откликом на воздействие способствующим прорастанию веществом в некоторой концентрации и с некоторой продолжительностью и другие условия окружающей среды. Как вариант, был
30 разработан способ количественного определения споровых частиц в образце на основе ключевого метаболита бактериальных спор, дипиколиновой кислоты (ДПК), позволяющий избежать влияния на результаты фекальных загрязняющих примесей. В указанном анализе использован тот факт, что ДПК хелатирует Тербий 3+ с образованием люминесцентного комплекса (Fichtel et al, FEMS Microbiology Ecology, 2007; Kort et al. Applied and Environmental Microbiology, 2005; Shafaat and Ponce, Applied
35 and Environmental Microbiology, 2006; Yang and Pones, International Journal of Food Microbiology, 2009; Hindle and Hall, Analyst 1999). При флуоресцентном анализе с временным разрешением детектируется люминесценция тербия в присутствии ДПК, что обеспечивает количественную оценку концентрации ДПК в растворе.

[0339] Для проведения анализа 1 мл оцениваемого спорного стандарта переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл. Образцы центрифугировали на 13000
40 ОСЦ в течение 10 мин, и образец промывали в 1 мл стерильной деионизированной H₂O. Еще раз промывали, повторяя центрифугирование. Переносили 1 мл раствора в пробирку Хангейта и автоклавируют образцы в режиме пара в течение 30 минут при
45 250°C. Добавляли 100 мкл 30 мМ раствора TbCl₃ (400 мМ ацетата натрия, pH 5, 0, 30 мМ TbCl₃) к образцу. Получали серийные разведения автоклавируемого материала и измеряли флуоресценцию каждого образца с возбуждением светом на 275 нм и

измерением излучения на длине волны 543 нм со временем интегрирования 1,25 мс и задержкой 0,1 мс.

[0340] Очищенные споры получали согласно существующему описанию (например, см. <http://www.epa.gov/pesticides/способы/MB-28-00.pdf>). Готовили серийные разведения очищенных спор из культур *C. bifermentans*, *C. sporogenes* и *C. butyricum* и оценивали путем посева на среду ВВА и инкубирования в течение ночи при 37°C для определения значения КОЕ/мл. На фиг. 10 представлена линейная зависимость у разных спорообразующих бактерий, с изменениями, составляющими несколько логарифмических единиц, подтверждающая, что анализ ДПК подходит в качестве способа оценки содержания спор.

[0341] См. фиг. 10: Линейный диапазон анализа ДПК по сравнению с подсчетом числа КОЕ/мл

[0342] Расхождение между оценкой содержания спор по числу КОЕ способных, к прорастанию спор и оценкой при анализе ДПК для сложных популяций спор имеет большое значение для определения активности обработанного этанолом состава со спорами при клиническом применении. В таблице АС приведены данные по содержанию спор для 3 разных обработанных этанолом составов со спорами, использованных для успешного лечения 3 пациентов страдающих рецидивирующей инфекцией *C. difficile*. Содержание спор для каждого состава со спорами определяют с применением двух описанных способов.

Таблица АС. Количественное определение спор для обработанных этанолом составов со спорами с использованием анализа споровых КОЕ (СКОЕ) и анализа ДПК

Состав	Капсулы СКОЕ / 30	Капсулы ДПК SEq / 30	Отношение СКОЕ / ДПК
Состав 1	$4,0 \times 10^5$	$6,8 \times 10^7$	$5,9 \times 10^{-3}$
Состав 2	$2,1 \times 10^7$	$9,2 \times 10^8$	0,023
Состав 3	$6,9 \times 10^9$	$9,6 \times 10^9$	0,72

[0343] Очевиден тот факт, что содержание спор в 30 капсулах значительно варьирует. При оценке по способным к прорастанию СКОЕ содержание спор варьирует более чем в 10000 раз. По оценке с применением анализа ДПК содержание спор варьирует более чем в 100 раз. В отсутствие анализа ДПК сложно установить минимальную дозу для введения пациенту. Например, в отсутствие данных анализа ДПК можно заключить, что минимальная эффективная доза спор составляет 4×10^5 или менее с применением анализа СКОЕ (например, состав 1, таблица АС). Однако при использовании указанной дозы СКОЕ для нормирования доз в клинических условиях фактическая доза спор, получаемая пациентами, будет значительно ниже для других обработанных этанолом составов со спорами по оценке с применением анализа ДПК (таблица АД).

Таблица АД. Дозы ДПК в таблице АС при нормировании к 4×10^5 СКОЕ на дозу

Состав	СКОЕ / 30 капсул	ДПК SEq / 30 капсул	Доля от дозы состава 1
Состав 1	$4,0 \times 10^5$	$6,8 \times 10^7$	1,0
Состав 2	$4,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$	0,26
Состав 3	$4,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	0,0082

[0344] Становится ясно, что из-за вариабельности показателей СКОЕ и ДПК в разных донорских материалах использование СКОЕ в качестве меры активности в определенных случаях будет приводить к существенному занижению дозы. Например, выбор дозы 4×10^5 СКОЕ (измеренная эффективная доза для донорского состава 1) для продукта с составом 3 приведет к потенциальному более чем 100-кратному занижению дозы. Эта ситуация может быть исправлена только определением активности на основании анализа ДПК, лучше отражающим общее число спор в обработанном этанолом составе со спорами. Неожиданное открытие, сделанное авторами настоящего исследования, заключается в том, что анализ ДПК уникальным образом подходит для определения активности и дозирования обработанного этанолом состава со спорами.

Пример 22: Демонстрация улучшения роста при воздействии способствующим прорастанию веществом

[0345] Для повышения способности к прорастанию обработанных этанолом спор и демонстрации жизнеспособности спор споры от трех разных доноров проращивали с применением различной обработки и высевали на разные среды. Стимуляцию прорастания с применением ВНІС/бычьей желчи (ВНІС ох), Са-ДПК, сока рубца (RF), искусственного желудочного сока (ИЖС), муциновой среды (Muc), фетальной бычьей сыворотки (ФБС) или тиогликолята (Thi) в течение 1 часа при 37°C в анаэробных условиях проводили согласно имеющемуся описанию (см., например, примеры 13 и 14) на образцах от двух независимых доноров (фиг. 11). Обработанную способствующим прорастанию спор веществом смесь серийно разводили и высевали на чашки с различными средами, в том числе ВВА, Sweet B, Sweet B + лизоцим (2 мкг/мл), M2GSC и M2GSC + лизоцим (2 мкг/мл) согласно вышеприведенному описанию (см., например, примеры 13 и 14) для оценки прорастания спор. Подсчитывали колониеобразующие единицы и определяли титры с применением стандартных техник, известных специалистам в данной области техники. Как видно на фиг. 11, максимальное число колониеобразующих единиц получено при обработке ВНІС бычьей желчью. Указанная стимулирующая прорастание обработка также значительно увеличивает разнообразие, судя по оценке числа OTU, идентифицированных при 16S-секвенировании образцов (см., например, примеры 11 и 12) по сравнению с посевами без этапа стимуляции прорастания (фиг. 12). Как видно на фиг. 11, обработка разными способствующими прорастанию веществами оказывает варьирующие эффекты на число КОЕ от донора А (сверху слева) и донора В (снизу справа). По оси Y отложено число КОЕ спор на мл. Как видно на фиг. 12, проращивание значительно повышает разнообразие культивированных спорообразующих OTU.

[0346] Для тестирования эффекта термоактивации на стимуляцию прорастания обработанные этанолом образцы фекалий от трех разных доноров обрабатывали в течение 15 мин, воздействуя комнатной температурой, температурой 55С, 65С, 75С или 85С, а затем проращивали с применением BHIS + Бычья желчь в течение 1 ч при 37°С и высевали на среду ВВА (фиг. 13) согласно вышеприведенному описанию (см., например, примеры 13 и 14). Предварительное воздействие комнатной температурой обеспечивало получение равного или даже большего количества спор, чем воздействие более высокими температурами, для образцов от всех трех доноров. Также исследовали влияние температуры при проращивании, инкубируя образцы при комнатной температуре или при 37С на протяжении 1 часа в анаэробных условиях до посева на ВВА. Различий в количествах КОЕ для указанных двух вариантов условий не наблюдалось. Также тестировали влияние добавления лизоцима в чашки (2 мкг/мл) на образце от одного донора, используя различные температуры активации с последующим инкубированием в присутствии или в отсутствие лизоцима. Добавление лизоцима оказывало незначительный эффект при посеве на среду Sweet В или M2GSC, но меньший, чем при обработке BHIS с бычьей желчью без лизоцима в течение 1 часа (фиг. 14).

[0347] Как видно на фиг. 13, термоактивация в качестве стимулирующей прорастание обработки с применением BHIS + бычья желчь. Как видно на фиг. 14, лизоцим оказывает незначительный эффект, способствующий прорастанию.

[0348] Также исследовали время прорастания, обрабатывая 10% суспензию обработанных этанолом экскрементов от одного донора (см., например, пример 15), чем-либо из BHIS, таурохолата, бычьей желчи или Germix в течение 0, 15, 30 или 60 минут с последующим посевом на среду BHIS, EYA или ВВА (см., например, примеры 13 и 14). Через 60 минут большинство КОЕ во всех использованных комбинациях прорастали и тестирование сред завершалось.

Пример 23: Демонстрация эффективности способных к прорастанию и способных к споруляции фракций обработанных этанолом спор

[0349] Для оценки способов идентификации и очищения, и для усиления (например, путем модуляции разнообразия в композициях) активной спорообразующей экогруппы, происходящей из образцов донорских фекалий, обработанную этанолом популяцию спор (согласно описанию в примере 15) дополнительно разделяли на фракции.

«Способную к прорастанию фракцию» получали обработкой обработанного этанолом состава со спорами бычьей желчью, посевом на различные твердые среды с последующим, через 2 дня или 7 дней культивирования, соскобом всех выросших бактерий с чашек в 5 мл ФСБ на чашку для получения бактериальной суспензии.

«Способную к споруляции фракцию» получали согласно описанию выше, за исключением того, что клеткам позволили расти на твердой среде в течение 2 дней или 7 дней (продолжительность увеличивали для обеспечения споруляции, что является обычным для протоколов споруляции), и полученную бактериальную суспензию обрабатывали 50% этанолом для получения популяции «способных к споруляции» спор, или видов, способных образовывать споры. При подготовке указанных фракций фекальный материал от донора А использовали для получения обработанного этанолом состава со спорами согласно вышеприведенному описанию в примере 15; затем содержание спор определяли анализом ДПК и КОЕ/мл при культивировании на разных средах (фиг. 15) согласно вышеприведенному описанию (см. пример 21). См. фиг. 15: Споры, изначально присутствующие в обработанном этанолом составе со спорами по оценке с применением ДПК и КОЕ/мл при культивировании на определенных средах.

[0350] Для определения фракции, которая способна к споруляции оценивали

содержание КОЕ и ДПК в 2-дневных и 7-дневных «способных к прорастанию» фракциях до и после обработки этанолом для получения споровой фракции. Бактериальные суспензии обрабатывали этанолом, проращивали с применением бычьей желчи, и высевали на те же типы сред, на которых культивировали «способную к прорастанию» фракцию. Данные по ДПК показали, что при культивировании на чашках в течение 2 и 7 дней образовывалось такое же общее количество спор. Колонии с нескольких типов сред собирали точечным методом для анализа последовательностей 16S для идентификаций присутствующих спорообразующих бактерий (таблица 13).

[0351] 2-дневную «способную к прорастанию» фракцию и 7-дневную «способную к споруляции» фракцию использовали для лечения в аналитической модели профилактики на мышах согласно приведенному описанию (см., например, пример 16). В качестве контроля подготовленную 10% суспензию фекалий от донора (Донор В) также вводили мышам для моделирования трансплантации фекальной микробиоты (FMT). Снижение массы тела и смертность в различных экспериментальных и контрольных группах исследования представлены на графиках на фиг. 17 и обобщены в таблице 15, которая также содержит информацию о дозировках. Указанные данные ясно показывают, что и «способная к прорастанию» и «способная к споруляции» фракции эффективны для защиты мышей от *C. difficile* при стимуляции *C. difficile* в модели профилактики на мышах (см., например, пример 16). Эффективность указанных фракций показывает также, что присутствующие в них виды ответственны за эффективность споровой фракции, поскольку выделение фракций дополнительно уменьшает присутствие каких бы то ни было потенциальных загрязняющих примесей из исходного состава со спорами.

[0352] См. фиг. 16: Титр «способной к прорастанию» фракции через 2 дня (слева) и способной к споруляции фракции (справа), по ДПК и КОЕ/мл. «Способную к споруляции» фракцию, полученную через 7 дней роста, измеряли согласно вышеприведенному описанию с применением анализов прорастания и роста или содержания ДПК согласно вышеприведенному описанию (см. пример 21).

[0353] Виды, присутствующие в «способных к прорастанию» и «способных к споруляции» фракциях определяли посредством секвенирования полноразмерных 16S полученных точечным методом колоний и посредством 16S-секвенирования нового поколения (16S-NGS) собственно фракций. Данные для выделенных точечным методом колоний указывают на то, что виды *Clostridium* очень многочисленны в обеих фракциях, а данные NGS-секвенирования показывают наличие других спорообразующих организмов, которые, как правило, обнаруживаются в обработанных этанолом составы со спорами.

[0354] Результаты представлены следующим образом: см. таблицу 13. Виды, идентифицированные как «способные к прорастанию» и «способные к споруляции» с применением точечного метода выделения колоний. См. таблицу YYY. Виды, идентифицированные как «способные к прорастанию» с применением 16S-V4 NGS-секвенирования. См. таблицу ZZZ. Виды, идентифицированные как «способные к споруляции» с применением подхода 16s-V4 NGS. См. фиг. 17: В модели профилактики на мышах продемонстрировано, что «способные к прорастанию» и «способные к споруляции» составы обеспечивают защиту при стимуляции *C. difficile*. Каждый график отражает изменение индивидуальной массы тела мышей относительно дня -1 на протяжении эксперимента. Число смертей на протяжении эксперимента указано сверху над графиком и отражено линейным окончанием перед днем 6. На верхних панелях (слева направо) представлены группа с контролем-носителем, группа с суспензией фекалий и группа необработанного нестимулированного контроля, тогда как нижние

панели соответствуют обработанному этанолом очищенному в градиенте составу со спорами; обработанному этанолом очищенному в градиенте «способному к прорастанию» составу и обработанному этанолом очищенному в градиенте «способному к споруляции» составу. См. таблицу 15: Результаты профилактической модели на мышах

и информация о дозировании

Пример 24: Эффективность объединенных донорских образцов для профилактики у мышей

[0355] Для тестирования эффективности и дозировок объединенных донорских образцов используется модель профилактики на мышах с *C. difficile* (например, см. пример 16) со смешанными двумя и более донорскими образцами согласно вышеприведенному описанию. Снижение массы тела и смертность при применении смешанного спорового продукта относительно спорового продукта, происходящего от одного донора при разных дозировках определяют, эквивалентны ли две указанные схемы лечения или одна значительно эффективнее другой.

[0356] Дозировка спорового продукта, происходящего от одного или нескольких доноров составляет от $1E4$ до $1E10$ КОЕ/мл. Споровый продукт получают смешиванием продуктов, происходящих от любого числа доноров в диапазоне от 1 до 10 либо в равных концентрациях, либо в других известных концентрациях.

[0357] Кроме того, указанный способ может использоваться для размножения споровой фракции для целей производства. Для целей производства обогащенная споровую фракцию (например, очищенную и обработанную EtOH фракцию образца фекалий) сохраняют в виде совокупности аликвот, формирующих банк жизнеспособных спорообразующих организмов. Аликвоту из указанного банка восстанавливают обработкой способствующим прорастанию веществом с последующим

культивированием на среде и в условиях, в целом благоприятных для спорообразующих организмов и стимулирующих споруляцию. Через достаточное для размножения время размножившиеся бактерии, в том числе споры, собирают, и указанный состав растворяют или проводят термообработку для выделения споровой фракции. Указанная фракция может быть дополнительно очищена от неспоровых форм и компонентов культуральной среды. Процесс размножения, выделения спор и, необязательно, очищения может быть повторен в возрастающих объемах для получения больших количеств для дальнейшего использования. Когда собрано достаточно размноженного способного к прорастанию/способного к споруляции материала, он может быть дополнительно очищен, сконцентрирован или разведен, и/или законсервирован в виде, подходящем для дальнейшего использования, например, для клинического дозирования.

[0358] В описанный выше процесс могут быть включены характеристики, обеспечивающие возможность его дальнейшего использования, в частности, применения продукта, например, клинического применения. Получение исходной споровой фракции может проводиться в контролируемых условиях (условиях cGMP), и может быть валидировано удаление неспоровых организмов с высокой степенью надежности. Прорастание может проводиться с применением реагентов, более стандартизированных, чем природные продукты, такие как бычья желчь, например, синтетические смеси солей желчных кислот. Размножение может осуществляться с использованием сред, компоненты которых являются предпочтительными в отношении клинической безопасности, например, получены от сертифицированных животных или получены не из животных. Условия могут быть подобраны так, чтобы обеспечивать стабильные композиции спорулирующих организмов, менее подверженные загрязнению и лучше подходящих для масштабирования, например, закрытые ферментеры с мешалкой,

оборудованные системой обратной связи. Спорулирующие организмы могут быть выделены из процесса с применением процедур, по отдельности или в сочетании жестко элиминирующих неспорные элементы и другие остаточные продукты процесса, например, обработки растворителем, экстракция в двухфазной водной системе и/или продолжительная термообработка при 60°C. Консервация может включать добавление вспомогательных веществ и/или коррекцию условий таким образом, чтобы обеспечить преобразование в предпочтительную лекарственную форму, пригодную для длительного хранения, например, добавление трегалозы с последующей лиофилизацией или распылительной сушкой, дополнительного смешивания порошка с микрокристаллической целлюлозой и заключение в желатиновую капсулу с образованием подходящего для перорального дозирования продукта.

Пример 25: Приживление, стимуляция и снижение носительства патогена у пациентов, получавших лечение споровыми композициями

[0359] Для характеристики состава микробиоты пациента за 1, 2, 3, 4, и 5, 6, 7, 8, 9 и 10 недель до лечения (перед лечением) и до 4 недель после лечения использовали дополнительные геномные и микробиологические способы.

[0360] Для определения OTU, приживающихся при лечении обработанным этанолом составом со спорами у пациентов, и ответного изменения их микробиома, указанный микробном определяли посредством секвенирования 16S-V4 до лечения (перед лечением) обработанным этанолом составом со спорами и до 25 дней после получения лечения. Например, лечение пациента 1 обработанным этанолом составом со спорами приводило к приживлению OTU при лечении спорами и к стимуляции микробиома пациента (фиг. 18 и фиг. 19). К 25 дню после лечения в общем пуле микроорганизмов доминировали виды следующих таксономических групп: *Bacteroides*, *Sutterella*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Eubacterium*, *Gemmiger/Faecalibacterium* и не образующие спор *Lactobacillus* (см. конкретные OTU в таблице 16 и таблице 2). Первые два рода представляют OTU, не образующие спор, а последние таксономические группы представляют OTU, которые, предположительно, образуют споры.

[0361] Лечение пациентов обработанным этанолом составом со спорами приводит к формированию экогруппы микроорганизмов, обладающей большим разнообразием, чем до лечения (фиг. 18). Характеризация микробиома на основе генома подтверждала приживление диапазона OTU, которые отсутствовали у пациента до лечения (таблица 16). Указанные OTU содержали как бактериальные виды, способные или не способные образовывать споры, так и OTU, представляющие несколько филогенетических клад. Организмы, которые отсутствуют у пациента 1 до лечения, либо приживаются, непосредственно попадая из обработанной этанолом споровой фракции, либо происходит их стимуляция благодаря созданию в кишечнике среды, благоприятной для разнообразной здоровой микробиоты. Кроме того, численность бактерий группы *Bacteroides fragilis* увеличивалась на 4log и 6log у пациентов 1 и 2 (фиг. 20).

[0362] OTU, составляющие стимулированную экогруппу, не присутствуют у пациента до лечения и/или встречаются исключительно редко, так что не составляют значимую фракцию от общего носительства микроорганизмов и не детектируются с помощью методов геномного и/или микробиологического анализа. OTU, которые являются представителями приживающихся и стимулированных экогрупп, идентифицировали путем определения OTU, относительная распространенность которых увеличивается после лечения, и которые, соответственно: (i) присутствуют в обработанном этанолом составе со спорами и отсутствуют у пациента до лечения, или (ii) отсутствуют в обработанном этанолом составе со спорами, но их относительная распространенность

увеличивается со временем после лечения составом благодаря формированию в результате лечения благоприятных для роста условий. Примечательно, что последние OTU способны вырастать из резервуаров, где они встречаются у пациента с низкой частотой, или появляться из экзогенных источников, например, из пищи. OTU, которые составляют «коровую» стимулируемую или приживающуюся экогруппу, могут быть определены по общему проценту пациентов, у которых наблюдается их приживание и/или стимуляция; чем выше указанный процент, тем более вероятно, что они входят в коровую экогруппу, отвечающую за катализирование сдвига в направлении от дисбиотической экогруппы. Доминирующие OTU в экогруппе могут быть идентифицированы с применением нескольких способов, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, определение OTU, имеющих максимальную относительную распространенность либо в стимулированных, либо в приживающихся экогруппах, и определение порога общей относительной распространенности. Например, доминирующие OTU в стимулируемой экогруппе пациента 1 идентифицировали путем определения OTU с максимальной относительной распространенности, которые совместно составляют 60% носительства микроорганизмов, входящих в указанную стимулируемую экогруппу у пациента.

[0363] См. фиг. 18: Разнообразие микроорганизмов, измеренное в образцах после обработки обработанными этанолом спорами и образцах от пациента до и после лечения. Общее разнообразие микроорганизмов определяют с применением индекса альфа-разнообразия Chao1 и измеряют при разной глубине анализа генома для подтверждения адекватного покрытия последовательностей для анализа микробиома в целевых образцах. Пациент до лечения (фиолетовый) был носителем микробиома со значительно уменьшенным общим разнообразием по сравнению с пациентом, получавшим лечение обработанными этанолом спорами (красный) и пациентом после лечения на 5 день (синий), 14 день (оранжевый) и 25 день (зеленый).

[0364] См. фиг. 19: В экогруппе микроорганизмов пациента при лечении обработанными этанолом спорами происходит сдвиг от дисбиотического состояния к здоровому состоянию. Анализ главных координат на основании общего разнообразия и структуры микробиома (бета-разнообразие Брея-Кертиса) пациента до и после лечения показывает, что приживание OTU при лечении спорами и стимуляция экогруппы микроорганизмов у пациента приводит к формированию экогруппы микроорганизмов, отличной как от микробиома до лечения, так и от экогруппы при лечении обработанными этанолом спорами (таблица 16).

[0365] См. фиг. 20: Стимуляция видов *Bacteroides* у пациентов. Сравнение числа групп вида *Bacteroides fragilis* на КОЕ/г экскрементов до лечения и на 4 неделе после лечения обнаруживает увеличение 4log или более. Возможность с помощью 16S-V4-идентификации OTU определять принадлежность OTU к конкретному виду зависит отчасти от разрешения области 16S-V4 гена 16S для конкретного вида или группы видов. Как плотность доступных референсных последовательностей 16S для разных областей указанного дерева, так и свойственная гену 16S вариабельность у разных видов определяют точность таксономической классификации определенного прочтения последовательности. С учетом топологической природы филогенетического дерева и того, что дерево отражает иерархические взаимоотношения OTU на основании сходства их последовательностей и базовой эволюционной модели, таксономическая классификация прочтения может быть распространена на более высокий уровень с применением основанной на кладах процедуры определения принадлежности (таблица 1). При использовании указанного подхода клады определяют на основании топологии

филогенетического дерева, сконструированного на основании полноразмерных последовательностей 16S с применением максимального правдоподобия или других филогенетических моделей, известных специалистам в области филогенетики. Клады конструируют для подтверждения того, что все OTU в определенной кладе: (i) 5 расположены в пределах определенного числа узлов с бутстреп-поддержкой друг от друга (обычно, 1-5 значений бутстреп), и (ii) отличаются не более чем на 5% в отношении генетического сходства. OTU, принадлежащие одной кладе, можно определить как генетически и филогенетически отличные от OTU другой клады на основании данных секвенирования 16S-V4. OTU, попадающие в одну кладу, являются 10 эволюционно близкородственными, и могут быть отличимы или неотличимы друг от друга на основании данных секвенирования 16S-V4. Мощность основанного на кладах анализа обусловлена тем, что представители одной клады, благодаря эволюционному родству, играют аналогичные функциональные роли в экогруппе микроорганизмов, например, обнаруживаемых в кишечнике человека. Композиции, где одни виды 15 замещены другими из той же клады, предположительно сохраняют консервативную экологическую функцию и, соответственно, подходят для применения в настоящем изобретении.

[0366] Образцы стула разделяли на аликвоты и ресуспендировали 10× (объем/масса) либо в 100% этаноле (для определения генома) или в ФСБ, содержащем 15% глицерина 20 (для выделения микроорганизмов), а затем хранили при -80°C до использования. Для анализа геномных 16S-последовательностей определяли полные 16S-последовательности для полученных точечным методом из изолятов на чашках колоний согласно описанию в примерах 11 и 12, и первичные образцы стула подготавливали для направленной работы с 16S-V4 с применением способа для гетерогенных образцов в примере 10.

[0367] Примечательно, что последовательности 16S изолятов определенной OTU 25 филогенетически располагаются в составе соответствующих им клад, несмотря на то, что фактическое таксономическое определение вида и рода может указывать на их таксономическое отличие от других представителей клад, в которые они распределены. Расхождения между таксономическим наименованием OTU на основе 30 микробиологических характеристик и на основе генетического секвенирования известны из литературы. Для перечисленных в сноске OTU из указанной таблицы известны расхождения при разных способах присвоения таксономического наименования.

[0368] Приживление OTU у пациента при лечении обработанным этанолом составом со спорами, а также итоговая стимуляция резидентного микробиома приводили к 35 значительному снижению уровней и элиминированию у пациента носительства других патогенных видов помимо *C. difficile*. 16S-V4-секвенирование первичных образцов стула показало, что до лечения 20% прочтений соответствовали роду *Klebsiella* и еще 19% принадлежали роду *Fusobacterium*. Эти поразительные данные свидетельствуют о присутствии глубоко дисбиотической микробиоты, связанной с рецидивирующей *C. 40 difficile* инфекцией и хроническим применением антибиотиков. У здоровых индивидуумов *Klebsiella* является резидентом микробиома человека всего у приблизительно 2% субъектов на основании анализа базы данных HMP (www.hmpdacc.org), и средняя относительная распространенность *Klebsiella* составляет всего приблизительно 0,09% в экскрементах указанных людей. Неожиданное обнаружение 20% относительной 45 распространенности у пациента 1 до лечения указывает на провоспалительное состояние ЖКТ, позволяющее «патобионту» разрастаться и побеждать в конкурентной борьбе комменсальные организмы, в норме обнаруживаемые в кишечнике. Аналогичным образом, резко выраженный избыточный рост *Fusobacterium* указывает на глубокий

дисбиоз микробиоты ЖКТ. Один вид *Fusobacterium*, *F. nucleatum* (OTU филогенетически неотличима от *Fusobacterium* sp. 3_1_33 на основании 16S-V4), был назван «новым патогеном ЖКТ» на основании связи с ВЗК, болезнью Крона и раком ободочной и прямой кишки у людей, а также подтвержденной способности вызывать развитие рака ободочной и прямой кишки в моделях на животных [Allen-Vercoe, Gut Microbes (2011) 2:294-8]. Важно, что ни *Klebsiella*, ни *Fusobacterium* не были детектированы среди прочтений 16S-V4 на 25 день (Таблица 18).

[0369] Для дальнейшего определения колонизации пищеварительного тракта *Klebsiella* и другими *Enterobacteriaceae* и для идентификации видов указанных организмов образцы фекалий, собранные до лечения и на 25 день, хранящиеся при -80С в виде суспензий с ФСБ и глицерином, высевали на разнообразные селективные среды, в том числе на лактозную среду Мак-Конки (селективную среду для грамотрицательных энтеробактерий) и цитратную среду Симмонса с инозитолом (селективную среду для *Klebsiella* spp) [Van Cregten et al, J. Clin. Microbiol. (1984) 20: 936-41]. Идентифицированные в образцах от пациента энтеробактерий включали *K. pneumoniae*, *Klebsiella* sp. Co_9935 и *E. coli*. Удивительным образом, численность всех видов *Klebsiella* уменьшалась на 2-4 логарифмических единицы, тогда как *E. coli*, нормального комменсального организма, присутствующего в нормальной микробиоте, уменьшалось менее чем на Ног (таблица 19). Указанное уменьшение носительства *Klebsiella* spp. наблюдается у нескольких пациентов (таблица 19). У четырех индивидуальных пациентов исследовали присутствие *Klebsiella* spp. до лечения и через 4 недель после лечения. *Klebsiella* spp. детектировали по росту на селективной цитратной среде Симмонса с инозитолом согласно вышеприведенному описанию. Проведение серийных разведений и посева с последующим определением титров КОЕ/мл для морфологически отличных видов и идентификация представителей указанных морфологически отличных классов с применением секвенирования полноразмерных последовательностей 16S, позволили рассчитать титры для конкретных видов.

[0370] Род *Bacteroides* представляет собой важного члена микробиоты ЖКТ; 100% образцов стула согласно проекту «Микробном человека» («Human Microbiome Project») содержат по меньшей мере один вид *Bacteroides* с общей относительной распространенностью в указанных образцах, составляющей от 0,96% до 93,92% с медианной относительной распространенностью 52,67% (справочные данные HMSMCP, www.hmpdacc.org). Была показана связь *Bacteroides* в кишечнике с ферментацией аминокислот и разложением сложных полисахаридов. Его присутствие в кишечнике стимулируется богатыми продуктами животного происхождения диетами, свойственными типичному западному рациону питания [David, L.A. et al, Nature (2013) doi:10.1038/nature12820]. Удивительным образом, до лечения менее чем 0,008% прочтений 16S-V4 от пациента 1 картировались на род *Bacteroides*, с высокой вероятностью указывая на отсутствие видов *Bacteroides* на уменьшение численности жизнеспособных *Bacteroides* до экстремально малых уровней в микробиоме кишечника пациента. После лечения через 5 дней $\geq 42\%$ прочтений 16S-V4 может быть отнесено к роду *Bacteroides*, а к 25 дню после лечения 59,48% микробиома кишечника пациентов составлял *Bacteroides*. Указанные результаты подтверждали микробиологически по отсутствию детектируемых *Bacteroides* в образце, взятом до лечения, путем посева на две разные селективные среды для *Bacteroides*: агар для *Bacteroides* с желчными кислотами и эскулином (BBE), селективный в отношении группы *Bacteroides fragilis* [Livingston, S.J. et al J. Clin. Microbiol (1978). 7: 448-453] и арабинозный агар без полиаминов (PFA) [Noack et al. J. Nutr. (1998) 128: 1385-1391; модифицирован замещением глюкозы арабинозой]. Предел детекции

для взятого до лечения образца в высокоселективном агаре ВВЕ составлял $<2 \times 10^3$ КОЕ/г, а предел детекции *Bacteroides* на агаре PFA составлял приблизительно 2×10^7 КОЕ/г из-за роста на указанной среде многих не относящихся к *Bacteroides* видов. Число

5 колоний видов *Bacteroides* на 25 день достигало 2×10^{10} КОЕ/г, что согласуется с данными 16S-V4-секвенирования и указывает глубокую реорганизацию микробиоты пищеварительного тракта у пациента 1 (Таблица 20).

[0371] Примечательна значительная распространенность *Bacteroides* у пациента 1 на 25 (а также уже на 5 день по данным 16S-V4-секвенирования). Жизнеспособные бактерии группы *Bacteroides fragilis* отсутствовали в обработанной этанолом споровой популяции на основании микробиологических посевов (при пороге детекции 10 КОЕ/мл). Таким образом, введение обработанной этанолом популяции спор пациенту 1 приводило не только к приживлению спорообразующих видов, но также и к восстановлению высоких уровней неспорообразующих видов, обычно обнаруживаемых у здоровых индивидуумов, 15 путем создания ниши, позволяющей обеспечить восстановление популяции видов *Bacteroides*. Указанные организмы с наибольшей вероятностью либо присутствуют с крайне низкой распространенностью в ЖКТ пациента 1, или присутствуют в резервуаре в ЖКТ, из которого способны восстанавливаться до высокого титра. Указанные виды могут также быть реинокулированы перорально из пищи после лечения. Авторы 20 настоящего изобретения называют указанное восстановление здоровой популяции пищеварительного тракта с OTU, не присутствующих в обработанной этанолом популяции спор «стимуляцией». Стимуляция представляет собой важное явление, демонстрирующее возможность использования обработанной этанолом споровой экогруппы для восстановления нормальной микробиоты за счет заселения другой 25 совокупностью организмов или комменсальных организмов, фактически не являющихся компонентами собственно обработанной этанолом популяции спор; в частности лечение спорами и приживление OTU из споровой композиции создает нишу, благоприятную для разрастания OTU, необходимых для сдвига дисбиотического состава микробиома в сторону связанных со здоровым состоянием экогруппы микроорганизмов. 30 Разнообразие видов *Bacteroides* и их приблизительная относительная распространенность в кишечнике пациента 1 представлены в таблице 21, включающей по меньшей мере 8 разных видов.

[0372] См. фиг. 21: Приживающиеся виды и стимулируемые виды в микробиомах пациентов после лечения обработанной этанолом популяцией спор. Относительная 35 распространенность прижившихся или стимулированных видов определяли согласно описанию на основании числа прочтений 16S-последовательностей. Каждый график соответствует одному пациенту, получавшему лечение от рецидивирующей *C. difficile* обработанной этанолом популяцией спор.

[0373] Влияние лечения обработанной этанолом популяцией спор на носительство 40 устойчивых к имипенему *Enterobacteriaceae* оценивали путем посева из клинических образцов от пациентов 2, 4 и 5, взятых до лечения и на 28 день, на лактозную среду Мак-Конки с 1 мкг/мл имипенема. Количество резистентных организмов определяли морфологически, регистрировали и получали ДНК для секвенирования полноразмерных 16S рРНК согласно описанию выше. Изоляты идентифицировали как *Morganella morganii*, 45 *Providencia rettgeri* и *Proteus pennerii*. Все указанные организмы представляют собой комменсальные организмы кишечника; избыточный рост может приводить к бактеремии и/или инфекциям мочевыводящих путей, при которых требуется агрессивное лечение антибиотиками и, в некоторых случаях, госпитализация [Kim, B-N, et al Scan J. Inf Dis

(2003) 35: 98-103; Lee, I-K и Liu, J-W J. Microbiol Immunol Infect (2006) 39: 328-334; O'Hara et al, Clin Microbiol Rev (2000) 13: 534]. Титры организмов до лечения и на 28 день для каждого пациента представлен в таблице 22. Важно, что введение обработанного этанолом состава со спорами приводило более чем к 100-кратному снижению в 4 из 5 случаев носительства Enterobacteriaceae с рядом устойчивых к имипенему организмов (Таблица 22).

[0374] Помимо определения вида и регистрации, несколько изолятов каждого организма от пациента 4 культивировали в течение ночи в 96-луночных планшетах, содержащие серии 2-кратных разведений имипенема для количественного определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) антибиотика. Рост организмов детектировали по рассеянию света на 600 нм с помощью планшет-ридера SpectraMax M5e. В клинических условиях указанные виды считают устойчивыми к имипенему, если МИС для них составляет 1 мкг/мл или выше. МИС для изолятов *M. morganii* из образцов от пациента D до лечения составляли 2-4 мкг/мл, а МИС для *P. pennerii* изолятов составляли 4-8 мкг/мл. Таким образом, введение обработанной этанолом популяции спор пациенту 4 приводило к выведению двух устойчивых к имипенему организмов (таблица 16).

Пример 26. Обогащение и очищение бактерий.

[0375] Для очищения индивидуальных бактериальных штаммов выбирали чашки с разведениями, плотность на которых позволяла произвести разделение одиночных колоний. Колонии собирали точечным методом с помощью стерильного инструмента (стерильной петли или иглы) и повторно высевали методом штриха на ВВА или другую твердую среду. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 3-7 дней. Одну или большее количество хорошо изолированных одиночных колоний основного морфологического типа пересеивали методом штриха. Указанный процесс повторяли по меньшей мере трижды до появления стабильной единственной морфологии колоний. Выделенный микроорганизм затем культивировали в анаэробных условиях в жидкой среде в течение 24 часов или более для получения чистой культуры с 10^6 - 10^{10} КОЕ/мл. Жидкая ростовая среда может включать среду на основе сердечно-мозгового бульона (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010) с добавлением дрожжевого экстракта, гема, цистеина и углеводов (например, мальтозы, целлобиозы, растворимого крахмала) или другой ранее описанной среды (см., например, пример 14). Культуру центрифугировали при 10000×g в течение 5 минут для осаждения бактерий, отработанную культуральную среду удаляли, и бактерии ресуспендировали в стерильном ФСБ. Добавляли стерильный 75% глицерин до конечной концентрации 20%. Аликвоту глицеринового основного раствора титровали методом серийных разведений и посева. Оставшуюся часть основного раствора замораживали на сухом льду в течение 10-15 минут и затем помещали в условия с температурой -80°C для длительного хранения.

Пример 27. Состав клеточных банков.

[0376] Клеточные банки (RCB) бактериальных штаммов получали следующим образом. Бактериальные штаммы высевали из хранящихся при -80°C замороженных базовых составов с глицерином на кровяной агар для *Brucella* с гемом или витамином К (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010), M2GSC (Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed, ASM Press, 2010) или другую твердую ростовую среду, и инкубировали от 24 до 48 ч при 37°C в анаэробной камере с газовой смесью $H_2:CO_2:N_2$ 10:10:80. Одиночные колонии собирали точечным методом и использовали для инокуляции от 250 мл до 1 л бульона Вилкинса-Шалгрена, бульона с сердечно-мозговым экстрактом, бульона M2GSC или другой ростовой среды, и культивировали

до достижения середины экспоненциальной фазы - поздней экспоненциальной фазы, либо до достижения стационарной фазы роста. Как вариант, одиночные колонии могут быть использованы для инокуляции пилотной культуры объемом 10 мл, затем используемой для инокуляции культуры большего объема. Ростовую среду и фазу роста для сбора выбирали таким образом, чтобы максимизировать титр клеток, споруляцию (при необходимости) и фенотипы, которые могут быть связаны с нужными клетками *in vitro* или *in vivo*. Культуры необязательно культивировали в статическом режиме или при перемешивании, в зависимости от того, что именно обеспечивало максимальный титр клеток. Затем культуры концентрировали 10-кратно или более путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 20 минут, и ресуспендировали в стерильном забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ) с добавлением 15% глицерина. Аликвоты объемом 1 мл переносили в криопробирки объемом 1,8 мл, которые замораживали на сухом льду и хранили при -80°C. Идентичность определенного клеточного банка подтверждали путем ПЦР-амплификации гена 16S рРНК с последующим прямым циклическим секвенированием по Сэнгеру, и сравнения с курируемой базой данных рРНК для определения таксономического идентификатора. Затем подтверждали, что каждый банк обеспечивает получение колоний с единственной морфологией при высевании методом штриха на кровяной агар для *Brucella* или агар M2GSC. Если наблюдалось более одного варианта морфологии, принадлежность колоний к предполагаемому виду подтверждали путем ПЦР-анализа и секвенирования гена 16S рРНК. Варианты морфологии колоний могут наблюдаться и в чистых культурах; для многих бактерий подробно описаны механизмы образования колоний с варьирующей морфологией (van der Woude, *Clinical Microbiology Reviews*, 17:518, 2004), в том числе для видов *Clostridium* (Wadsworth-KTL *Anaerobic Bacteriology Manual*, 6th Ed, Jousimie-Somer, et al 2002). Для RCB облигатных анаэробов подтверждали отсутствие аэробных колониеобразующих единиц с порогом детекции 10 КОЕ/мл.

Пример 28. Определение титра.

[0377] Число жизнеспособных клеток на мл определяли на свежесобранной промытой и концентрированной культуре путем посева серийных разведений RCB на кровяной агар для *Brucella* или другую твердую среду, и оно варьировало от 10^6 до 10^{10} КОЕ/мл. Влияние замораживания на жизнеспособность определяли путем титрования банков после одного или двух циклов замораживания-размораживания на сухом льду или при -80°C, с последующим размораживанием в анаэробной камере при комнатной температуре. Для некоторых штаммов наблюдалось падение числа жизнеспособных КОЕ/мл на 1-3log после первого или второго цикла замораживания-размораживания, тогда как на жизнеспособность других это не влияло.

Пример 29. Состав бактериальных композиций.

[0378] Индивидуальные штаммы, как правило, размораживали на льду и комбинировали в анаэробной камере для получения смесей, с последующим вторым замораживанием при -80°C для сохранения смешанных образцов. При получении комбинаций штаммов для анализов *in vitro* или *in vivo* число КОЕ в конечной смеси оценивали на основании титра при втором замораживании-размораживании индивидуальных штаммов. При экспериментах на грызунах штаммы могут быть скомбинированы в равных количествах для доставки от $1e4$ до $1e10$ на штамм. Кроме того, некоторые бактерии могут не вырастать до титра, достаточного для создания клеточных банков, обеспечивающих получение композиций, в которых все бактерии присутствовали бы в количестве $1e10$.

Пример 30. Идентификация ключевых OTU и функций

[0379] Организм человека представляет собой экосистему, в которой микробиота, и микробном играют важную роль в основных нормальных функциях систем человека (например, метаболической, иммунологической и неврологической). Микробиота и конечный микробном содержат экогруппу микроорганизмов, которые сосуществуют у индивидуальных субъектов, взаимодействуя друг с другом и с хозяином (т.е. субъектом-млекопитающим) с формированием динамического сообщества с присущим ему биоразнообразием и функциональными характеристиками. В указанных системах взаимодействия микроорганизмов (т.е. экогруппах) конкретные представители могут вносить более существенный вклад, чем другие; соответственно, указанные представители также обнаруживаются во многих экогруппах, и удаление указанных микроорганизмов из экогруппы может оказывать существенное влияние на функциональные возможности конкретной экогруппы. В 1969 году Робертом Пейном (Robert Paine) была предложена концепция «ключевых видов» (см. Paine RT. 1969. A note on trophic complexity and community stability. The American Naturalist 103: 91-93.) для описания существования таких ключевых видов, составляющих неотъемлемую часть определенной экосистемы независимо от их распространенности в экологическом сообществе. Изначально Пейн описал роль морской звезды *Pisaster ochraceus* в морских экосистемах; с тех пор концепция была экспериментально подтверждена для многочисленных экосистем.

[0380] Ключевые OTU и/или функции определяют вычислительными методами путем анализа экосистем, обнаруженных в определенном наборе образцов, имеющих специфический фенотип. Ключевые OTU и/или функции определены как все узлы заданной группы систем, отвечающие двум или большему числу следующих критериев. Согласно Критерию 1 узел часто встречается в системах, и системы, где встречается указанный узел, обнаруживаются у значительного количества индивидуумов; частота встречаемости указанных узлов в системах и распространенность указанных систем у индивидуумов показывает, что указанные узлы выполняют важную биологическую функцию у многих индивидуумов. Согласно Критерию 2, узел часто наблюдается в системах, и каждая из систем, где наблюдается указанный узел, содержит значительное число узлов - эти узлы, таким образом, являются «суперконнекторами», то есть образуют ядро большинства системы и, соответственно, обладают большой биологической значимостью в смысле функционального вклада в определенную экогруппу. Согласно Критерию 3, узел обнаруживается в системах, содержащих значительное число узлов (т.е. больших системах), и известно, что указанные системы, где обнаруживается указанный узел, встречаются у большого числа субъектов; указанные системы потенциально представляют большой интерес, поскольку маловероятно, что большие системы, встречающиеся у многих индивидуумов, образуются исключительно случайным образом; с высокой вероятностью это указывает на биологическую значимость. Необязательно, нужные пороги для частоты, с которой узел встречается в экогруппах системы, частоты, с которой определенная система встречается в образцах от субъектов и для размера определенной системы, необходимого для ее классификации как ключевого узла, определяют как 50-й, 70-й, 80-й или 90-й процентиля распределения указанных переменных. Необязательно, нужные пороги определяют по значению определенной переменной, существенно отличающемуся от среднего или медианного значения определенной переменной, с применением стандартных параметрических или непараметрических критериев статистической значимости. Согласно другому варианту реализации ключевой узел определяют узел, встречающийся в образце с представляющим интерес фенотипом, например, но не ограничиваясь указанным, «здоровый» фенотип,

и в то же время не встречающийся в образце с не представляющим интереса фенотипом, например, но не ограничиваясь указанным, «болезненным» фенотипом. Необязательно, ключевой узел определяют как узел, который, как показано, значимо отличается от обнаруживаемых с применением данных пермутационных тестов для оценки значимости.

5 Пример 31. Идентификация коровой экогруппы в обработанном этанолом составе со спорами

[0381] Десять разных обработанных этанолом составов со спорами получали от 6 разных доноров (согласно описанию в примере 15). Указанные составы со спорами использовали для лечения 10 пациентов, каждый из которых страдал рецидивирующей инфекцией *C. difficile*. Пациентов идентифицировали с применением критериев включения/исключения, описанных в примере 18, а доноров идентифицировали, с использованием критериев, описанных в примере 1. Ни у одного из пациентов не наблюдалось рецидива *C. difficile* за 4 недели наблюдения после лечения, хотя исходя из литературных источников, можно было ожидать возникновения рецидива у 70-80% субъектов после отмены антибиотика [Van Nood, et al, NEJM (2013)]. Таким образом, обработанные этанолом составы со спорами от нескольких разных доноров и нескольких взятий донорских материалов продемонстрировали примечательную клиническую эффективность.

[0382] Для определения коровой экогруппы, определяющей примечательную клиническую эффективность обработанного этанолом состава со спорами, проводили следующий анализ. Состав OTU состава со спорами определяли путем секвенирования 16S-V4 рРНК, и численными методами определяли принадлежность OTU согласно примеру 12. В качестве надежного порога для определения только OTU, с крайне малой вероятностью появившихся в результате ошибок во время амплификации или секвенирования, устанавливали требование детекции по меньшей мере 10 прочтений последовательностей OTU в обработанном этанолом составе со спорами. В рутинных способах, используемых специалистами в области определения микробиома геномными методами, для относительной распространенности прочтения в качестве значения отсечения применяется порог, существенно меньший, чем значение ≥ 10 прочтений, используемое для указанного анализа, и составляющий 0,005% (см., например, Bokulich, A. et al. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* 10: 57-59), что эквивалентно ≥ 2 прочтениям при глубине секвенирования, достигаемой для образцов при анализе в данном примере, Все таксономические определения и распределение клад выполнялись для каждой OTU согласно описанию в примерах 12. Итоговый перечень OTU, распределение клад и частота детекции в составах со спорами приведены в таблице GB. Указаны OTU, которые приживаются у получавших лечение пациентов, и процент пациентов, у которых они приживаются, а также клады, статус спорообразования и статус ключевых OTU. Отмеченные звездочкой OTU встречаются в $\geq 80\%$ обработанных этанолом составов и приживаются у $\geq 50\%$ получавших лечение пациентов.

Таблица GB. OTU, детектируемые по меньшей мере по 10 прочтениям последовательностей 16S-V4 по меньшей мере в одном обработанном этаноле составе со спорами (панмикробиом).

5

OTU	Клада	%	%	Спорооб	Ключев
-----	-------	---	---	---------	--------

10

15

20

25

30

35

40

45

		составов со спорами с OTU	Пациен тов с прижив ленным и OTU	разующи е	ые OTU
5					
10	Prevotella_maculosa	клада_10 4	10%	0%	НЕТ
15	Prevotella_copri	клада_16 8	20%	0%	НЕТ
20	Bacteroides_caccae	клада_17 0	30%	0%	НЕТ
25	Bifidobacterium_sp_TM_7*	клада_17 2	90%	60%	НЕТ
30	Bifidobacterium_gallicum	клада_17 2	70%	20%	НЕТ
35	Bifidobacterium_dentium	клада_17 2	50%	0%	НЕТ
40	Lactobacillus_casei	клада_19 8	20%	10%	НЕТ
45	Actinomyces_odontolyticus	клада_21 2	20%	30%	НЕТ
	Clostridium_colicanis	клада_22 3	10%	10%	ДА
	Clostridiales_sp_SS3_4*	клада_24 6	100%	70%	ДА
	Clostridium_sporogenes	клада_25 2	40%	40%	ДА

	Clostridium_butyricum	клада_25 2	20%	20%	ДА	НЕТ
5	Clostridium_disporicum	клада_25 3	40%	30%	ДА	НЕТ
10	Clostridium_hylemonae*	клада_26 0	100%	50%	ДА	НЕТ
	Clostridium_scindens	клада_26 0	10%	60%	ДА	НЕТ
15	Coprococcus_comes*	клада_26 2	90%	80%	ДА	ДА
20	Бактерия Lachnospiraceae_1_4_56FAA*	клада_26 2	90%	80%	ДА	ДА
	Ruminococcus_torques	клада_26 2	30%	70%	ДА	ДА
25	Parabacteroides_merdae	клада_28 6	30%	20%	НЕТ	ДА
30	Bifidobacterium_bifidum	клада_29 3	10%	0%	НЕТ	НЕТ
35	Johnsonella_ignava	клада_29 8	10%	10%	НЕТ	НЕТ
	Blautia_glucerasea*	клада_30 9	100%	80%	ДА	НЕТ
40	Blautia_sp_M25*	клада_30 9	100%	70%	ДА	ДА
45	Бактерия Lachnospiraceae_6_1_63FAA*	клада_30 9	100%	60%	ДА	НЕТ
	Eubacterium_cellulosolvens	клада_30	10%	30%	ДА	ДА

	9				
5	Lactobacillus_fermentum	клада_31 3	10%	0%	НЕТ
10	Sarcina_ventriculi	клада_35 3	10%	10%	ДА
	Clostridium_bartlettii*	клада_35 4	90%	70%	ДА
15	Clostridium_bifermentans	клада_35 4	70%	70%	ДА
20	Clostridium_mayombei	клада_35 4	50%	50%	ДА
	Dorea_longicatena*	клада_36 0	100%	60%	ДА
25	Бактерия Lachnospiraceae_9_1_43BFA A	клада_36 0	100%	30%	ДА
30	Бактерия Lachnospiraceae_2_1_58FAA*	клада_36 0	80%	80%	ДА
35	Бактерия Lachnospiraceae_2_1_46FAA	клада_36 0	50%	50%	ДА
	Lactobacillus_perolens	клада_37 3	10%	0%	НЕТ
40	Bacteroides_dorei	клада_37 8	60%	50%	НЕТ
	Eubacterium_biforme	клада_38 5	10%	0%	ДА
45	Peptoniphilus_sp_gpac077	клада_38	10%	20%	НЕТ

	9				
Coprococcus_catus*	клада_39 3	100%	70%	ДА	ДА
Eubacterium_hallii*	клада_39 6	90%	60%	ДА	ДА
Anaerosporobacter_mobilis	клада_39 6	40%	60%	ДА	НЕТ
Bacteroides_pectinophilus	клада_39 6	10%	60%	ДА	НЕТ
Lactobacillus_hominis	клада_39 8	10%	0%	НЕТ	НЕТ
Lactococcus_lactis	клада_40 1	40%	40%	НЕТ	НЕТ
Ruminococcus_champanellensis*	клада_40 6	80%	50%	ДА	НЕТ
Ruminococcus_callidus	клада_40 6	10%	10%	ДА	НЕТ
Clostridium_clostridioforme*	клада_40 8	100%	60%	ДА	ДА
Eubacterium_hadrum*	клада_40 8	100%	90%	ДА	ДА
Clostridium_symbiosum	клада_40 8	30%	50%	ДА	ДА
Anaerostipes_caccae	клада_40 8	10%	50%	ДА	НЕТ
Parasutterella_excrementihominis	клада_43 2	10%	0%	НЕТ	НЕТ

	<i>Sutterella_stercoricanis</i>	клада_43 2	10%	0%	НЕТ	НЕТ
5	<i>Eubacterium_rectale*</i>	клада_44 4	100%	80%	ДА	ДА
10	<i>Lachnobacterium_bovis*</i>	клада_44 4	100%	80%	ДА	НЕТ
	<i>Desulfovibrio_desulfuricans</i>	клада_44 5	10%	0%	НЕТ	ДА
15	<i>Eubacterium_sp_оральный клон_JS001*</i>	клада_47 6	80%	70%	ДА	НЕТ
20	<i>Faecalibacterium_prausnitzii*</i>	клада_47 8	100%	60%	ДА	ДА
	<i>Subdoligranulum_variabile*</i>	клада_47 8	100%	80%	ДА	ДА
25	<i>Coprobacillus_sp_D7*</i>	клада_48 1	90%	60%	ДА	НЕТ
30	<i>Clostridium_cocleatum</i>	клада_48 1	60%	20%	ДА	НЕТ
35	<i>Clostridium_spiroforme</i>	клада_48 1	40%	50%	ДА	НЕТ
	<i>Eubacterium_ramulus*</i>	клада_48 2	80%	60%	ДА	НЕТ
40	<i>Flavonifractor_plautii</i>	клада_49 4	70%	60%	ДА	ДА
45	<i>Pseudoflavonifractor_capillosu s</i>	клада_49 4	60%	60%	ДА	ДА
	<i>Ruminococcaceae_бактерия_D</i>	клада_49	30%	50%	ДА	ДА

16	4				
Acetivibrio_cellulolyticus*	клада_49 5	70%	80%	ДА	НЕТ
Clostridium_stercorarium	клада_49 5	40%	50%	ДА	НЕТ
Enterococcus_durans	клада_49 7	10%	10%	НЕТ	НЕТ
Enterococcus_faecium	клада_49 7	10%	10%	НЕТ	НЕТ
Dialister_invisus	клада_50 6	50%	10%	НЕТ	НЕТ
Eubacterium_limosum	клада_51 2	20%	0%	ДА	НЕТ
Ruminococcus_flavefaciens	клада_51 6	60%	60%	ДА	НЕТ
Eubacterium_ventriosum	клада_51 9	30%	60%	ДА	ДА
Bilophila_wadsworthia	клада_52 1	90%	0%	НЕТ	ДА
Lachnospira_pectinoschiza	клада_52 2	40%	60%	ДА	НЕТ
Eubacterium_eligens	клада_52 2	30%	50%	ДА	ДА
Catonella_morbi	клада_53 4	20%	0%	НЕТ	НЕТ
Clostridium_sporosphaeroides*	клада_53 7	100%	80%	ДА	НЕТ

	Ruminococcus_bromii	клада_53 7	60%	30%	ДА	ДА
5	Clostridium_leptum	клада_53 7	40%	70%	ДА	ДА
10	Clostridium_sp_YIT_12069	клада_53 7	40%	60%	ДА	НЕТ
	Clostridium_viride	клада_54 0	10%	10%	ДА	НЕТ
15	Megamonas_funiformis	клада_54 2	50%	0%	НЕТ	НЕТ
20	Eubacterium_ruminantium*	клада_54 3	80%	90%	ДА	НЕТ
	Coprococcus_eutactus	клада_54 3	20%	20%	ДА	НЕТ
25	Collinsella_aerofaciens	клада_55 3	50%	10%	ДА	ДА
30	Alkaliphilus_metalliredigenes	клада_55 4	40%	10%	ДА	НЕТ
35	Turicibacter_sanguinis	клада_55 5	80%	40%	ДА	НЕТ
	Phascolarctobacterium_faecium	клада_55 6	20%	0%	НЕТ	НЕТ
40	Clostridiales_бактерия_оральный клон_P4РА*	клада_55 8	80%	50%	НЕТ	НЕТ
45	Lutispora_thermophila	клада_56 4	100%	0%	ДА	НЕТ
	Coriobacteriaceae_бактерия_J	клада_56	70%	0%	НЕТ	НЕТ

C110	6				
Eggerthella_sp_1_3_56FAA	клада_56 6	70%	30%	НЕТ	НЕТ
Adlercreutzia_equolifaciens	клада_56 6	40%	0%	НЕТ	НЕТ
Gordonibacter_pamelaeae	клада_56 6	30%	0%	НЕТ	ДА
Slackia_isoflavoniconvertens	клада_56 6	10%	0%	НЕТ	НЕТ
Eubacterium_desmolans*	клада_57 2	90%	70%	ДА	НЕТ
Papillibacter_cinnamivorans*	клада_57 2	90%	80%	ДА	НЕТ
Clostridium_colinum	клада_57 6	30%	30%	ДА	НЕТ
Akkermansia_muciniphila	клада_58 3	60%	10%	НЕТ	ДА
Clostridiales_бактерия_оральный_таксон_F32	клада_58 4	60%	30%	НЕТ	НЕТ
Prochlorococcus_marinus	клада_59 2	30%	0%	НЕТ	НЕТ
Methanobrevibacter_wolinii	клада_59 5	30%	0%	НЕТ	НЕТ
Bacteroides_fragilis	клада_65	20%	30%	НЕТ	ДА
Lactobacillus_delbrueckii	клада_72	10%	0%	НЕТ	НЕТ
Escherichia_coli	клада_92	50%	0%	НЕТ	ДА

Clostridium_sp_D5	клада_96	80%	60%	ДА	НЕТ
Streptococcus_thermophilus	клада_98	90%	20%	НЕТ	ДА
Streptococcus_sp_CM6	клада_98	20%	10%	НЕТ	НЕТ
Streptococcus_sp_оральный клон_ASCE05	клада_98	10%	0%	НЕТ	НЕТ

[0383] Далее, был сделан вывод, что для признания OTU представителем коровой экогруппы состава со спорами необходимо подтверждение того, что указанная OTU приживается у пациента. Приживление имеет важное значение по двум причинам. Во-первых, приживление представляет собой обязательный элемент механизма восстановления микробиома и элиминации колонизации *C. difficile*. Приживающиеся с большей частотой OTU с высокой вероятностью являются компонентами коровой экогруппы состава со спорами. Во-вторых, OTU, детектированные посредством секвенирования состава со спорами (согласно таблице GB) могут включать нежизнеспособные споры или другие загрязняющие молекулы ДНК, не связанные со спорами. Требование подтвержденного приживления OTU у пациента позволяет устранить OTU, соответствующие нежизнеспособным спорам или загрязняющим последовательностям. В таблице GB также приведены все OTU, детектированные в составе со спорами, которые, как было показано, приживаются по меньшей мере у одного пациента после лечения. OTU, составляющие значительный процент в проанализированных обработанных этанолом составах со спорами, которые приживаются у большого числа пациентов, представляют собой подгруппу коровой экогруппы, с высокой вероятностью катализирующую сдвиг от дисбиотической экосистемы, характерной для болезненного состояния, к здоровому микробному.

[0384] Третий подход применяли для дополнительного исследования коровой экогруппы состава со спорами. Анализ систем на основе численных методов позволили описать экогруппы микроорганизмов, присутствующих в микробиоте значительной популяции здоровых индивидуумов. Указанные экогруппы составлены множеством OTU, некоторые которых определены как ключевые OTU. Ключевые OTU определяют численными методами согласно описанию в примере 30. Ключевые OTU образуют основу экогрупп микроорганизмов, в которых встречаются, и, соответственно, являются критически важными для функционирования системных экогрупп у здоровых субъектов. Ключевые OTU, связанные с экогруппами микроорганизмов, ассоциированных со здоровыми субъектами, часто отсутствуют или их численность понижена у субъектов с заболеванием. Ключевые OTU могут встречаться у субъектов с низкой, умеренной или высокой распространенностью. В таблице GB дополнительно отмечено, какие из OTU в составе со спорами являются ключевыми OTU, связанными исключительно со здоровыми индивидуумами, которые не являются носителями заболевания.

[0385] На основании указанных данных было сделано несколько важных выводов. Относительно незначительное число видов, всего 16, детектируются во всех составах со спорами от 6 доноров при 10 отборах донорских материалов. Эти результаты

являются неожиданными, поскольку в базе данных НМР (www.hmpdacc.org) описана огромная вариабельность комменсальных видов у здоровых индивидуумов. Присутствие незначительного числа стабильных OTU поддерживает концепцию коровой экосистемы. Данные о приживлении также подтверждают указанное заключение. Регрессионный анализ показывает значимую корреляцию между частотой детекции в составе со спорами и частотой приживления у донора: $R=0,43$ ($p<0,001$). Априорного условия, определяющего, что OTU, часто детектируемые в составе со спорами, необязательно должны или будут приживаться, не существует. Например, *Lutispora thermophila*, спорообразующий вид, обнаруживаемый во всех 10 составах со спорами, не приживается ни у одного пациента. *Bilophila wadsworthia*, грамотрицательный анаэроб, присутствует в 9 из 10 донорских материалов, и, тем не менее, не приживаются ни у одного пациента, что, предположительно, указывает на его присутствие в обработанном этанолом составе со спорами в качестве нежизнеспособной примеси. Наконец, следует отметить выраженное преобладание ранее определенных ключевых OTU среди наиболее часто встречающихся OTU в составах со спорами.

[0386] Указанные три фактора - преобладание в составе со спорами, частота приживления и определение как ключевой OTU - позволили разработать «показатель коровой экогруппы» (CES) для ранжирования индивидуальных OTU. CES определяли следующим образом:

- 40% множитель для присутствия OTU в составе со спорами
- коэффициент 1 для присутствия в 1-3 составах со спорами
- коэффициент 2,5 для присутствия в 4-8 составах со спорами
- коэффициент 5 для присутствия в ≥ 9 составах со спорами
- 40% множитель для приживления у пациента
- коэффициент 1 для приживления у 1-4 пациентов
- коэффициент 2,5 для приживления у 5-6 пациентов
- коэффициент 5 для приживления у ≥ 7 пациентов
- 20% множитель для ключевых OTU
- коэффициент 1 для ключевых OTU
- коэффициент 0 для неключевой OTU

[0387] При применении указанного руководства показатель CES имеет максимально возможное значение, равное 5 и минимальное возможное значение, равное 0,8. Например, OTU, обнаруживаемой в 8 из 10 составов со спорами, приживавшихся у 3 пациентов, и представляющей собой ключевую OTU, было бы присвоено следующее значение CES:

$$CES=(0,4 \times 2,5)+(0,4 \times 1)+(0,2 \times 1)=1,6$$

[0388] В таблице GC ранжированы по CES первые 20 OTU, при дополнительном условии продемонстрированного приживления OTU для того, чтобы OTU считалась коровым экологическим элементом.

Таблица GC. Первые 20 OTU, ранжированные по CES

OTU	Клада	CES	Спорооб- разователи	Ключевые OTU
Eubacterium_hadrum	клада_408	4,2	ДА	ДА
Eubacterium_rectale	клада_444	4,2	ДА	ДА
Subdoligranulum_variabile	клада_478	4,2	ДА	ДА
Blautia_sp_M25	клада_309	4,2	ДА	ДА
Coprococcus_catus	клада_393	4,2	ДА	ДА
Бактерия Lachnospiraceae_1_4_56FAA	клада_262	4,2	ДА	ДА

	Coprococcus_comes	клада_262	4,2	ДА	ДА
5	Blautia_glucerasea	клада_309	4,0	ДА	НЕТ
	Lachnobacterium_bovis	клада_444	4,0	ДА	НЕТ
	Clostridium_sporosphaeroides	клада_537	4,0	ДА	НЕТ
10	Clostridiales_sp_SS3_4	клада_246	4,0	ДА	НЕТ
	Papillibacter_cinnamivorans	клада_572	4,0	ДА	НЕТ
15	Clostridium_bartlettii	клада_354	4,0	ДА	НЕТ
	Eubacterium_desmolans	клада_572	4,0	ДА	НЕТ
	Clostridium_clostridioforme	клада_408	3,2	ДА	ДА
20	Dorea_longicatena	клада_360	3,2	ДА	ДА
	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	3,2	ДА	ДА
25	Eubacterium_hallii	клада_396	3,2	ДА	ДА
	Clostridium_leptum	клада_537	3,2	ДА	ДА
30	Бактерия Lachnospiraceae_6_1_63FAA	клада_309	3,0	ДА	НЕТ

Пример 32. Определение эффективных коровых экологических подгрупп

[0389] Количество организмов желудочно-кишечном тракте человека, а также

35 различия разнообразия между здоровыми индивидуумами, указывают на функциональную избыточность экогруппы микробиома здорового кишечника (см. The Human Microbiome Consortia. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486: 207-214). Указанная избыточность с высокой вероятностью означает, что коровые экологические подгруппы описывают терапевтически

40 благоприятные компоненты обработанного этанолом состава со спорами, и что такие подгруппы могут сами по себе представлять полезные композиции для лечения инфекции C. difficile при условии наличия функциональных характеристик экогруппы. Используя CES, можно установить приоритет индивидуальных OTU при оценке эффективности в качестве коровой экологической подгруппы.

45 [0390] Другой аспект функциональной избыточности заключается в том, что эволюционно родственные организмы (т.е. близко расположенные на филогенетическом дереве, например, сгруппированные в одну кладу) также будут представлять собой эффективные заместители в коровой экогруппе или ее подгруппе при лечении C. difficile.

[0391] Для специалиста в данной области техники выбор подходящих подгрупп OTU для тестирования *in vitro* (см., например, пример 33 ниже) или *in vivo* (см., например, примеры 16 или 17) является простым. Подгруппы могут быть отобраны путем выделения любых 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10 OTU из таблицы GB, в частности, с фокусом на OTU, имеющих более высокие CES, например, OTU, приведенных в таблице GC. Кроме того, используя информацию о взаимосвязях между кладами согласно примеру 12 и таблице 1 выше, можно подобрать родственные OTU для замещения OTU с приемлемыми значениями CES. Указанные организмы могут культивироваться в анаэробных условиях *in vitro* с применением подходящих сред (выбранных из описанных в примере 14 выше), а затем скомбинированы в требуемой пропорции. В типовом эксперименте в модели с *C. difficile* на мышах используется по меньшей мере 10^4 и предпочтительно по меньшей мере 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или более чем 10^9 колониеобразующих единиц каждого микроорганизма из композиции. Вариации продуктивности культуры иногда могут означать, что организмы сочетаются в неравных пропорциях, например, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, или более 1:100000. При этом важно, чтобы в указанных композициях каждый штамм присутствовал в минимально достаточном количестве для того, чтобы можно было измерить вклад указанного штамма в эффективность коровой экологической подгруппы. Используя принципы и инструкции, приведенные в настоящем документе, специалист в данной области техники сможет легко определить на основании клад заместителей для тестирования эффективности подгрупп коровой экосистемы. В таблице GB представлены клад для всех OTU, детектированных в составе со спорами, а в таблице 1 представлены OTU, которые могут быть использованы в качестве заместителей на основании взаимосвязей клад.

Пример 33. Тестирование коровых экологических подгрупп в модели на мышах

[0392] Ряд коровых экологических подгрупп был протестирован в модели на мышах с *C. difficile*. Отрицательный контроль представлял собой забуференный фосфатом солевой раствор, а положительный контроль представлял собой 10% суспензию фекалий человека. Указанные подгруппы описаны в таблице GD.

Таблица GD: Коровые экологические подгруппы, протестированные в модели с *C. difficile* на мышах

5	Подгруппа	OTU	Замена OTU в таблице 1 (Клада)
	Подгруппа 1	<i>Collinsella aerofaciens</i>	нет (Клада_553)
10		<i>Clostridium tertium</i>	<i>C. sporogenes</i> (Клада_252)
		<i>Clostridium disporicum</i>	нет (Клада_253)
15		<i>Clostridium innocuum</i>	<i>Clostridium_sp_HGF2</i> (Клада_351)
		<i>Clostridium mayombei</i>	нет (Клада_354)
20		<i>Clostridium butyricum</i>	нет (Клада_252)
		<i>Coprococcus comes</i>	нет (Клада_262)
		<i>Clostridium hylemonae</i>	нет (Клада_260)
25		<i>Clostridium bolteae</i>	<i>E. hadrum</i> (Клада_408)
		<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>C. clostridioforme</i> (Клада_408)
30		<i>Clostridium orbiscindens</i>	<i>R. бактерия_D16</i> (Клада_494)
		Бактерия <i>Lachnospiraceae_5_1_57FAA</i>	<i>C. scindens</i> (Клада_260)
35		<i>Blautia producta</i>	<i>Blautia_sp_M25</i> (Клада_309)
		<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>D. longicatena</i> (Клада_360)
40		<i>Ruminococcus bromii</i>	нет (Клада_537)
	Подгруппа 2	<i>Collinsella aerofaciens</i>	нет (Клада_553)

	<i>Clostridium butyricum</i>	нет (Клада_252)
	<i>Clostridium hylemonae</i>	нет (Клада_260)
	<i>Blautia producta</i>	<i>Blautia_sp_M25</i> (Клада_309)
Подгруппа 3	<i>Collinsella aerofaciens</i>	нет (Клада_553)
	<i>Clostridium innocuum</i>	<i>Clostridium_sp_HGF2</i> (Клада_351)
	<i>Coprococcus comes</i>	нет (Клада_262)
	<i>Ruminococcus bromii</i>	нет (Клада_537)
Подгруппа 4	<i>Clostridium butyricum</i>	нет (Клада_252)
	<i>Clostridium hylemonae</i>	нет (Клада_260)
	<i>Blautia producta</i>	<i>Blautia_sp_M25</i> (Клада_309)
Подгруппа 5	<i>Clostridium butyricum</i>	нет (Клада_252)
	<i>Clostridium hylemonae</i>	нет (Клада_260)
Подгруппа 6	<i>Blautia producta</i>	<i>Blautia_sp_M25</i> (Клада_309)
	<i>Clostridium butyricum</i>	нет (Клада_252)
Подгруппа 7	<i>Clostridium orbiscindens</i>	<i>R._бактерия_D16</i> (Клада_494)
	Бактерия <i>Lachnospiraceae_5_1_57FAA</i>	<i>C. scindens</i> (Клада_260)
	<i>Eubacterium rectale</i>	нет (Клада_444)

[0393] Две клетки по 5 мышей в каждой использовали для тестирования для каждой группы эксперимента. Все мыши получали коктейль антибиотиков, состоящий из 10% глюкозы, канамицина (0,5 мг/мл), гентамицина (0,044 мг/мл), колистина (1062,5 ед/мл), метронидазола (0,269 мг/мл), ципрофлоксацина (0,156 мг/мл), ампициллина (0,1 мг/мл) и ванкомицина (0,056 мг/мл) в питьевой воде с -14 по -5 день включительно, и дозу 10 мг/кг клиндамицина через оральный зонд на -3 день. На день -1 они получали либо тестируемые составы, либо контрольные продукты через оральный зонд. На 0 день их стимулировали введением приблизительно $4,5 \log_{10}$ КОЕ *C. difficile* (ATCC 43255) через оральный зонд. Смертность оценивали каждый день с 0 по 6 день; оценивали массу

тела и последующее изменение массы тела у животного, при этом снижение массы тела считали связанным с инфекцией *C. difficile*. Смертность и уменьшение снижения массы тела при применении тестируемого состава по сравнению с пустой основой использовали для оценки успешности применения тестируемого состава. Кроме того, ежедневно проводили оценку симптомов *C. difficile* от -1 дня до 6 дня включительно. Оценку симптомов проводили на основании внешнего вида (0-2 пункта на основании нормального вида, сторбленности, пилоэрекции или летаргического состояния), дыхания (0-2 пункта на основании нормального, быстрого или поверхностного дыхания, с диафрагмальным дыханием), клинических признаков (0-2 пункта на основании нормального внешнего вида, мокрого хвоста, пониженной на ощупь температуры или изоляции от других животных).

[0394] Помимо определения кумулятивной смертности для каждой группы рассчитывают среднюю минимальную относительную массу тела как среднее значение минимальной массы тела каждой мыши относительно дня -1, и средний максимальный клинический показатель как среднее значение максимального комбинированного клинического показателя каждой мыши с присвоением значения 4 в случае смерти. Результаты представлены в таблице GE.

Таблица GE: Результаты для бактериальных композиций, протестированных в а *C. difficile* модель на мышах.

Группа	Доза	Кумулятивная смертность (%)	Средняя минимальная относительная масса тела	Средний максимальный клинический показатель (Смерть = 4)
Контроль-носитель	-	40	0,87	2,8
Контрольные экскременты	5,8e8 КОЕ всего	0	0,99	0

Подгруппа 1	1e8 КОЕ/ОТУ	0	0,98	0
Подгруппа 2	1e8 КОЕ/ОТУ	10	0,84	2,1
Подгруппа 3	1e8 КОЕ/ОТУ	10	0,84	2,2
Подгруппа 4	1e8 КОЕ/ОТУ	0	0,87	2
Подгруппа 5	1e8 КОЕ/ОТУ	20	0,91	1,7
Подгруппа 6	1e8 КОЕ/ОТУ	40	0,82	2,8
Подгруппа 7	1e8 КОЕ/ОТУ	0	0,90	1

Пример 34. Определение коровых экологических подгрупп в анализе ингибирования *C. difficile* in vitro

[0395] Флаконы с банкированным глицериновым основным раствором, хранящиеся при температуре -80°C, размораживали и разводили до 1e8 КОЕ/мл. Выбранные штаммы и принадлежность их клад приведены в таблице GF. Каждый штамм затем разводили 10х (до конечной концентрации 1e7 КОЕ/мл каждого штамма) в 200 мкл ФСБ + 15% глицерина в лунках 96-луночного планшета. Затем планшеты замораживали при -80°C. Перед проведением анализа планшеты извлекали из среды с температурой -80°C и размораживали при комнатной температуре в анаэробных условиях для тестирования в анализе ингибирования *C. difficile* in vitro (CivSim).

[0396] Ночную культуру *Clostridium difficile* культивируют в анаэробных условиях на SweetB-FosIn или другой подходящей среде для роста *C. difficile*. SweetB-FosIn представляет собой комплексную среду, состоящую из сердечно-мозгового бульона, дрожжевого экстракта, цистеина, целлюлозы, мальтозы, растворимого крахмала, фруктоолигосахаридов/инулина и гемина, и его забуферивают MOPS. Через 24 ч роста культуру разбавляют 100000-кратно комплексной средой, такой как SweetB-FosIn, которая подходит для роста широкого спектра анаэробных бактериальных видов. Аликвоты разведенной смеси *C. difficile* переносят в лунки 96-луночного планшета (180 мкл в каждую лунку). Затем добавляют 20 мкл подгруппы коровой экосистемы в каждую лунку в конечной концентрации 1e6 КОЕ/мл каждого вида. Как вариант, каждый вид может тестироваться в анализе при разных начальных концентрациях (1e9 КОЕ/мл, 1e8 КОЕ/мл, 1e7 КОЕ/мл, 1e5 КОЕ/мл, 1e4 КОЕ/мл, 1e3 КОЕ/мл, 1e2 КОЕ/мл). Контрольные лунки, инокулированные только *C. difficile*, включены для сравнения с ростом *C. difficile* без ингибирования. Дополнительные лунки используют для контролей, которые либо ингибируют, либо не ингибируют рост *C. difficile*. Одним из примеров положительного контроля, который ингибирует рост, является комбинация *Blautia producta*, *Clostridium bifermentans* и *Escherichia coli*. Одним из примеров контроля, демонстрирующего пониженное ингибирование роста *C. difficile*, является комбинация *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus* и *Bacteroides vulgatus*. Планшеты заворачивают в парафильм и инкубируют в течение 24 ч при 37°C в анаэробных условиях. Через 24 ч. проводят серийные разведения содержимого лунок, содержащих только *C. difficile*, и высевают для определения титра. 96-луночный планшет замораживают при -80°C до количественного определения *C. difficile* с применением

анализа кПЦР.

[0397] Строят стандартную кривую на основе лунки из каждого аналитического планшета, содержащей только патогенный *C. difficile*, культивированный на среде SweetB + FosIn, и количественно определенный с применением селективного посева
5 бляшкой. Серийные разведения культуры выполняют в стерильном забуференном фосфатом солевом растворе. Геномную ДНК экстрагируют из образцов, использованных для стандартной кривой, наряду с другими лунками.

[0398] Геномную ДНК экстрагируют из 5 мкл каждого образца с использованием протокола разведения, замораживания/оттаивания и термического лизиса. 5 мкл
10 размороженных образцов добавляют в 45 мкл ультрачистой воды (UltraPure, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) и перемешивают пипетированием. Планшеты с разведенными образцами замораживают при -20°C до использования для кПЦР, которая включает этап термического лизиса перед амплификацией. Как вариант, геномную ДНК выделяют с применением набора для выделения ДНК Mo Bio Powersoil®-htp 96
15 Well Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния), набора для выделения ДНК Mo Bio Powersoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, Калифорния) или мининабора для выделения ДНК из стула QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Валенсия, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя.

[0399] Реакционная смесь для кПЦР содержит 1× универсальных зондов SsoAdvanced
20 Universal Probes Supermix, 900 нМ праймер Wt-tcdB-F (AGCAGTTGAATATAGTGGTTT AGTTAGAGTTG, IDT, Коралвилль, Айова), 900 нМ праймер Wt-tcdB-R (CATGCTTTTTTAGTTTCTGGATTGAA, IDT, Коралвилль, Айова), 250 нМ зонд Wt-tcdB-P (6FAM-CATCCAGTCTCAATTGTATATGTTTCTCCA-MGB, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) и воду для молекулярно-биологических целей (Mo Bio
25 Laboratories, Карлсбад, Калифорния), до 18 мкл (модифицированные праймеры по: Wroblewski, D. et al., Rapid Molecular Characterization of Clostridium difficile and Assessment of Populations of *C. difficile* in Stool Specimens, Journal of Clinical Microbiology 47:2142-2148 (2009)). Аликвоты указанной реакционной смеси распределяют в лунки 96-луночного
30 твердого тонкостенного низкопрофильного планшета для ПЦР с «юбкой» (BioRad, Геркулес, Калифорния). К указанной реакционной смеси добавляют 2 мкл разведенных, замороженных и размороженных образцов и планшет запечатывают герметизирующим материалом Microseal 'B' (BioRad, Геркулес, Калифорния). кПЦР выполняют на термоциклере BioRad C1000™, оборудованном системой реального времени CFX96™
35 Real-Time System (BioRad, Геркулес, Калифорния). Используют следующие условия термоциклирования: 95°C в течение 15 минут с последующим 45 циклами при 95°C по 5 секунд, 60°C по 30 секунд; флуоресценцию регистрируют в канале FAM. Как вариант, кПЦР выполняют другими стандартными способами, известными специалистам в данной области техники.

[0400] Значение Cq для каждой лунки в канале FAM определяют с помощью ПО CFX
40 Manager™ 3.0. $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ *C. difficile* для каждого экспериментального образца рассчитывают подстановкой значения Cq для определенного образца в линейную регрессионную модель, установленную по стандартной кривой, сравнивающей значения Cq для лунок стандартной кривой с известными $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ для указанных образцов.
45 Логарифмизированное ингибирование рассчитывают для каждого образца путем вычитания $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ *C. difficile* в образце из $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ *C. difficile* в образце на каждом аналитическом планшете, использованном для получения стандартной кривой, куда не добавлялись дополнительные бактерии. Среднее логарифмизированное

ингибирование рассчитывают для всех повторностей для каждой композиции.

[0401] Строят гистограммы размаха и стандартного отклонения для каждой композиции. Значения размаха или стандартные отклонения логарифмизированного ингибирования, которые отклоняются от общего распределения, исследуют как вероятные выбросы. Если удаление одной точки данных логарифмизированного ингибирования из одной из бинарных пар, идентифицированных на гистограммах, приводит к согласованности размаха или стандартного отклонения со значениями для большинства образцов, указанную точку данных удаляют как выброс и производят перерасчет среднего логарифмизированного значения ингибирования.

[0402] Объединенную дисперсию для всех образцов, оцениваемых в анализе, определяют как среднее взвешенное значение дисперсий образцов с учетом числа степеней свободы образцов. Затем рассчитывают объединенную стандартную ошибку как квадратный корень объединенной дисперсии, разделенный на квадратный корень числа образцов. Доверительные интервалы для нулевой гипотезы определяют, умножая объединенную стандартную ошибку на z-показатель, соответствующий определенному процентному порогу. Средние логарифмизированные значения ингибирования за пределами доверительного интервала считают ингибирующими при положительных значениях, или стимулирующими при отрицательных значениях, при проценте достоверности, соответствующем используемому интервалу. Тройные комбинации со средним логарифмизированным значением ингибирования более чем 0,312 регистрируют как ++++ ($\geq 99\%$ доверительный интервал (ДИ) для нулевой гипотезы), со средним логарифмизированным значением ингибирования от 0,221 до 0,312 как +++ ($95\% < \text{ДИ} < 99\%$), со средним логарифмизированным значением ингибирования от 0,171 до 0,221 как ++ ($90\% < \text{ДИ} < 95\%$), со средним логарифмизированным значением ингибирования от 0,113 до 0,171 как + ($80\% < \text{ДИ} < 90\%$), со средним логарифмизированным значением ингибирования от -0,113 и -0,171 как - ($80\% < \text{ДИ} < 90\%$), со средним логарифмизированным значением ингибирования от -0,171 до -0,221 как -- ($90\% < \text{ДИ} < 95\%$), со средним логарифмизированным значением ингибирования от -0,221 до -0,312 как --- ($95\% < \text{ДИ} < 99\%$) и со средним логарифмизированным значением ингибирования менее -0,312 как ---- ($99\% < \text{ДИ}$).

Таблица GF. OTU и принадлежность их клад, протестированные в тройных комбинациях, с результатами анализа ингибирования in vitro

OTU1	Клада 1	OTU2	Клада 2	OTU3	Клада 3	Результаты
Clostridium_bolteae	клада_408	Blautia_producta	клада_309	Eubacterium_rectale	клада_444	++++
Clostridium_bolteae	клада_408	Clostridium_symbio sum	клада_408	Blautia_producta	клада_309	++++
Clostridium_bolteae	клада_408	Clostridium_symbio sum	клада_408	Eubacterium_rectale	клада_444	-

	Clostridium_bolteae	клада_408	Clostridium_symbio sum	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	-
5	Clostridium_bolteae	клада_408	Clostridium_symbio sum	клада_408	Бактерия Lachnospiraceae_5_ 1_57FAA	клада_260	
10	Clostridium_bolteae	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Blautia_producta	клада_309	++++
15	Clostridium_bolteae	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Eubacterium_rectale	клада_444	
20	Clostridium_bolteae	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Бактерия Lachnospiraceae_5_ 1_57FAA	клада_260	++++
25	Clostridium_bolteae	клада_408	Бактерия Lachnospiraceae_5_ 1_57FAA	клада_260	Blautia_producta	клада_309	++++
30	Clostridium_bolteae	клада_408	Бактерия Lachnospiraceae_5_ 1_57FAA	клада_260	Eubacterium_rectale	клада_444	+
35	Clostridium_symbio sum	клада_408	Blautia_producta	клада_309	Eubacterium_rectale	клада_444	++++
	Clostridium_symbio sum	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Blautia_producta	клада_309	++++
	Clostridium_symbio sum	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Eubacterium_rectale	клада_444	
40	Clostridium_symbio sum	клада_408	Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Бактерия Lachnospiraceae_5_ 1_57FAA	клада_260	+
45	Clostridium_symbio	клада_408	Бактерия	клада_478	Blautia_producta	клада_444	++++

	sum	408	Lachnospiraceae_5_1_57FAA	260		309	
5	Clostridium_symbiosum	клада_408	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Eubacterium_rectale	клада_444	
10	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Blautia_producta	клада_309	Eubacterium_rectale	клада_444	++++
15	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_bolteae	клада_408	Blautia_producta	клада_309	++++
	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_bolteae	клада_408	Clostridium_symbiosum	клада_408	++++
20	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_bolteae	клада_408	Eubacterium_rectale	клада_444	++++
25	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_bolteae	клада_408	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	++++
	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_bolteae	клада_408	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	++++
30	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_symbiosum	клада_408	Blautia_producta	клада_309	++++
35	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_symbiosum	клада_408	Eubacterium_rectale	клада_444	
	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_symbiosum	клада_408	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	
40	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Clostridium_symbiosum	клада_408	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	+

	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Coprococcus_comes	клада_262	Blautia_producta	клада_309	++++
5	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Coprococcus_comes	клада_262	Clostridium_bolteae	клада_408	++++
10	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Coprococcus_comes	клада_262	Clostridium_symbiosum	клада_408	+++
	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Coprococcus_comes	клада_262	Eubacterium_rectale	клада_444	+++
15	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Coprococcus_comes	клада_262	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	++++
20	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Coprococcus_comes	клада_262	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	+++
25	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	Blautia_producta	клада_309	++++
	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	Eubacterium_rectale	клада_444	+++
30	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Faecalibacterium_prausnitzii	клада_478	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	+++
35	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Blautia_producta	клада_309	++++
40	Collinsella_aerofaciens	клада_553	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Eubacterium_rectale	клада_444	++++
45	Coprococcus_comes	клада_262	Blautia_producta	клада_309	Eubacterium_rectale	клада_444	++++

	клада_		клада_		клада_	
Coprococcus_comes	262	Clostridium_bolteae	408	Blautia_producta	309	++++
	клада_		клада_	Clostridium_symbio	клада_	
Coprococcus_comes	262	Clostridium_bolteae	408	sum	408	
	клада_		клада_		клада_	
Coprococcus_comes	262	Clostridium_bolteae	408	Eubacterium_rectale	444	-
	клада_		клада_	Faecalibacterium_pr	клада_	
Coprococcus_comes	262	Clostridium_bolteae	408	ausnitzii	478	+++
	клада_		клада_	Бактерия		
Coprococcus_comes	262	Clostridium_bolteae	408	Lachnospiraceae_5_	клада_	
	262		408	1_57FAA	260	+++
	клада_	Clostridium_symbio	клада_		клада_	
Coprococcus_comes	262	sum	408	Blautia_producta	309	++++
	клада_	Clostridium_symbio	клада_		клада_	
Coprococcus_comes	262	sum	408	Eubacterium_rectale	444	- -
	клада_	Clostridium_symbio	клада_	Faecalibacterium_pr	клада_	
Coprococcus_comes	262	sum	408	ausnitzii	478	
	клада_	Clostridium_symbio	клада_	Бактерия		
Coprococcus_comes	262	sum	408	Lachnospiraceae_5_	клада_	
	262		408	1_57FAA	260	
	клада_	Faecalibacterium_pr	клада_		клада_	
Coprococcus_comes	262	ausnitzii	478	Blautia_producta	309	++++
	клада_	Faecalibacterium_pr	клада_		клада_	
Coprococcus_comes	262	ausnitzii	478	Eubacterium_rectale	444	-
	клада_			Бактерия		
Coprococcus_comes	262	Faecalibacterium_pr	клада_	Lachnospiraceae_5_	клада_	
	262	ausnitzii	478	1_57FAA	260	

5

10

15

20

25

Coprococcus_comes	клада_262	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Blautia_producta	клада_309	++++
Coprococcus_comes	клада_262	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Eubacterium_rectale	клада_444	
Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Blautia_producta	клада_309	Eubacterium_rectale	клада_444	++++
Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Blautia_producta	клада_309	++++
Faecalibacterium_pr ausnitzii	клада_478	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Eubacterium_rectale	клада_444	
Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260	Blautia_producta	клада_309	Eubacterium_rectale	клада_444	++++

30

35

40

[0403] Анализ CivSim показывает, что многие тройные комбинации ингибируют *C. difficile*. 39 из 56 комбинаций демонстрировали ингибирование с доверительным интервалом >80%; 36 из 56 с ДИ>90%; 36 из 56 с ДИ>95%; 29 из 56 с ДИ>99%.

Неограничивающие примеры тройных комбинаций включают комбинации со средним логарифмизированным снижением более чем на 0,171, например, любую комбинацию из приведенных в таблице 6 с показателем +++++, например, *Colinsella aerofaciens*, *Coprococcus comes* и *Blautia producta*. Что не менее важно, анализ CivSim описывает тройные комбинации, эффективно не ингибирующие *C. difficile*. 5 из 56 комбинаций способствуют росту с достоверностью >80%; 2 из 56 способствуют росту с достоверностью >90%; 1 из 56, *Coprococcus comes*, *Clostridium symbiosum* и *Eubacterium rectale*, способствуют росту с достоверностью >95%. 12 из 56 комбинаций нейтральны по оценке в указанном анализе, что означает, что они не способствуют росту и не ингибируют рост *C. difficile* в измеряемых пределах.

[0404] Для специалиста в данной области техники очевидна возможность использования метода CivSim для определения эффективных подгрупп коровой экосистемы, полученных из обработанной этанолом споровой фракции и продемонстрировавших эффективность для лечения от *C. difficile* у человека.

45

Пример AAZA: Бактериальные композиции, заселяющие ЖКТ в модели на мышах.

[0405] В модели на мышах оценивали способность двух бактериальных композиций заселять желудочно-кишечный тракт. Бактерии культивировали согласно описанию в ***примере 14. Композиции предварительно получали в анаэробных условиях и

суспендировали в ФСБ + 15% глицерина и хранили при $\geq -70^{\circ}\text{C}$ до использования.

[0406] Группы мышей (10 самок/группу; 5 на клетку) получали предварительное лечение на -14 - -5 дни коктейлем антибиотиков, состоящим из 10% глюкозы, канамицина (0,5 мг/мл), гентимицина (0,044 мг/мл), колистина (1062,5 ед/мл), метронидазола (0,269 мг/мл), ципрофлоксацина (0,156 мг/мл), ампициллина (0,1 мг/мл) и ванкомицина (0,056 мг/мл) в питьевой воде. На -3 день они получали 10 мг/кг клиндамицина через оральный зонд. На день -1 их дозировали композициями с микроорганизмами через оральный зонд и объеме 0,2 мл (таблица ZA). Композиции с микроорганизмами содержали приблизительно равные количества каждой OTU и вводились в дозах приблизительно 1×10^9 , 1×10^8 и 1×10^7 на OTU для каждой композиции (например, композицию с микроорганизмами 1, содержащую 15 штаммов, вводили в дозах приблизительно 1×10^{10} , $1,5 \times 10^9$ и $1,5 \times 10^8$ общих КОЕ). Образцы фекалий собирали из каждой клетки на -1 день (приблизительно за 1 час до дозирования) и на 2, 3 и 4 дни после дозирования.

Экскременты хранили в замороженном виде до обработки и секвенирования. Изменения массы тела мышей, получавших лечение любыми композициями с микроорганизмами, были аналогичны наблюдаемым у нестимулированных контрольных мышей.

[0407] Параллельно группы животных, получавших лечение теми же композициями с микроорганизмами на день -1, стимулировали на 0 день приблизительно $10^{4,5}$ споры *Clostridium difficile* (ATCC 43255) через оральный зонд. Смертность стимулированных *C. difficile* животных оценивали каждый день с дня 0 до дня 6; оценивали массу тела и последующее изменение массы тела у животного, считая снижение массы тела связанным с инфекцией *C. difficile*. Понижение смертности и снижения массы тела при применении тестируемого состава по сравнению с пустой основой использовали для оценки успешности применения тестируемого состава.

Таблица ZA. Композиции с микроорганизмами, введенная через оральный зонд на день -1

	OTU	Клада
Композиция с микроорганизмами 1	Clostridium_butyricum	клада_252
	Clostridium_disporicum	клада_253
	Clostridium_hylemonae	клада_260
	Clostridium_orbiscindens	клада_494
	Clostridium_symbiosum	клада_408
	Collinsella_aerofaciens	клада_553
	Coprococcus_comes	клада_262
	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260
	Ruminococcus_bromii	клада_537
	Blautia_producta	клада_309
	Clostridium_bolteae	клада_408
	Clostridium_innocuum	клада_351
	Clostridium_mayombei	клада_354

5	Clostridium_tertium	клада_252
	Ruminococcus_gnavus	клада_360
10		
15	Композиция с микроорганизмами 2 Clostridium_disporicum	клада_253
	Clostridium_orbiscindens	клада_494
20	Clostridium_symbiosum	клада_408
	Collinsella_aerofaciens	клада_553
25	Eubacterium_rectale	клада_444
30	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA	клада_260
	Blautia_producta	клада_309
35	Clostridium_innocuum	клада_351
40	Clostridium_mayombei	клада_354

[0408] Образцы фекалий обрабатывали путем выделения и секвенирования ДНК в соответствии с ***примерами 11 и 12. Определение принадлежности OTU из образцов фекалий дней -1, 2, 3 и 4 проводили путем анализа прочтений последовательностей 16S-V4 и распределения OTU согласно описанию в ***примере 11. Клады распределяли согласно описанию в ***примере 11. Общее число прочтений определяли для каждой OTU или каждой клады путем суммирования результатов для клеток одной экспериментальной группы. Образцы с 10 или менее прочтениями последовательностей для определенной OTU или клады считали соответствующими уровню ниже фонового

и не включали в процесс суммирования. Результаты представлены по OTU (Таблица ТАВ) и по кладам (Таблица ТАС).

Таблица ТАВ. Популяция OTU на дни 2, 3 и 4 после дозирования композициями с микроорганизмами

	1×10 ⁹ на OTU				1×10 ⁸ на OTU				1×10 ⁷ на OTU				
Композиция микроорганизмами 1	-1	2	3	4	-	1	2	3	4	-1	2	3	4
Cl_butyricum	0	106	51	32	0	10	0	0	34	19 5	0	0	0
Cl_disporicum	1 0	1746	1190	887	0	1746	769	0	101 1	20 1	1117 5	153 1	115 2
Cl_hylemonae	0	258	258	84	0	203	164	0	77	0	265	214	90
Cl_orbiscindens	0	188	192	471	0	188	138	0	276	0	221	174	341
Cl_symbiosum	0	485	482	486	0	444	379	0	447	0	562	427	775
Co_aerofaciens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C_comes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L_бактерия_5_1_57FA A	0	341	336	354	0	351	182	0	356	0	256	240	300
R_bromii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B_producta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl_bolteae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cl_innocuum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl_mayombei	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl_tertium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R_gnavus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Композиция с микроорганизмами 2	-1	2	3	4	-1	2	3	4	-1	2	3	4
Cl_disporicum	2	1181	1094	1467	1134	1397	394		1199	700	626	
	9	0	8	2	0	9	8	2	0	5	5	8
Cl_orbiscindens	0	510	408	764	0	332	545	544	0	310	319	432
Cl_symbiosum	0	559	508	375	0	665	494	450	0	396	639	650
Co_aerofaciens	0	0	0	0	0	0	1172	0	0	0	247	0
E_rectale	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	261
L_бактерия_5_1_57FA A	0	972	801	596	0	860	962	844	0	636	1	9
B_producta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl_innocuum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cl_mayombei	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица ТАС. Популяция клад на дни 2, 3 и 4 после дозирования композициями с микроорганизмами

Композиция с микроорганизмом и 1	1×10 ⁹ на OTU				1×10 ⁸ на OTU				1×10 ⁷ на OTU			
	-1	2	3	4	-1	2	3	4	-1	2	3	4
клада_252	0	444	252	87	0	198	122	125	20 9	394	231	88
клада_253	10	1746	1190	887	0	1746	769	1011	20 1	1117 5	1531	1152
клада_260	0	599	594	438	0	554	346	433	0	521	454	390
клада_262	0	14	151	51	0	0	0	0	0	12	21	57
клада_309	0	1109 3	9750	4023	0	9991	5208	5145	19	9311	6369	4951
клада_351	0	1064 9064	7	7751	0	6528	7259	8213	0	8903	1004 9	8701
клада_354	0	0	0	0	0	0	0	31	17 3	0	0	0
клада_360	0	1430 0	1022	1103 6	0	1255 3	1298 9	6889	0	9308	1348 3	9292
клада_408	13	1298 8892	1210 5	2 1	3	3952	7260	1065 2	43	4079	1492 8581	9
клада_494	0	226	227	565	0	188	184	411	0	221	200	351
клада_537	0	0	68	225	0	0	0	0	0	0	0	55
клада_553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Композиция с микроорганизмам и 2												
	-1	2	3	4	-1	2	3	4	-1	2	3	4
клада_253	29	0	8	2	0	9	8	3942	0	5	7005	6268
клада_260	0	1125	1312	854	0	1049	1295	1250	0	792	2121	1637
клада_309	54	3	1	7849	0	0	4	2	0	7407	1	8
клада_351	0	7651	9939	5936	0	8495	9724	9207	0	6005	9833	7655
клада_354	14	0	127	429	0	0	0	39	12	0	0	0
клада_408	18	2242	4989	0	2	1688	5580	3789	0	1068	1561	6281
клада_444	41	0	49	202	0	18	0	12	0	14	82	1578
клада_494	0	510	465	1054	0	332	565	596	0	310	319	476
клада_553	0	0	0	0	0	0	1172	0	0	0	247	0

[0409] При изучении данных по OTU в таблице ТАВ обнаруживается несколько паттернов. Во-первых, наблюдается группа OTU без прочтений последовательностей на -1 день, демонстрирующая впоследствии значительное число прочтений последовательностей на 2, 3 или 4 день; указанная группа включает *Cl. butyricum*, *Cl. hylemonae*, *Cl. orbiscindens*, *Cl. symbiosum*, и бактерию *L._5_1_57FAA*. Данные для *Cl. disporicum* сопоставимы с указанной группой, поскольку для нее число прочтений последовательностей на -1 день очень близко к фоновому (10 и 29 в композициях 1 и 2, соответственно), но затем оно возрастает до 1000-кратного на 2, 3 или 4 день. Во-вторых, наблюдаются OTU, например, *Co. aerofaciens*, *C. comes*, *R. bromii*, *B. producta*, *Cl. bultae*, *Cl. mayombe*, *Cl. innocuum*, *Cl. tertium* и *R. gnavus*, которые не детектируются на уровне OTU ни в образце -1 дня, ни в последующих образцах. В композиции 2 *Co. aerofaciens* детектируют временно на 2 день в группах, получавших дозы 1×10^8 и 1×10^7 ; *E. rectale* в той же экспериментальной группе детектируют на 3 день, что указывает на возможное наличие взаимосвязи между временным заселением *Co. aerofaciens* и последующим заселением *E. rectale* в указанных группах мышей. Неожиданное наблюдение заключается в том, что наблюдаемое число прочтений последовательностей OTU не является в большой степени дозозависимым. В целом, указанные данные согласуются с моделью, согласно которой происходит быстрое заселение OTU после перорального введения.

[0410] Основанный на кладах анализ в таблице ТАС выполняли для более тщательной оценки популяции в ЖКТ. Основанный на кладах анализ не выявляет некоторые детали, которые позволяет обнаружить анализ OTU. Например, *Cl. tertium* и *Cl. butyricum* являются представителями одной и той же клады, и, соответственно, основанный на кладах анализ не позволяет различить динамику указанных индивидуальных OTU. Тем не менее, основанный на кладах анализ обеспечивает компенсирующее преимущество, поскольку он чувствителен в отношении измерения изменений популяции, которые может не учитывать анализ на основе OTU. Возможность с помощью 16S-V4-идентификации OTU определить принадлежность OTU к конкретному виду зависит отчасти от разрешающей способности области 16S-V4 область для конкретного вида или группы видов. Как плотность доступных референсных последовательностей 16S для разных областей указанного дерева, так и свойственная гену 16S вариабельность у разных видов определяют точность таксономической классификации. Таким образом, в некоторых случаях популяция видов может отслеживаться с применением основанного на кладах определения принадлежности, если детекция на основе OTU в сложной популяции недостаточно чувствительна. Например, основанный на кладах анализ в таблице 2В подтверждает, что *R. bromii*, *B. producta*, *Cl. innocuum* и *R. gnavus* были способны к заселению, поскольку каждая OTU представляет одного представителя клады в композиции с микроорганизмами, а число прочтений последовательностей от недетектируемого на -1 день увеличивалось до значительного отличия от фона на 2, 3 или 4 день. Секвенирование V4 16S и основанный на кладах анализ не позволили определить, происходило заселение *Cl. tertium* или *Cl. bolteae*, поскольку присутствовали другие представители их клад (*Cl. butyricum* и *Cl. symbiosum*, соответственно) и, как было показано на уровне OTU, они заселяли организм мышей.

[0411] Мыши, параллельно стимулированные *C. difficile*, были в значительно степени защищены, как видно из таблицы TAD. Среди мышей, которым вводили через зонд носитель (забуференный фосфатом солевой раствор), наблюдалась 100% смертность, тогда как композиции с микроорганизмами 1 и 2 оказывали защитное действие при всех уровнях доз, при смертности от 0 до 10% к 6 дню, последнему дню эксперимента. Кроме того, снижение массы тела у животных, получавших лечение композициями с микроорганизмами 1 и 2, было минимальным по сравнению с животными, получавшими через зонд основу. Указанные данные подтверждают, что заселение желудочно-кишечного тракта композициями с микроорганизмами оказывает благоприятный клинический эффект, устраняя состояние дисбиоза, так что животные способны противостоять инфекции патогеном.

Таблица TAD. Смертность в экспериментальной группе мышей, стимулированных спорами $10^{4.5}$ *C. difficile* на 0 день.

Группа	Доза (КОЕ на ОТУ)	Смерти (% смертности)
Контроль-носитель	Н/О	10 (100%)
Композиция с микроорганизмами 1	109	1 (10%)
	108	1 (10%)
	107	0 (0%)
Композиция с микроорганизмами 2	109	0 (0%)
	108	1 (10%)
	107	1 (10%)

Пример 36: Профилактическое использование и лечение колонизации устойчивым к ванкомицину энтерококком (VRE) в модели на мышах

[0412] Появление и распространение высокоустойчивых к антибиотикам бактерий представляет важную клиническую проблему (Snitkin et al Science Translational Medicine, 2012). В последние годы число инфекций, вызываемых такими организмами, как устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus*, устойчивые к карбапенему *Enterobacteriaceae*, устойчивые к ванкомицину *Enterococcus* (VRE) и *Clostridium difficile*, значительно выросло, и многие из указанных штаммов приобретают устойчивость к немногочисленным сохраняющим эффективность антибиотикам. Большинство инфекций, вызванных высокоустойчивыми к антибиотикам бактериями, приобретаются при госпитализации, и предотвращение передачи от пациента к пациенту указанных патогенов представляет собой одну из главных проблем, с которыми сталкиваются больницы и клиники. Большинство высокоустойчивых к антибиотикам бактериальных штаммов принадлежат родам, колонизирующим поверхности слизистых оболочек, обычно с низкой плотностью. Микробиота с весьма сложным составом, в норме колонизирующая поверхности слизистых оболочек, ингибирует размножение и доминирование таких бактерий, как *Enterobacteriaceae* и *Enterococcaceae*. Разрушение нормальной флоры в результате введения антибиотиков, тем не менее, приводит к прекращению ингибирования устойчивых к антибиотикам представителей указанных бактериальных семейств, приводя к их размножению до очень высокой численности (Ubeda et al Journal of Clinical Investigation 2010). Колонизация указанными организмами в высокой концентрации может быть губительной для восприимчивого пациента, приводя к бактериемии и сепсису (Taur et al, Clinical Infectious Disease, 2012).

[0413] Для тестирования применения тестируемого состава с бактериальной композицией, например, популяции спор, для профилактики и лечения инфекции VRE используют модель на мышах согласно вышеприведенному описанию (Ubeda et al,

Infectious Immunity 2013, Ubeda et al. Journal of clinical investigation, 2010). Вкратце, эксперименты проводят на самках мышей C57BL/6J возрастом 7 недель, приобретаемых у Jackson Laboratory, размещали с доступом к обработанной облучением пище и представляли подкисленную воду. Мышей размещают в индивидуальных помещениях, чтобы избежать взаимного заражения в результате копрофагии. В случае экспериментальных инфекций VRE мыши получали лечение ампициллином (0,5 г/л) в питьевой воде, которую меняли каждые 3 дня.

[0414] В модели лечения на 1 день мышей инфицируют с использованием орального зонда 10^8 КОЕ устойчивого к ванкомицину штамма *Enterococcus faecium*, приобретенного у ATCC (ATCC 700221). Через день после инфицирования (день 1) лечение антибиотиками прекращают и определяют уровни VRE в разные моменты времени путем посева серийных разведений осажденных фекалий на планшеты с агаром *Enterococcose1* (Difco) с ванкомицином (8 мкг/мл; Sigma). Колонии VRE идентифицируют по внешнему виду и подтверждают путем окрашивания по Граму или других ранее описанных способов (см., например, пример 1, 2 и 3). Кроме того, согласно вышеприведенному описанию (Ubeda et al Journal of Clinical Investigation 2010), ПЦР гена *vanA*, который придает устойчивость к ванкомицину, подтверждает присутствие VRE у инфицированных мышей. Тестируемый состав, например, бактериальную композицию или обработанный этанолом очищенный в градиенте состав со спорами (согласно описанию в настоящем документе), суспензию фекалий или антибиотики для лечения вводят в ФСБ на 1-3 день, при этом отрицательный контроль содержит только ФСБ и также вводится на 1-3 день через оральный зонд. Свежие осажденные фекалии получают ежедневно на протяжении эксперимента от -7 дня до 10 дня. Образцы немедленно замораживают и хранят при -80°C . ДНК экстрагировали с применением стандартных техник и анализировали с помощью 16S или сопоставимых способов (см., например, пример 2 и 3).

[0415] В модели колонизации ампициллин вводят согласно описанию выше для дня -7 - дня 1, лечение тестируемым составом или контролем-носителем проводят на день 0-2, и устойчивые бактерии VRE в концентрации 10^8 КОЕ вводят на 14 день. Образцы фекалий отбирают на протяжении всего эксперимента ежедневно от -7 дня до 21 дня и используют для 16S-секвенирования согласно вышеприведенному описанию (см., например, примеры 2 и 3).

[0416] В обеих моделях титры VRE в экскрементах используют для оценки успешности тестируемого состава относительно отрицательного контроля. Кроме того, оценивают состав микробиоты в отношении способности тестируемого состава индуцировать формирование здорового микробиома.

Пример 37: Профилактическое использование и лечение колонизации устойчивой к карбапенемам клебсиеллой (CRKB) в модели на мышах

[0417] Появление штаммов *Klebsiella pneumoniae* с пониженной восприимчивостью к карбапенемам представляет собой серьезную угрозу для госпитализированных пациентов;

Устойчивость к карбапенемам у указанных организмов чаще всего опосредует карбапенемаза *K. pneumoniae* (KPC), класс А бета-лактамаз, который также придает устойчивость к цефалоспорином широкого спектра и коммерчески доступным комбинациям ингибиторов бета-лактамов/бета-лактамаз (Queenan et al. Clinical Microbiology Review, 2007). Продуцирующие KPC штаммы *K. pneumoniae* (KPC-Kp) часто несут детерминанты, придающие устойчивость против нескольких других классов противомикробных средств, в том числе аминогликозидов и фторхинолонов, что

приводит к появлению обладающих действительно множественной лекарственной устойчивостью (MDR) организмов (Hirsch et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009). Учитывая ограниченные возможности противомикробной терапии, инфекции, вызываемые КРС-Кр, представляют огромную терапевтическую проблему и связаны с неблагоприятными клиническими исходами.

[0418] Протокол лечения в модели на мышах согласно вышеприведенному описанию (например, Perez et al, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2011) используют для оценки тестируемого состава, например, бактериальной композиции, лечить устойчивые к карбапенемам *Klebsiella* и уменьшать носительство в ЖКТ. Используют самок мышей CF1 (Harian Sprague-Dawley, Индианаполис, Индиана), которых содержат в отдельных помещениях, весом от 25 до 30 г.

[0419] Подробно описанный штамм *K. pneumoniae*, VA-367 (8, 9, 25), используют для указанного исследования. Указанный клинический изолят является генетически родственным штамму КРС-Кр, циркулирующему на востоке США. Определение механизмов устойчивости у *K. pneumoniae* VA-367 посредством анализа ПЦР и последовательностей ДНК показало присутствие *bla*_{KPC-3}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11}, и *bla*_{SHV-12}, а также *qnrB19* и *aac(6')-Ib*. Кроме того, ПЦР и секвенирование ДНК показали наличие повреждений в кодирующих последовательностях следующих генов белков внешней мембраны: *ompK35*, *ompK36* и *ompK37*. Тестирование на восприимчивость к антибиотикам (AST) выполняли методом разведения на агаре и интерпретировали в соответствии с текущими рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Проводили модифицированный тест Ходжа в соответствии с описанным ранее способом (см., например, Anderson et al. Journal of Clinical Microbiology, 2007) с эртапенемом, меропенемом и имипенемом. Тигециклин и полимиксин Е оценивали с помощью анализов на восприимчивость E-test (AB **bioMérieux**, Сольна,

Швеция). Результаты для тигециклина интерпретировали в соответствии с рекомендациями Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) и в соответствии с рекомендациями CLSI (критерии для *Pseudomonas*) для полимиксина Е.

[0420] Мышей (по 10 на группу) распределяют в группы для получения тестируемого состава, например, бактериальной композиции, обработанного этанолом состава со спорами (см., например, пример 6), антибиотика клиндамицина, пиперациллин-тазобактам, тигециклин, эртапенем, цефепим, цiproфлоксацина или их комбинации, или в контрольную группу, получающую только основу. Им вводят тестируемый состав ежедневно от -10 дня до 0 дня. На 0 день 10^3 КОЕ КРС-Кр VA-367, разведенного в 0,5 мл забуференного фосфатом солевого раствора (ФСБ) вводили через оральный зонд с применением питательной трубки из нержавеющей стали (Perfektum; Popper & Sons, Нью Гайд-парк, Нью-Йорк). Образцы стула собирали на 1, 4, 6, и 11 день после введения КРС-Кр для измерения концентрации устойчивой к карбапенему *K. pneumoniae*. Образцы стула (100 мг, разведенные в 800 мл ФСБ) высевает на агар Мак-Конки с 0,5 мкг/мл имипенема и без имипенема, и определяли число КОЕ на грамм стула. Как вариант, могут быть использованы другие способы измерения уровней устойчивой к карбапенему *K. pneumoniae*, например, ПЦР, тестирование на антигены, которые может использовать специалист в данной области техники.

[0421] Образцы стула собирали через 5 дней лечения для оценки эффектов антибиотиков микрофлору стула и для измерения уровней антибиотика в стуле. Для

оценки эффектов на микрофлору использовали свежие образцы стула согласно вышеприведенному описанию (см., например, примеры 2 и 3). Проводят дополнительные эксперименты для исследования того, приводило ли введение тестируемого состава, например, бактериальной композиции, к элиминированию или сохранению колонизации КРС-Кр VA-367.

[0422] Мыши получали лечение клиндамицином подкожно для уменьшения численности нормальной кишечной флоры за 1 день до получения 10^4 КОЕ КРС-Кр VA-367 через оральный зонд, и указанные мыши продолжали получать клиндамицин подкожно через день в течение 7 дней. Параллельно, в течение 7 дней после дозирования КРС-Кр через оральный зонд мыши получали через оральный зонд обычный солевой раствор (контрольная группа) или бактериальную композицию согласно описанию. Дополнительную дозу клиндамицина вводили подкожно через 20 дней после введения КРС-Кр VA-367 для оценки того, могли ли присутствовать низкие уровни устойчивого к карбапенему *K. pneumoniae*, который может стимулироваться при элиминировании анаэробной микрофлоры. Образцы стула собирали в исходный момент и на 3, 6, 8, 11, 16, и 21 день после введения КРС-Кр VA-367 через зонд. Бактериальную композицию оценивают по снижению уровня CRKB в экскрементах.

[0423] Если не указано иное, все численные значения, выражающие количества ингредиентов, реакционные условия и т.п., используемые в описании, в том числе формуле изобретения, следует во всех случаях понимать как модифицированные термином «приблизительно». Соответственно, если не указано иное, численные показатели являются приблизительными и могут варьировать в зависимости от требуемых свойств, которые необходимо получить. Как минимум, не в качестве попытки ограничения применения доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый численный показатель должен рассматриваться в свете значащих цифр и обычных способов округления.

[0424] Если не указано иное, термин «по меньшей мере» перед группой элементов следует понимать как относящийся к каждому элементу в указанной группе.

[0425] Несмотря на то, что настоящее изобретение было конкретным образом продемонстрировано и описано с использованием ссылок на предпочтительные варианты реализации и различные альтернативные варианты реализации, специалисты в соответствующей области техники должны понимать, что различные изменения формы и деталей могут быть произведены без отступления от сущности и объема изобретения.

[0426] Все источники, выданные патенты и патентные заявки, цитируемые в тексте настоящего описания включены в настоящий документ посредством ссылки полностью и для любых целей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ТАБЛИЦЫ

Таблица 1: Перечень функциональных таксономических единиц (OTU) с таксономической классификацией до рода, вида и филогенетической клады

[0427] Принадлежность клад бактериальных OTU основана на данных о последовательностях 16S. Клады определяют на основании топологии филогенетического дерева, сконструированного на основании полноразмерных последовательностей 16S с применением методов максимального правдоподобия, известных специалистам в области филогенетики. Клады конструируют для подтверждения того, что все OTU в определенной кладе: (i) расположены в пределах определенного числа узлов с бутстреп поддержкой друг от друга, и (ii) отличаются не более чем на 5% в отношении генетического сходства. OTU, принадлежащие одной

кладе, можно определить как генетически и филогенетически отличные от OTU другой клады на основании данных секвенирования 16S-V4, тогда как OTU, попадающие в одну кладу, являются близкородственными. OTU, попадающие в одну кладу, являются эволюционно близкородственными и могут быть отличимы или неотличимы друг от друга на основании данных секвенирования 16S-V4. Представители одной клады, благодаря эволюционному родству, играют аналогичные функциональные роли в экогруппе микроорганизмов, например, обнаруживаемых в кишечнике человека. Композиции, где одни виды замещены другими из той же клады, предположительно сохраняют консервативную экологическую функцию и, соответственно, подходят для применения в настоящем изобретении. Для всех OTU обозначено наличие предполагаемой способности образовывать споры и то, являются ли они патогенными или патобионтными (см. определения для описания «патобионта»). Приоритетные патогены по классификации NIAID обозначены как «категория А», «категория В» или «категория С», а оппортунистические патогены обозначены как «ОП». OTU, которые не являются патогенными, или способность которых существовать в виде патогенов неизвестна, обозначены отметкой «НЕТ». «SEQ ID №» соответствует идентификатору OTU в Перечне последовательностей, а «№ доступа в общедоступной базе данных» соответствует идентификатору OTU в общедоступной базе последовательностей.

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователя	Патогенны й статус
Eubacterium saburreum	858	AB525414	клада_178	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральный клон IR009	866	AY349376	клада_178	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae ICM62	1061	HQ616401	клада_178	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae MSX33	1062	HQ616384	клада_178	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae, оральный таксон 107	1063	ADDS01000069	клада_178	ДА	НЕТ
Alicyclobacillus acidocaldarius	122	NR_074721	клада_179	ДА	НЕТ
Clostridium baratii	555	NR_029229	клада_223	ДА	НЕТ
Clostridium colicanis	576	FJ957863	клада_223	ДА	НЕТ
Clostridium paraputrificum	611	AB536771	клада_223	ДА	НЕТ
Clostridium sardiniense	621	NR_041006	клада_223	ДА	НЕТ
Eubacterium budayi	837	NR_024682	клада_223	ДА	НЕТ
Eubacterium moniliforme	851	HF558373	клада_223	ДА	НЕТ
Eubacterium multiforme	852	NR_024683	клада_223	ДА	НЕТ
Eubacterium nitritogenes	853	NR_024684	клада_223	ДА	НЕТ
Anoxybacillus flavithermus	173	NR_074667	клада_238	ДА	НЕТ
Bacillus aerophilus	196	NR_042339	клада_238	ДА	НЕТ
Bacillus aestuarii	197	GQ980243	клада_238	ДА	НЕТ
Bacillus amyloliquefaciens	199	NR_075005	клада_238	ДА	НЕТ
Bacillus anthracis	200	AAEN01000020	клада_238	ДА	Категори я А

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Bacillus atrophaeus	201	NR_075016	клада_238	ДА	ОП
Bacillus badius	202	NR_036893	клада_238	ДА	ОП
Bacillus cereus	203	ABDJ01000015	клада_238	ДА	ОП
Bacillus circulans	204	AB271747	клада_238	ДА	ОП
Bacillus firmus	207	NR_025842	клада_238	ДА	ОП
Bacillus flexus	208	NR_024691	клада_238	ДА	ОП
Bacillus fordii	209	NR_025786	клада_238	ДА	ОП
Bacillus halmapalus	211	NR_026144	клада_238	ДА	ОП
Bacillus herbersteinensis	213	NR_042286	клада_238	ДА	ОП
Bacillus idriensis	215	NR_043268	клада_238	ДА	ОП
Bacillus lentus	216	NR_040792	клада_238	ДА	ОП
Bacillus licheniformis	217	NC_006270	клада_238	ДА	ОП
Bacillus megaterium	218	GU252124	клада_238	ДА	ОП
Bacillus nealsonii	219	NR_044546	клада_238	ДА	ОП
Bacillus niabensis	220	NR_043334	клада_238	ДА	ОП
Bacillus niacini	221	NR_024695	клада_238	ДА	ОП
Bacillus pocheonensis	222	NR_041377	клада_238	ДА	ОП
Bacillus pumilus	223	NR_074977	клада_238	ДА	ОП
Bacillus safensis	224	JQ624766	клада_238	ДА	ОП
Bacillus simplex	225	NR_042136	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sonorensis	226	NR_025130	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. 10403023 MM10403188	227	CAET01000089	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. 2_A_57_CT2	230	ACWD01000095	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. 2008724126	228	GU252108	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. 2008724139	229	GU252111	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. 7_16A1A	231	FN397518	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. AP8	233	JX101689	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. B27(2008)	234	EU362173	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. BT1B_CT2	235	ACWC01000034	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. GB1.1	236	FJ897765	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. GB9	237	FJ897766	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. HU19.1	238	FJ897769	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. HU29	239	FJ897771	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. HU33.1	240	FJ897772	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. JC6	241	JF824800	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp., оральный таксон	248	HM099654	клада_238	ДА	ОП

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
F79					
Bacillus sp. SRC_DSFI	243	GU797283	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. SRC_DSFI0	242	GU797292	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. SRC_DSFI2	244	GU797284	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. SRC_DSFI6	245	GU797288	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. tc09	249	HQ844242	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sp. zh168	250	FJ851424	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sphaericus	251	DQ286318	клада_238	ДА	ОП
Bacillus sporothermodurans	252	NR_026010	клада_238	ДА	ОП
Bacillus subtilis	253	EU627588	клада_238	ДА	ОП
Bacillus thermoamylovorans	254	NR_029151	клада_238	ДА	ОП
Bacillus thuringiensis	255	NC_008600	клада_238	ДА	ОП
Bacillus weihenstephanensis	256	NR_074926	клада_238	ДА	ОП
Geobacillus kaustophilus	933	NR_074989	клада_238	ДА	НЕТ
Geobacillus stearothermophilus	936	NR_040794	клада_238	ДА	НЕТ
Geobacillus thermodenitrificans	938	NR_074976	клада_238	ДА	НЕТ
Geobacillus thermoglucosidasius	939	NR_043022	клада_238	ДА	НЕТ
Lysinibacillus sphaericus	1193	NR_074883	клада_238	ДА	НЕТ
Clostridiales sp. SS3_4	543	AY305316	клада_246	ДА	НЕТ
Clostridium beijerinckii	557	NR_074434	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium botulinum	560	NC_010723	клада_252	ДА	Категори я А
Clostridium butyricum	561	ABDT01000017	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium chauvoei	568	EU106372	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium favosporum	582	X76749	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium histolyticum	592	HF558362	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium isatidis	597	NR_026347	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium limosum	602	FR870444	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium sartagoforme	622	NR_026490	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium septicum	624	NR_026020	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium sp. 7_2_43FAA	626	ACDK01000101	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium sporogenes	645	ABKW02000003	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium tertium	653	Y18174	клада_252	ДА	НЕТ
Clostridium carnis	564	NR_044716	клада_253	ДА	НЕТ
Clostridium celatum	565	X77844	клада_253	ДА	НЕТ
Clostridium disporicum	579	NR_026491	клада_253	ДА	НЕТ
Clostridium gasigenes	585	NR_024945	клада_253	ДА	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Clostridium quinii	616	NR_026149	клада_253	ДА	НЕТ
Clostridium hylemonae	593	AB023973	клада_260	ДА	НЕТ
Clostridium scindens	623	AF262238	клада_260	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 5_1_57FAA	1054	ACTR01000020	клада_260	ДА	НЕТ
Clostridium glycyrrhizinilyticum	588	AB233029	клада_262	ДА	НЕТ
Clostridium nexile	607	X73443	клада_262	ДА	НЕТ
Coprococcus comes	674	ABVR01000038	клада_262	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 1_1_57FAA	1048	ACTM01000065	клада_262	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 1_4_56FAA	1049	ACTN01000028	клада_262	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 8_1_57FAA	1057	ACWQ01000079	клада_262	ДА	НЕТ
Ruminococcus lactaris	1663	ABOU02000049	клада_262	ДА	НЕТ
Ruminococcus torques	1670	AAVP02000002	клада_262	ДА	НЕТ
Paenibacillus lautus	1397	NR_040882	клада_270	ДА	НЕТ
Paenibacillus polymyxa	1399	NR_037006	клада_270	ДА	НЕТ
Paenibacillus sp. HGF5	1402	AEXS01000095	клада_270	ДА	НЕТ
Paenibacillus sp. HGF7	1403	AFDH01000147	клада_270	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральнй клон JI012	868	AY349379	клада_298	ДА	НЕТ
Alicyclobacillus contaminans	124	NR_041475	клада_301	ДА	НЕТ
Alicyclobacillus herbarius	126	NR_024753	клада_301	ДА	НЕТ
Alicyclobacillus pomorum	127	NR_024801	клада_301	ДА	НЕТ
Blautia coccoides	373	AB571656	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia glucerasea	374	AB588023	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia glucerasei	375	AB439724	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia hansenii	376	ABYU02000037	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia luti	378	AB691576	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia product	379	AB600998	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia schinkii	380	NR_026312	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia sp. M25	381	HM626178	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia stercoris	382	HM626177	клада_309	ДА	НЕТ
Blautia wexlerae	383	EF036467	клада_309	ДА	НЕТ
Bryantella formatexigens	439	ACCL02000018	клада_309	ДА	НЕТ
Clostridium coccoides	573	EF025906	клада_309	ДА	НЕТ
Eubacterium cellulosolvens	839	AY178842	клада_309	ДА	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Бактерия Lachnospiraceae 6_1_63FAA	1056	ACTV01000014	клада_309	ДА	НЕТ
Ruminococcus hansenii	1662	M59114	клада_309	ДА	НЕТ
Ruminococcus obeum	1664	AY169419	клада_309	ДА	НЕТ
Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA	1666	ACII01000172	клада_309	ДА	НЕТ
Ruminococcus sp. K_1	1669	AB222208	клада_309	ДА	НЕТ
Syntrophococcus sucromutans	1911	NR_036869	клада_309	ДА	НЕТ
Bacillus alcalophilus	198	X76436	клада_327	ДА	НЕТ
Bacillus clausii	205	FN397477	клада_327	ДА	ОП
Bacillus gelatini	210	NR_025595	клада_327	ДА	ОП
Bacillus halodurans	212	AY144582	клада_327	ДА	ОП
Bacillus sp., оральный таксон F26	246	HM099642	клада_327	ДА	ОП
Clostridium innocuum	595	M23732	клада_351	ДА	НЕТ
Clostridium sp. HGF2	628	AENW01000022	клада_351	ДА	НЕТ
Clostridium perfringens	612	ABDW01000023	клада_353	ДА	Категори я В
Sarcina ventriculi	1687	NR_026146	клада_353	ДА	НЕТ
Clostridium bartlettii	556	ABEZ02000012	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium bifermentans	558	X73437	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium ghonii	586	AB542933	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium glycolicum	587	FJ384385	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium mayombeii	605	FR733682	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium sordellii	625	AB448946	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium sp. MT4 E	635	FJ159523	клада_354	ДА	НЕТ
Eubacterium tenue	872	M59118	клада_354	ДА	НЕТ
Clostridium argentinense	553	NR_029232	клада_355	ДА	НЕТ
Clostridium sp. JC122	630	CAEV01000127	клада_355	ДА	НЕТ
Clostridium sp. NMBHI_1	636	JN093130	клада_355	ДА	НЕТ
Clostridium subterminale	650	NR_041795	клада_355	ДА	НЕТ
Clostridium sulfidigenes	651	NR_044161	клада_355	ДА	НЕТ
Dorea formicigenerans	773	AAXA02000006	клада_360	ДА	НЕТ
Dorea longicatena	774	AJ132842	клада_360	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 2_1_46FAA	1050	ADLB01000035	клада_360	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 2_1_58FAA	1051	ACTO01000052	клада_360	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae	1053	ADCR01000030	клада_360	ДА	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
4_1_37FAA					
Бактерия Lachnospiraceae 9_1_43BFAA	1058	ACTX01000023	клада_360	ДА	НЕТ
Ruminococcus gnavus	1661	X94967	клада_360	ДА	НЕТ
Ruminococcus sp. ID8	1668	AY960564	клада_360	ДА	НЕТ
Blautia hydrogenotrophica	377	ACBZ01000217	клада_368	ДА	НЕТ
Lactonifactor longoviformis	1147	DQ100449	клада_368	ДА	НЕТ
Robinsoniella peoriensis	1633	AF445258	клада_368	ДА	НЕТ
Eubacterium infirmum	849	U13039	клада_384	ДА	НЕТ
Eubacterium sp. WAL 14571	864	FJ687606	клада_384	ДА	НЕТ
Бактерия Erysipelotrichaceae5_2_54FAA	823	ACZW01000054	клада_385	ДА	НЕТ
Eubacterium bifforme	835	ABYT01000002	клада_385	ДА	НЕТ
Eubacterium cylindroides	842	FP929041	клада_385	ДА	НЕТ
Eubacterium dolichum	844	L34682	клада_385	ДА	НЕТ
Eubacterium sp. 3_1_31	861	ACTL01000045	клада_385	ДА	НЕТ
Eubacterium tortuosum	873	NR_044648	клада_385	ДА	НЕТ
Bulleidia extructa	441	ADFR01000011	клада_388	ДА	НЕТ
Solobacterium moorei	1739	AECQ01000039	клада_388	ДА	НЕТ
Coprococcus catus	673	EU266552	клада_393	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae, оральный таксон F15	1064	HM099641	клада_393	ДА	НЕТ
Clostridium cochlearium	574	NR_044717	клада_395	ДА	НЕТ
Clostridium malenominatum	604	FR749893	клада_395	ДА	НЕТ
Clostridium tetani	654	NC_004557	клада_395	ДА	НЕТ
Acetivibrio ethanolgignens	6	FR749897	клада_396	ДА	НЕТ
Anaerosporeobacter mobilis	161	NR_042953	клада_396	ДА	НЕТ
Bacteroides pectinophilus	288	ABVQ01000036	клада_396	ДА	НЕТ
Clostridium aminovalericum	551	NR_029245	клада_396	ДА	НЕТ
Clostridium phytofermentans	613	NR_074652	клада_396	ДА	НЕТ
Eubacterium hallii	848	L34621	клада_396	ДА	НЕТ
Eubacterium xylanophilum	875	L34628	клада_396	ДА	НЕТ
Ruminococcus callidus	1658	NR_029160	клада_406	ДА	НЕТ
Ruminococcus champanellensis	1659	FP929052	клада_406	ДА	НЕТ
Ruminococcus sp. 18P13	1665	AJ515913	клада_406	ДА	НЕТ
Ruminococcus sp. 9SE51	1667	FM954974	клада_406	ДА	НЕТ
Anaerostipes caccae	162	ABAX03000023	клада_408	ДА	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Anaerostipes sp. 3_2_56FAA	163	ACWB01000002	клада_408	ДА	НЕТ
Бактерия Clostridiales 1_7_47FAA	541	ABQR01000074	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridiales sp. SM4_1	542	FP929060	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridiales sp. SSC_2	544	FP929061	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium aerotolerans	546	X76163	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium aldenense	547	NR_043680	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium algidixylanolyticum	550	NR_028726	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium amygdalinum	552	AY353957	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium asparagiforme	554	ACCJ01000522	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium bolteae	559	ABCC02000039	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium celerecrescens	566	JQ246092	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium citroniae	569	ADLJ01000059	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium clostridiiformes	571	M59089	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium clostridioforme	572	NR_044715	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium hathewayi	590	AY552788	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium indolis	594	AF028351	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium lavalense	600	EF564277	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium saccharolyticum	620	CP002109	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium sp. M62_1	633	ACFX02000046	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium sp. SS2_1	638	ABGC03000041	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium sphenoides	643	X73449	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium symbiosum	652	ADLQ01000114	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium xylanolyticum	658	NR_037068	клада_408	ДА	НЕТ
Eubacterium hadrum	847	FR749933	клада_408	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 3_1_57FAA_CT1	1052	ACTP01000124	клада_408	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae 5_1_63FAA	1055	ACTS01000081	клада_408	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae A4	1059	DQ789118	клада_408	ДА	НЕТ
Бактерия Lachnospiraceae DJF VP30	1060	EU728771	клада_408	ДА	НЕТ
Lachnospiraceae, геномовид C1	1065	AY278618	клада_408	ДА	НЕТ
Clostridium difficile	578	NC_013315	клада_409	ДА	ОП
Eubacterium sp. AS15b	862	HQ616364	клада_428	ДА	НЕТ
Eubacterium sp. OBRC9	863	HQ616354	клада_428	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральнй клон ОН3А	871	AY947497	клада_428	ДА	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Eubacterium yurii	876	AEES01000073	клада_428	ДА	НЕТ
Clostridium acetobutylicum	545	NR_074511	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium algidicarnis	549	NR_041746	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium cadaveris	562	AB542932	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium carboxidivorans	563	FR733710	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium estertheticum	580	NR_042153	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium fallax	581	NR_044714	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium felsineum	583	AF270502	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium frigidicarnis	584	NR_024919	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium kluyveri	598	NR_074165	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium magnum	603	X77835	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium putrefaciens	615	NR_024995	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium sp. HPB_46	629	AY862516	клада_430	ДА	НЕТ
Clostridium tyrobutyricum	656	NR_044718	клада_430	ДА	НЕТ
Sutterella parvirubra	1899	AB300989	клада_432	ДА	НЕТ
Acetanaerobacterium elongatum	4	NR_042930	клада_439	ДА	НЕТ
Clostridium cellulosi	567	NR_044624	клада_439	ДА	НЕТ
Ethanoligenens harbinense	832	AY675965	клада_439	ДА	НЕТ
Eubacterium rectale	856	FP929042	клада_444	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральный клон GI038	865	AY349374	клада_444	ДА	НЕТ
Lachnobacterium bovis	1045	GU324407	клада_444	ДА	НЕТ
Roseburia cecicola	1634	GU233441	клада_444	ДА	НЕТ
Roseburia faecalis	1635	AY804149	клада_444	ДА	НЕТ
Roseburia faecis	1636	AY305310	клада_444	ДА	НЕТ
Roseburia hominis	1637	AJ270482	клада_444	ДА	НЕТ
Roseburia intestinalis	1638	FP929050	клада_444	ДА	НЕТ
Roseburia inulinivorans	1639	AJ270473	клада_444	ДА	НЕТ
Brevibacillus brevis	410	NR_041524	клада_448	ДА	НЕТ
Brevibacillus laterosporus	414	NR_037005	клада_448	ДА	НЕТ
Bacillus coagulans	206	DQ297928	клада_451	ДА	ОП
Sporolactobacillus инулини	1752	NR_040962	клада_451	ДА	НЕТ
Kocuria palustris	1041	EU333884	клада_453	ДА	НЕТ
Nocardia farcinica	1353	NC_006361	клада_455	ДА	НЕТ
Bacillus sp., оральный таксон F28	247	HM099650	клада_456	ДА	ОП
Catenibacterium mitsuokai	495	AB030224	клада_469	ДА	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Clostridium sp. TM_40	640	AB249652	клада_469	ДА	НЕТ
Coprobacillus cateniformis	670	AB030218	клада_469	ДА	НЕТ
Coprobacillus sp. 29_1	671	ADKX01000057	клада_469	ДА	НЕТ
Clostridium rectum	618	NR_029271	клада_470	ДА	НЕТ
Eubacterium nodatum	854	U13041	клада_476	ДА	НЕТ
Eubacterium saphenum	859	NR_026031	клада_476	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральный клон JH012	867	AY349373	клада_476	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральный клон JS001	870	AY349378	клада_476	ДА	НЕТ
Faecalibacterium prausnitzii	880	ACOP02000011	клада_478	ДА	НЕТ
Gemmiger formicilis	932	GU562446	клада_478	ДА	НЕТ
Subdoligranulum variabile	1896	AJ518869	клада_478	ДА	НЕТ
Бактерия Clostridiaceae JC13	532	JF824807	клада_479	ДА	НЕТ
Clostridium sp. MLG055	634	AF304435	клада_479	ДА	НЕТ
Бактерия Erysipelotrichaceae3_1_53	822	ACTJ01000113	клада_479	ДА	НЕТ
Clostridium cocleatum	575	NR_026495	клада_481	ДА	НЕТ
Clostridium ramosum	617	M23731	клада_481	ДА	НЕТ
Clostridium saccharogumia	619	DQ100445	клада_481	ДА	НЕТ
Clostridium spiroforme	644	X73441	клада_481	ДА	НЕТ
Coprobacillus sp. D7	672	ACDT01000199	клада_481	ДА	НЕТ
Бактерия Clostridiales SY8519	535	AB477431	клада_482	ДА	НЕТ
Clostridium sp. SY8519	639	AP012212	клада_482	ДА	НЕТ
Eubacterium ramulus	855	AJ011522	клада_482	ДА	НЕТ
Erysipelothrix inopinata	819	NR_025594	клада_485	ДА	НЕТ
Erysipelothrix rhusiopathiae	820	ACLK01000021	клада_485	ДА	НЕТ
Erysipelothrix tonsillarum	821	NR_040871	клада_485	ДА	НЕТ
Holdemania filiformis	1004	Y11466	клада_485	ДА	НЕТ
Бактерия Mollicutes рACH93	1258	AY297808	клада_485	ДА	НЕТ
Coxiella burnetii	736	CP000890	клада_486	ДА	Категори я В
Clostridium hiranonis	591	AB023970	клада_487	ДА	НЕТ
Clostridium irregulare	596	NR_029249	клада_487	ДА	НЕТ
Clostridium orbiscindens	609	Y18187	клада_494	ДА	НЕТ
Clostridium sp. NML 04A032	637	EU815224	клада_494	ДА	НЕТ
Flavonifractor plautii	886	AY724678	клада_494	ДА	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Pseudoflavonifractor capillosus	1591	AY136666	клада_494	ДА	НЕТ
Бактерия Ruminococcaceae D16	1655	ADDX01000083	клада_494	ДА	НЕТ
Acetivibrio cellulolyticus	5	NR_025917	клада_495	ДА	НЕТ
Clostridium aldrichii	548	NR_026099	клада_495	ДА	НЕТ
Clostridium clariflavum	570	NR_041235	клада_495	ДА	НЕТ
Clostridium stercorarium	647	NR_025100	клада_495	ДА	НЕТ
Clostridium straminisolvens	649	NR_024829	клада_495	ДА	НЕТ
Clostridium thermocellum	655	NR_074629	клада_495	ДА	НЕТ
Fusobacterium nucleatum	901	ADVX01000034	клада_497	ДА	НЕТ
Eubacterium barkeri	834	NR_044661	клада_512	ДА	НЕТ
Eubacterium callanderi	838	NR_026330	клада_512	ДА	НЕТ
Eubacterium limosum	850	CP002273	клада_512	ДА	НЕТ
Anaerotruncus colihominis	164	ABGD02000021	клада_516	ДА	НЕТ
Clostridium methylpentosum	606	ACEC01000059	клада_516	ДА	НЕТ
Clostridium sp. YIT 12070	642	AB491208	клада_516	ДА	НЕТ
Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans	1005	NR_044425	клада_516	ДА	НЕТ
Ruminococcus albus	1656	AY445600	клада_516	ДА	НЕТ
Ruminococcus flavefaciens	1660	NR_025931	клада_516	ДА	НЕТ
Clostridium haemolyticum	589	NR_024749	клада_517	ДА	НЕТ
Clostridium novyi	608	NR_074343	клада_517	ДА	НЕТ
Clostridium sp. LMG 16094	632	X95274	клада_517	ДА	НЕТ
Eubacterium ventriosum	874	L34421	клада_519	ДА	НЕТ
Bacteroides galacturonicus	280	DQ497994	клада_522	ДА	НЕТ
Eubacterium eligens	845	CP001104	клада_522	ДА	НЕТ
Lachnospira multipara	1046	FR733699	клада_522	ДА	НЕТ
Lachnospira pectinoschiza	1047	L14675	клада_522	ДА	НЕТ
Lactobacillus rogosae	1114	GU269544	клада_522	ДА	НЕТ
Bacillus horti	214	NR_036860	клада_527	ДА	ОП
Bacillus sp. 9_3A1A	232	FN397519	клада_527	ДА	ОП
Eubacterium brachy	836	U13038	клада_533	ДА	НЕТ
Filifactor alocis	881	CP002390	клада_533	ДА	НЕТ
Filifactor villosus	882	NR_041928	клада_533	ДА	НЕТ
Clostridium leptum	601	AJ305238	клада_537	ДА	НЕТ
Clostridium sp. YIT 12069	641	AB491207	клада_537	ДА	НЕТ
Clostridium sporosphaeroides	646	NR_044835	клада_537	ДА	НЕТ
Eubacterium coprostanoligenes	841	HM037995	клада_537	ДА	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Ruminococcus bromii	1657	EU266549	клада_537	ДА	НЕТ
Eubacterium siraeum	860	ABCA03000054	клада_538	ДА	НЕТ
Clostridium viride	657	NR_026204	клада_540	ДА	НЕТ
Oscillibacter sp. G2	1386	HM626173	клада_540	ДА	НЕТ
Oscillibacter valericigenes	1387	NR_074793	клада_540	ДА	НЕТ
Oscillospira guilliermondii	1388	AB040495	клада_540	ДА	НЕТ
Butyrivibrio crossotus	455	ABWN01000012	клада_543	ДА	НЕТ
Clostridium sp. L2_50	631	AAYW02000018	клада_543	ДА	НЕТ
Coprococcus eutactus	675	EF031543	клада_543	ДА	НЕТ
Coprococcus sp. ART55_1	676	AY350746	клада_543	ДА	НЕТ
Eubacterium ruminantium	857	NR_024661	клада_543	ДА	НЕТ
Collinsella aerofaciens	659	AAVN02000007	клада_553	ДА	НЕТ
Alkaliphilus metalliredigenes	137	AY137848	клада_554	ДА	НЕТ
Alkaliphilus oremlandii	138	NR_043674	клада_554	ДА	НЕТ
Clostridium sticklandii	648	L04167	клада_554	ДА	НЕТ
Turicibacter sanguinis	1965	AF349724	клада_555	ДА	НЕТ
Fulvimonas sp. NML 060897	892	EF589680	клада_557	ДА	НЕТ
Desulfitobacterium frappieri	753	AJ276701	клада_560	ДА	НЕТ
Desulfitobacterium hafniense	754	NR_074996	клада_560	ДА	НЕТ
Desulfotomaculum nigrificans	756	NR_044832	клада_560	ДА	НЕТ
Lutispora thermophila	1191	NR_041236	клада_564	ДА	НЕТ
Brachyspira pilosicoli	405	NR_075069	клада_565	ДА	НЕТ
Eggerthella lenta	778	AF292375	клада_566	ДА	НЕТ
Streptomyces albus	1888	AJ697941	клада_566	ДА	НЕТ
Бактерия Chlamydiales NS11	505	JN606074	клада_567	ДА	НЕТ
Anaerofustis stercorihominis	159	ABIL02000005	клада_570	ДА	НЕТ
Butyrivibrio pullicaecorum	453	HN793440	клада_572	ДА	НЕТ
Eubacterium desmolans	843	NR_044644	клада_572	ДА	НЕТ
Papillibacter cinnamivorans	1415	NR_025025	клада_572	ДА	НЕТ
Sporobacter termitidis	1751	NR_044972	клада_572	ДА	НЕТ
Deferribacteres sp., оральны й клон JV006	744	AY349371	клада_575	ДА	НЕТ
Clostridium colinum	577	NR_026151	клада_576	ДА	НЕТ
Clostridium lactatifermentans	599	NR_025651	клада_576	ДА	НЕТ
Clostridium piliforme	614	D14639	клада_576	ДА	НЕТ
Saccharomonospora viridis	1671	X54286	клада_579	ДА	НЕТ
Thermobifida fusca	1921	NC_007333	клада_579	ДА	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Leptospira licerasiae	1164	EF612284	клада_585	ДА	ОП
Moorella thermoacetica	1259	NR_075001	клада_590	ДА	НЕТ
Thermoanaerobacter pseudethanolicus	1920	CP000924	клада_590	ДА	НЕТ
Flexistipes sinuarabici	888	NR_074881	клада_591	ДА	НЕТ
Gloeobacter violaceus	942	NR_074282	клада_596	ДА	НЕТ
Eubacterium sp., оральныи клон JN088	869	AY349377	клада_90	ДА	НЕТ
Clostridium oroticum	610	FR749922	клада_96	ДА	НЕТ
Clostridium sp. D5	627	ADBG01000142	клада_96	ДА	НЕТ
Eubacterium contortum	840	FR749946	клада_96	ДА	НЕТ
Eubacterium fissicatena	846	FR749935	клада_96	ДА	НЕТ
Corynebacterium coyleae	692	X96497	клада_100	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium mucifaciens	711	NR_026396	клада_100	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium ureicelerivorans	733	AM397636	клада_100	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium appendicis	684	NR_028951	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium genitalium	698	ACLJ01000031	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium glaucum	699	NR_028971	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium imitans	703	AF537597	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium riegellii	719	EU848548	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium sp. L_2012475	723	HE575405	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium sp. NML 93_0481	724	GU238409	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium sundsvallense	728	Y09655	клада_102	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium tuscaniae	730	AY677186	клада_102	НЕТ	НЕТ
Prevotella maculosa	1504	AGEK01000035	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella oris	1513	ADDV01000091	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella salivae	1517	AB108826	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. ICM55	1521	HQ616399	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральныи клон AA020	1528	AY005057	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральныи клон GI032	1538	AY349396	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральныи таксон G70	1558	GU432179	клада_104	НЕТ	НЕТ
Prevotella corporis	1491	L16465	клада_105	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 4_1_36	312	ACTC01000133	клада_110	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. AR20	315	AF139524	клада_110	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Bacteroides sp. D20	319	ACPT01000052	клада_110	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. F_4	322	AB470322	клада_110	НЕТ	НЕТ
Bacteroides uniformis	329	AB050110	клада_110	НЕТ	НЕТ
Prevotella nanceiensis	1510	JN867228	клада_127	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 299	1548	ACWZ01000026	клада_127	НЕТ	НЕТ
Prevotella bergensis	1485	ACKS01000100	клада_128	НЕТ	НЕТ
Prevotella buccalis	1489	JN867261	клада_129	НЕТ	НЕТ
Prevotella timonensis	1564	ADEF01000012	клада_129	НЕТ	НЕТ
Prevotella oralis	1512	AEPE01000021	клада_130	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. SEQ072	1525	JN867238	клада_130	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc carnosum	1177	NR_040811	клада_135	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc gasicomitatum	1179	FN822744	клада_135	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc inhae	1180	NR_025204	клада_135	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc kimchii	1181	NR_075014	клада_135	НЕТ	НЕТ
Edwardsiella tarda	777	CP002154	клада_139	НЕТ	НЕТ
Photorhabdus asymbiotica	1466	Z76752	клада_139	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter arcticus	1607	CP000082	клада_141	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter cibarius	1608	HQ698586	клада_141	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter cryohalolentis	1609	CP000323	клада_141	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter faecalis	1610	HQ698566	клада_141	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter nivimaris	1611	HQ698587	клада_141	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter pulmonis	1612	HQ698582	клада_141	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas aeruginosa	1592	AABQ07000001	клада_154	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas sp. 2_1_26	1600	ACWU01000257	клада_154	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium confusum	691	Y15886	клада_158	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium propinquum	712	NR_037038	клада_158	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium pseudodiphtheriticum	713	X84258	клада_158	НЕТ	НЕТ
Bartonella bacilliformis	338	NC_008783	клада_159	НЕТ	НЕТ
Bartonella grahamii	339	CP001562	клада_159	НЕТ	НЕТ
Bartonella henselae	340	NC_005956	клада_159	НЕТ	НЕТ
Bartonella quintana	341	BX897700	клада_159	НЕТ	НЕТ
Bartonella tamiae	342	EF672728	клада_159	НЕТ	НЕТ
Bartonella washoensis	343	FJ719017	клада_159	НЕТ	НЕТ
Brucella abortus	430	ACBJ01000075	клада_159	НЕТ	Категори я Б

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Brucella canis	431	NR_044652	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella ceti	432	ACJD01000006	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella melitensis	433	AE009462	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella microti	434	NR_042549	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella ovis	435	NC_009504	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella sp. 83_13	436	ACBQ01000040	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella sp. BO1	437	EU053207	клада_159	НЕТ	Категори я В
Brucella suis	438	ACBK01000034	клада_159	НЕТ	Категори я В
Ochrobactrum anthropi	1360	NC_009667	клада_159	НЕТ	НЕТ
Ochrobactrum intermedium	1361	ACQA01000001	клада_159	НЕТ	НЕТ
Ochrobactrum pseudintermedium	1362	DQ365921	клада_159	НЕТ	НЕТ
Prevotella, геномовид C2	1496	AY278625	клада_164	НЕТ	НЕТ
Prevotella multisaccharivorax	1509	AFJE01000016	клада_164	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон IDR_CEC_0055	1543	AY550997	клада_164	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 292	1547	GQ422735	клада_164	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 300	1549	GU409549	клада_164	НЕТ	НЕТ
Prevotella marshii	1505	AEEI01000070	клада_166	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон IK053	1544	AY349401	клада_166	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 781	1554	GQ422744	клада_166	НЕТ	НЕТ
Prevotella stercorea	1562	AB244774	клада_166	НЕТ	НЕТ
Prevotella brevis	1487	NR_041954	клада_167	НЕТ	НЕТ
Prevotella ruminicola	1516	CP002006	клада_167	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. sp24	1560	AB003384	клада_167	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. sp34	1561	AB003385	клада_167	НЕТ	НЕТ
Prevotella albensis	1483	NR_025300	клада_168	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообразователи	Патогенный статус
Prevotella copri	1490	ACBX02000014	клада_168	НЕТ	НЕТ
Prevotella oulorum	1514	L16472	клада_168	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. BI_42	1518	AJ581354	клада_168	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон P4PB_83 P2	1546	AY207050	клада_168	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон G60	1557	GU432133	клада_168	НЕТ	НЕТ
Prevotella amnii	1484	AB547670	клада_169	НЕТ	НЕТ
Bacteroides caccae	268	EU136686	клада_170	НЕТ	НЕТ
Bacteroides finegoldii	277	AB222699	клада_170	НЕТ	НЕТ
Bacteroides intestinalis	283	ABJL02000006	клада_171	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. XB44A	326	AM230649	клада_171	НЕТ	НЕТ
Bifidobacteriaceae, геномовид CI	345	AY278612	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium adolescentis	346	AAXD02000018	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium angulatum	347	ABYS02000004	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium animalis	348	CP001606	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium breve	350	CP002743	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium catenulatum	351	ABXY01000019	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium dentium	352	CP001750	клада_172	НЕТ	ОП
Bifidobacterium gallicum	353	ABXB03000004	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium infantis	354	AY151398	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium kashiwanohense	355	AB491757	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium longum	356	ABQQ01000041	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium pseudocatenulatum	357	ABXX02000002	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium pseudolongum	358	NR_043442	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium scardovii	359	AJ307005	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium sp. HM2	360	AB425276	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium sp. HMLN12	361	JF519685	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium sp. M45	362	HM626176	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium sp. MSX5B	363	HQ616382	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium sp. TM_7	364	AB218972	клада_172	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium thermophilum	365	DQ340557	клада_172	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc citreum	1178	AM157444	клада_175	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc lactis	1182	NR_040823	клада_175	НЕТ	НЕТ
Alicyclobacillus acidoterrestris	123	NR_040844	клада_179	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Alicyclobacillus cycloheptanicus	125	NR_024754	клада_179	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter baumannii	27	ACYQ01000014	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter calcoaceticus	28	AM157426	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter, геномовид C1	29	AY278636	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter haemolyticus	30	ADMT01000017	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter johnsonii	31	ACPL01000162	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter junii	32	ACPM01000135	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter lwoffii	33	ACPN01000204	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter parvus	34	AIEB01000124	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter schindleri	36	NR_025412	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. 56A1	37	GQ178049	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. CIP 101934	38	JQ638573	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. CIP 102143	39	JQ638578	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. M16_22	41	HM366447	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. RUH2624	42	ACQF01000094	клада_181	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. SH024	43	ADCH01000068	клада_181	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus jensenii	1092	ACQD01000066	клада_182	НЕТ	НЕТ
Alcaligenes faecalis	119	AB680368	клада_183	НЕТ	НЕТ
Alcaligenes sp. CO14	120	DQ643040	клада_183	НЕТ	НЕТ
Alcaligenes sp. S3	121	HQ262549	клада_183	НЕТ	НЕТ
Oligella ureolytica	1366	NR_041998	клада_183	НЕТ	НЕТ
Oligella urethralis	1367	NR_041753	клада_183	НЕТ	НЕТ
Eikenella corrodens	784	ACEA01000028	клада_185	НЕТ	НЕТ
Kingella denitrificans	1019	AEWV01000047	клада_185	НЕТ	НЕТ
Kingella, геномовид P1, оральный клон MB2_C20	1020	DQ003616	клада_185	НЕТ	НЕТ
Kingella kingae	1021	AFHS01000073	клада_185	НЕТ	НЕТ
Kingella oralis	1022	ACJW02000005	клада_185	НЕТ	НЕТ
Kingella sp., оральный клон ID059	1023	AY349381	клада_185	НЕТ	НЕТ
Neisseria elongata	1330	ADBF01000003	клада_185	НЕТ	НЕТ
Neisseria, геномовид P2 оральный клон MB5_P15	1332	DQ003630	клада_185	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp., оральный клон JC012	1345	AY349388	клада_185	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp. SMC_A9199	1342	FJ763637	клада_185	НЕТ	НЕТ
Simonsiella muelleri	1731	ADCY01000105	клада_185	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Corynebacterium glucuronolyticum	700	ABYP01000081	клада_193	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium pyruviciproducens	716	FJ185225	клада_193	НЕТ	НЕТ
Rothia aeria	1649	DQ673320	клада_194	НЕТ	НЕТ
Rothia dentocariosa	1650	ADDW01000024	клада_194	НЕТ	НЕТ
Rothia sp., оральный таксон 188	1653	GU470892	клада_194	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium accolens	681	ACGD01000048	клада_195	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium macginleyi	707	AB359393	клада_195	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium pseudogenitalium	714	ABYQ01000237	клада_195	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium tuberculostearicum	729	ACVP01000009	клада_195	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus casei	1074	CP000423	клада_198	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus paracasei	1106	ABQV01000067	клада_198	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus zeae	1143	NR_037122	клада_198	НЕТ	НЕТ
Prevotella dentalis	1492	AB547678	клада_205	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон ASCG10	1529	AY923148	клада_206	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон HF050	1541	AY349399	клада_206	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон ID019	1542	AY349400	клада_206	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон IK062	1545	AY349402	клада_206	НЕТ	НЕТ
Prevotella, геномовид P9 оральный клон MB7_G16	1499	DQ003633	клада_207	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон AU069	1531	AY005062	клада_207	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон CY006	1532	AY005063	клада_207	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон FL019	1534	AY349392	клада_207	НЕТ	НЕТ
Actinomyces, геномовид C1	56	AY278610	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces, геномовид C2	57	AY278611	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces, геномовид P1 оральный клон MB6_C03	58	DQ003632	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces georgiae	59	GU561319	клада_212	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Actinomyces israelii	60	AF479270	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces massiliensis	61	AB545934	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces meyeri	62	GU561321	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces odontolyticus	66	ACYT01000123	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces orihominis	68	AJ575186	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. CCUG 37290	71	AJ234058	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. ICM34	75	HQ616391	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. ICM41	76	HQ616392	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. ICM47	77	HQ616395	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. ICM54	78	HQ616398	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp., оральный клон IP081	87	AY349366	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp., оральный таксон 178	91	AEUH01000060	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp., оральный таксон 180	92	AEPP01000041	клада_212	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. TeJ5	80	GU561315	клада_212	НЕТ	НЕТ
Haematobacter sp. BC14248	968	GU396991	клада_213	НЕТ	НЕТ
Paracoccus denitrificans	1424	CP000490	клада_213	НЕТ	НЕТ
Paracoccus marcusii	1425	NR_044922	клада_213	НЕТ	НЕТ
Grimontia hollisae	967	ADAQ01000013	клада_216	НЕТ	НЕТ
Shewanella putrefaciens	1723	CP002457	клада_216	НЕТ	НЕТ
Afipia, геномовид 4	111	EU117385	клада_217	НЕТ	НЕТ
Rhodopseudomonas palustris	1626	CP000301	клада_217	НЕТ	НЕТ
Methylobacterium extorquens	1223	NC_010172	клада_218	НЕТ	НЕТ
Methylobacterium podarium	1224	AY468363	клада_218	НЕТ	НЕТ
Methylobacterium radiotolerans	1225	GU294320	клада_218	НЕТ	НЕТ
Methylobacterium sp. 1sub	1226	AY468371	клада_218	НЕТ	НЕТ
Methylobacterium sp. MM4	1227	AY468370	клада_218	НЕТ	НЕТ
Achromobacter denitrificans	18	NR_042021	клада_224	НЕТ	НЕТ
Achromobacter piechaudii	19	ADMS01000149	клада_224	НЕТ	НЕТ
Achromobacter xylosoxidans	20	ACRC01000072	клада_224	НЕТ	НЕТ
Bordetella bronchiseptica	384	NR_025949	клада_224	НЕТ	ОП
Bordetella holmesii	385	AB683187	клада_224	НЕТ	ОП
Bordetella parapertussis	386	NR_025950	клада_224	НЕТ	ОП
Bordetella pertussis	387	BX640418	клада_224	НЕТ	ОП
Microbacterium chokolatum	1230	NR_037045	клада_225	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Microbacterium flavescens	1231	EU714363	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium lacticum	1233	EU714351	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium oleivorans	1234	EU714381	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium oxydans	1235	EU714348	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium paraoxydans	1236	AJ491806	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium phyllosphaerae	1237	EU714359	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium schleiferi	1238	NR_044936	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium sp. 768	1239	EU714378	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium sp., оральн штамм C24KA	1240	AF287752	клада_225	НЕТ	НЕТ
Microbacterium testaceum	1241	EU714365	клада_225	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium atypicum	686	NR_025540	клада_229	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium mastitidis	708	AB359395	клада_229	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium sp. NML 97_0186	725	GU238411	клада_229	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium elephantis	1275	AF385898	клада_237	НЕТ	ОП
Mycobacterium paraterrae	1288	EU919229	клада_237	НЕТ	ОП
Mycobacterium phlei	1289	GU142920	клада_237	НЕТ	ОП
Mycobacterium sp. 1776	1293	EU703152	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. 1781	1294	EU703147	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. AQ1GA4	1297	HM210417	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. GN_10546	1299	FJ497243	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. GN_10827	1300	FJ497247	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. GN_11124	1301	FJ652846	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. GN_9188	1302	FJ497240	клада_237	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. GR_2007_210	1303	FJ555538	клада_237	НЕТ	НЕТ
Anoxybacillus contaminans	172	NR_029006	клада_238	НЕТ	НЕТ
Bacillus aeolius	195	NR_025557	клада_238	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium frigoritolerans	422	NR_042639	клада_238	НЕТ	НЕТ
Geobacillus sp. E263	934	DQ647387	клада_238	НЕТ	НЕТ
Geobacillus sp. WCH70	935	CP001638	клада_238	НЕТ	НЕТ
Geobacillus thermocatenulatus	937	NR_043020	клада_238	НЕТ	НЕТ
Geobacillus thermoleovorans	940	NR_074931	клада_238	НЕТ	НЕТ
Lysinibacillus fusiformis	1192	FN397522	клада_238	НЕТ	НЕТ
Planomicrobium koreense	1468	NR_025011	клада_238	НЕТ	НЕТ
Sporosarcina newyorkensis	1754	AFPZ01000142	клада_238	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Sporosarcina sp. 2681	1755	GU994081	клада_238	НЕТ	НЕТ
Ureibacillus composti	1968	NR_043746	клада_238	НЕТ	НЕТ
Ureibacillus suwonensis	1969	NR_043232	клада_238	НЕТ	НЕТ
Ureibacillus terrenus	1970	NR_025394	клада_238	НЕТ	НЕТ
Ureibacillus thermophilus	1971	NR_043747	клада_238	НЕТ	НЕТ
Ureibacillus thermosphaericus	1972	NR_040961	клада_238	НЕТ	НЕТ
Prevotella micans	1507	AGWK01000061	клада_239	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон DA058	1533	AY005065	клада_239	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. SEQ053	1523	JN867222	клада_239	НЕТ	НЕТ
Treponema socranskii	1937	NR_024868	клада_240	НЕТ	ОП
Treponema sp. 6:H:D15A_4	1938	AY005083	клада_240	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 265	1953	GU408850	клада_240	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон G85	1958	GU432215	клада_240	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas endodontalis	1472	ACNN01000021	клада_241	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas sp., оральный клон BB134	1478	AY005068	клада_241	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas sp., оральный клон F016	1479	AY005069	клада_241	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas sp., оральный клон P2PB_52 P1	1480	AY207054	клада_241	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas sp., оральный клон P4GB_100 P2	1481	AY207057	клада_241	НЕТ	НЕТ
Acidovorax sp. 98_63833	26	AY258065	клада_245	НЕТ	НЕТ
Бактерия Comamonadaceae NML000135	663	JN585335	клада_245	НЕТ	НЕТ
Бактерия Comamonadaceae NML790751	664	JN585331	клада_245	НЕТ	НЕТ
Бактерия Comamonadaceae NML910035	665	JN585332	клада_245	НЕТ	НЕТ
Бактерия Comamonadaceae NML910036	666	JN585333	клада_245	НЕТ	НЕТ
Comamonas sp. NSP5	668	AB076850	клада_245	НЕТ	НЕТ
Delftia acidovorans	748	CP000884	клада_245	НЕТ	НЕТ
Xenophilus aerolatus	2018	JN585329	клада_245	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp., оральный	1380	ACIQ02000009	клада_246	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообразователи	Патогенный статус
таксон 078					
Oribacterium sp., оральный таксон 102	1381	GQ422713	клада_246	НЕТ	НЕТ
Weissella cibaria	2007	NR_036924	клада_247	НЕТ	НЕТ
Weissella confusa	2008	NR_040816	клада_247	НЕТ	НЕТ
Weissella hellenica	2009	AB680902	клада_247	НЕТ	НЕТ
Weissella kandleri	2010	NR_044659	клада_247	НЕТ	НЕТ
Weissella koreensis	2011	NR_075058	клада_247	НЕТ	НЕТ
Weissella paramesenteroides	2012	ACKU01000017	клада_247	НЕТ	НЕТ
Weissella sp. KLDS 7.0701	2013	EU600924	клада_247	НЕТ	НЕТ
Mobiluncus curtisii	1251	AEPZ01000013	клада_249	НЕТ	НЕТ
Enhydrobacter aerosaccus	785	ACYI01000081	клада_256	НЕТ	НЕТ
Moraxella osloensis	1262	JN175341	клада_256	НЕТ	НЕТ
Moraxella sp. GM2	1264	JF837191	клада_256	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium casei	420	JF951998	клада_257	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium epidermidis	421	NR_029262	клада_257	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium sanguinis	426	NR_028016	клада_257	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium sp. H15	427	AB177640	клада_257	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter radioresistens	35	ACVR01000010	клада_261	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus alimentarius	1068	NR_044701	клада_263	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus farciminis	1082	NR_044707	клада_263	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus kimchii	1097	NR_025045	клада_263	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus nodensis	1101	NR_041629	клада_263	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus tucseti	1138	NR_042194	клада_263	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas mendocina	1595	AAUL01000021	клада_265	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas pseudoalcaligenes	1598	NR_037000	клада_265	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas sp. NP522b	1602	EU723211	клада_265	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas stutzeri	1603	AM905854	клада_265	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus barsimensis	1390	NR_042272	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus barengoltzii	1391	NR_042756	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus chibensis	1392	NR_040885	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus cookii	1393	NR_025372	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus durus	1394	NR_037017	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus glucanolyticus	1395	D78470	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus lactis	1396	NR_025739	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus pabuli	1398	NR_040853	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus popilliae	1400	NR_040888	клада_270	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Paenibacillus sp. CIP 101062	1401	HM212646	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus sp. JC66	1404	JF824808	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus sp. R_27413	1405	HE586333	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus sp. R_27422	1406	HE586338	клада_270	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus timonensis	1408	NR_042844	клада_270	НЕТ	НЕТ
Rothia mucilaginosa	1651	ACVO01000020	клада_271	НЕТ	НЕТ
Rothia nasimurium	1652	NR_025310	клада_271	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 302	1550	ACZK01000043	клада_280	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон F68	1556	HM099652	клада_280	НЕТ	НЕТ
Prevotella tannerae	1563	ACIJ02000018	клада_280	НЕТ	НЕТ
Бактерия Prevotellaceae P4P_62 P1	1566	AY207061	клада_280	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas asaccharolytica	1471	AENO01000048	клада_281	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas gingivalis	1473	AE015924	клада_281	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas macacae	1475	NR_025908	клада_281	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas sp. UQD 301	1477	EU012301	клада_281	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas uenonis	1482	ACLR01000152	клада_281	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia buccalis	1165	CP001685	клада_282	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia hofstadii	1168	ACVB02000032	клада_282	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp., оральный клон HE012	1173	AY349386	клада_282	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp., оральный таксон 223	1176	GU408547	клада_282	НЕТ	НЕТ
Bacteroides fluxus	278	AFBN01000029	клада_285	НЕТ	НЕТ
Bacteroides helcogenes	281	CP002352	клада_285	НЕТ	НЕТ
Parabacteroides johnsonii	1419	ABYH01000014	клада_286	НЕТ	НЕТ
Parabacteroides merdae	1420	EU136685	клада_286	НЕТ	НЕТ
Treponema denticola	1926	ADEC01000002	клада_288	НЕТ	ОП
Treponema, геномовид P5 оральный клон MB3_P23	1929	DQ003624	клада_288	НЕТ	НЕТ
Treponema putidum	1935	AJ543428	клада_288	НЕТ	ОП
Treponema sp., оральный клон P2PB_53 P3	1942	AY207055	клада_288	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 247	1949	GU408748	клада_288	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон	1950	GU408776	клада_288	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
250					
Treponema sp., оральный таксон 251	1951	GU408781	клада_288	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus hydrogenalis	144	ABXA01000039	клада_289	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. 8404299	148	HM587318	клада_289	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. gpac215	156	AM176540	клада_289	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus vaginalis	158	ACXU01000016	клада_289	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium acidipropionici	1569	NC_019395	клада_290	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium avidum	1571	AJ003055	клада_290	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium granulosum	1573	FJ785716	клада_290	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium jensenii	1574	NR_042269	клада_290	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium propionicum	1575	NR_025277	клада_290	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium sp. H456	1577	AB177643	клада_290	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium thoenii	1581	NR_042270	клада_290	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium bifidum	349	ABQP01000027	клада_293	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc mesenteroides	1183	ACKV01000113	клада_295	НЕТ	НЕТ
Leuconostoc pseudomesenteroides	1184	NR_040814	клада_295	НЕТ	НЕТ
Johnsonella ignava	1016	X87152	клада_298	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium acnes	1570	ADJM01000010	клада_299	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium sp. 434_HC2	1576	AFIL01000035	клада_299	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium sp. LG	1578	AY354921	клада_299	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium sp. S555a	1579	AB264622	клада_299	НЕТ	НЕТ
Alicyclobacillus sp. CCUG 53762	128	HE613268	клада_301	НЕТ	НЕТ
Actinomyces cardiffensis	53	GU470888	клада_303	НЕТ	НЕТ
Actinomyces funkei	55	HQ906497	клада_303	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp. HKU31	74	HQ335393	клада_303	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp., оральный таксон C55	94	HM099646	клада_303	НЕТ	НЕТ
Kerstersia gyiorum	1018	NR_025669	клада_307	НЕТ	НЕТ
Pigmentiphaga daeguensis	1467	JN585327	клада_307	НЕТ	НЕТ
Aeromonas allosaccharophila	104	S39232	клада_308	НЕТ	НЕТ
Aeromonas enteropelogenes	105	X71121	клада_308	НЕТ	НЕТ
Aeromonas hydrophila	106	NC_008570	клада_308	НЕТ	НЕТ
Aeromonas jandaei	107	X60413	клада_308	НЕТ	НЕТ
Aeromonas salmonicida	108	NC_009348	клада_308	НЕТ	НЕТ
Aeromonas trota	109	X60415	клада_308	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Aeromonas veronii	110	NR_044845	клада_308	НЕТ	НЕТ
Marvinbryantia formatexigens	1196	AJ505973	клада_309	НЕТ	НЕТ
Rhodobacter sp., оральный таксон C30	1620	HM099648	клада_310	НЕТ	НЕТ
Rhodobacter sphaeroides	1621	CP000144	клада_310	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus antri	1071	ACLL01000037	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus coleohominis	1076	ACOH01000030	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus fermentum	1083	CP002033	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus gastricus	1085	AICN01000060	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus mucosae	1099	FR693800	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus oris	1103	AEKL01000077	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus pontis	1111	HM218420	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus reuteri	1112	ACGW02000012	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0707	1127	EU600911	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0709	1128	EU600913	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0711	1129	EU600915	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0713	1131	EU600917	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0716	1132	EU600921	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0718	1133	EU600922	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp., оральный таксон 052	1137	GQ422710	клада_313	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus vaginalis	1140	ACGV01000168	клада_313	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium aurantiacum	419	NR_044854	клада_314	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium linens	423	AJ315491	клада_314	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus pentosus	1108	JN813103	клада_315	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus plantarum	1110	ACGZ02000033	клада_315	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0702	1123	EU600906	клада_315	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0703	1124	EU600907	клада_315	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0704	1125	EU600908	клада_315	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0705	1126	EU600909	клада_315	НЕТ	НЕТ
Agrobacterium radiobacter	115	CP000628	клада_316	НЕТ	НЕТ
Agrobacterium tumefaciens	116	AJ389893	клада_316	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium argentoratense	685	EF463055	клада_317	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium diphtheriae	693	NC_002935	клада_317	НЕТ	ОП
Corynebacterium pseudotuberculosis	715	NR_037070	клада_317	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium renale	717	NR_037069	клада_317	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	731	NR_074467	клада_317	НЕТ	НЕТ
<i>Aurantimonas coralicida</i>	191	AY065627	клада_318	НЕТ	НЕТ
<i>Aureimonas altamirensis</i>	192	FN658986	клада_318	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	1066	NR_024718	клада_320	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1117	AEBA01000145	клада_320	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus</i> sp. KLDS 1.0719	1134	EU600923	клада_320	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1073	ACGH01000101	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus</i> , геномовид C1	1086	AY278619	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus</i> , геномовид C2	1087	AY278620	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1089	ACGP01000200	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus kefir</i>	1096	NR_042230	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	1105	NR_041294	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus parakefir</i>	1107	NR_029039	клада_321	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1079	NR_042437	клада_322	НЕТ	НЕТ
<i>Lactobacillus sakei</i>	1116	DQ989236	клада_322	НЕТ	НЕТ
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	167	AB101592	клада_323	НЕТ	НЕТ
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	168	NR_028657	клада_323	НЕТ	НЕТ
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	169	NR_036799	клада_323	НЕТ	НЕТ
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	170	NR_042271	клада_323	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus aureus</i>	1757	CP002643	клада_325	НЕТ	Категори я В
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1758	JQ624774	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus capitis</i>	1759	ACFR01000029	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus caprae</i>	1760	ACRH01000033	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus carnosus</i>	1761	NR_075003	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1762	JN175375	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus condimenti</i>	1763	NR_029345	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1764	ACHE01000056	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus equorum</i>	1765	NR_027520	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1767	NC_007168	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus hominis</i>	1768	AM157418	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1769	AEQA01000024	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1770	FJ189773	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	1771	CP002439	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1772	NR_029158	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1773	NC_007350	клада_325	НЕТ	НЕТ
<i>Staphylococcus</i> sp. клон bottae7	1777	AF467424	клада_325	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Staphylococcus sp. H292	1775	AB177642	клада_325	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus sp. H780	1776	AB177644	клада_325	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus succinus	1778	NR_028667	клада_325	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus warneri	1780	ACPZ01000009	клада_325	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus xylosus	1781	AY395016	клада_325	НЕТ	НЕТ
Cardiobacterium hominis	490	ACKY01000036	клада_326	НЕТ	НЕТ
Cardiobacterium valvarum	491	NR_028847	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas fluorescens	1593	AY622220	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas gessardii	1594	FJ943496	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas monteillii	1596	NR_024910	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas poae	1597	GU188951	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas putida	1599	AF094741	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas sp. G1229	1601	DQ910482	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas tolaasii	1604	AF320988	клада_326	НЕТ	НЕТ
Pseudomonas viridiflava	1605	NR_042764	клада_326	НЕТ	НЕТ
Listeria grayi	1185	ACCR02000003	клада_328	НЕТ	ОП
Listeria innocua	1186	JF967625	клада_328	НЕТ	НЕТ
Listeria ivanovii	1187	X56151	клада_328	НЕТ	НЕТ
Listeria monocytogenes	1188	CP002003	клада_328	НЕТ	Категори я В
Listeria welshimeri	1189	AM263198	клада_328	НЕТ	ОП
Capnocytophaga sp., оральный клон ASCH05	484	AY923149	клада_333	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sputigena	489	ABZV01000054	клада_333	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia, геномовид C1	1166	AY278621	клада_334	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia shahii	1169	AY029806	клада_334	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp. neutropenicПациент	1170	AF189244	клада_334	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp., оральный клон GT018	1171	AY349384	клада_334	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp., оральный клон GT020	1172	AY349385	клада_334	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 20_3	296	ACRQ01000064	клада_335	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 3_1_19	307	ADCJ01000062	клада_335	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 3_2_5	311	ACIB01000079	клада_335	НЕТ	НЕТ
Parabacteroides distasonis	1416	CP000140	клада_335	НЕТ	НЕТ
Parabacteroides goldsteinii	1417	AY974070	клада_335	НЕТ	НЕТ
Parabacteroides gordonii	1418	AB470344	клада_335	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Parabacteroides sp. D13	1421	ACPW01000017	клада_335	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga, геномовид C1	477	AY278613	клада_336	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga ochracea	480	AEOH01000054	клада_336	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp. GEJ8	481	GU561335	клада_336	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp. оральный штамм A47ROY	486	AY005077	клада_336	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp. S1b	482	U42009	клада_336	НЕТ	НЕТ
Paraprevotella clara	1426	AFFY01000068	клада_336	НЕТ	НЕТ
Bacteroides heparinolyticus	282	JN867284	клада_338	НЕТ	НЕТ
Prevotella heparinolytica	1500	GQ422742	клада_338	НЕТ	НЕТ
Treponema, геномовид P4 оральный клон MB2_G19	1928	DQ003618	клада_339	НЕТ	НЕТ
Treponema, геномовид P6 оральный клон MB4_G11	1930	DQ003625	клада_339	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 254	1952	GU408803	клада_339	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 508	1956	GU413616	клада_339	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 518	1957	GU413640	клада_339	НЕТ	НЕТ
Chlamydia muridarum	502	AE002160	клада_341	НЕТ	ОП
Chlamydia trachomatis	504	U68443	клада_341	НЕТ	ОП
Chlamydia psittaci	503	NR_036864	клада_342	НЕТ	Категори я В
Chlamydophila pneumoniae	509	NC_002179	клада_342	НЕТ	ОП
Chlamydophila psittaci	510	D85712	клада_342	НЕТ	ОП
Anaerococcus octavius	146	NR_026360	клада_343	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. 8405254	149	HM587319	клада_343	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. 9401487	150	HM587322	клада_343	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. 9403502	151	HM587325	клада_343	НЕТ	НЕТ
Gardnerella vaginalis	923	CP001849	клада_344	НЕТ	НЕТ
Campylobacter lari	466	CP000932	клада_346	НЕТ	ОП
Anaerobiospirillum succiniciproducens	142	NR_026075	клада_347	НЕТ	НЕТ
Anaerobiospirillum thomasi	143	AJ420985	клада_347	НЕТ	НЕТ
Ruminobacter amylophilus	1654	NR_026450	клада_347	НЕТ	НЕТ
Succinatimonas hippie	1897	AEVO01000027	клада_347	НЕТ	НЕТ
Actinomyces europaeus	54	NR_026363	клада_348	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Actinomyces sp., оральный клон GU009	82	AY349361	клада_348	НЕТ	НЕТ
Moraxella catarrhalis	1260	CP002005	клада_349	НЕТ	НЕТ
Moraxella lincolnii	1261	FR822735	клада_349	НЕТ	НЕТ
Moraxella sp. 16285	1263	JF682466	клада_349	НЕТ	НЕТ
Psychrobacter sp. 13983	1613	HM212668	клада_349	НЕТ	НЕТ
Actinobaculum massiliae	49	AF487679	клада_350	НЕТ	НЕТ
Actinobaculum schaalii	50	AY957507	клада_350	НЕТ	НЕТ
Actinobaculum sp. BM#101342	51	AY282578	клада_350	НЕТ	НЕТ
Actinobaculum sp. P2P_19 P1	52	AY207066	клада_350	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp., оральный клон IO076	84	AY349363	клада_350	НЕТ	НЕТ
Actinomyces sp., оральный таксон 848	93	ACUY01000072	клада_350	НЕТ	НЕТ
Actinomyces neuui	65	X71862	клада_352	НЕТ	НЕТ
Mobiluncus mulieris	1252	ACKW01000035	клада_352	НЕТ	НЕТ
Blastomonas natatoria	372	NR_040824	клада_356	НЕТ	НЕТ
Novosphingobium aromaticivorans	1357	AAAV03000008	клада_356	НЕТ	НЕТ
Sphingomonas sp., оральный клон FI012	1745	AY349411	клада_356	НЕТ	НЕТ
Sphingopyxis alaskensis	1749	CP000356	клада_356	НЕТ	НЕТ
Oxalobacter formigenes	1389	ACDQ01000020	клада_357	НЕТ	НЕТ
Veillonella atypical	1974	AEDS01000059	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella dispar	1975	ACIK02000021	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella, геномовид P1 оральный клон MB5_P17	1976	DQ003631	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella parvula	1978	ADFU01000009	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. 3_1_44	1979	ADCV01000019	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. 6_1_27	1980	ADCW01000016	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. ACP1	1981	HQ616359	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. AS16	1982	HQ616365	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. BS32b	1983	HQ616368	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. ICM51a	1984	HQ616396	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. MSA12	1985	HQ616381	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. NVG 100cf	1986	EF108443	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp. OK11	1987	JN695650	клада_358	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp., оральный клон	1990	AY923144	клада_358	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
ASCG01					
5 Veillonella sp., оральный клон ASCG02	1991	AY953257	клада_358	НЕТ	НЕТ
10 Veillonella sp., оральный клон OH1A	1992	AY947495	клада_358	НЕТ	НЕТ
15 Veillonella sp., оральный таксон 158	1993	AENU01000007	клада_358	НЕТ	НЕТ
Kocuria marina	1040	GQ260086	клада_365	НЕТ	НЕТ
Kocuria rhizophila	1042	AY030315	клада_365	НЕТ	НЕТ
20 Kocuria rosea	1043	X87756	клада_365	НЕТ	НЕТ
25 Kocuria varians	1044	AF542074	клада_365	НЕТ	НЕТ
Бактерия Clostridiaceae END_2	531	EF451053	клада_368	НЕТ	НЕТ
Micrococcus antarcticus	1242	NR_025285	клада_371	НЕТ	НЕТ
Micrococcus luteus	1243	NR_075062	клада_371	НЕТ	НЕТ
30 Micrococcus lylae	1244	NR_026200	клада_371	НЕТ	НЕТ
Micrococcus sp. 185	1245	EU714334	клада_371	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus brevis	1072	EU194349	клада_372	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus parabrevis	1104	NR_042456	клада_372	НЕТ	НЕТ
35 Pediococcus acidilactici	1436	ACXB01000026	клада_372	НЕТ	НЕТ
Pediococcus pentosaceus	1437	NR_075052	клада_372	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus dextrinicus	1081	NR_036861	клада_373	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus perolens	1109	NR_029360	клада_373	НЕТ	НЕТ
40 Lactobacillus rhamnosus	1113	ABWJ01000068	клада_373	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus saniviri	1118	AB602569	клада_373	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. BT6	1121	HQ616370	клада_373	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium mageritense	1282	FR798914	клада_374	НЕТ	ОП
Mycobacterium neoaurum	1286	AF268445	клада_374	НЕТ	ОП
45 Mycobacterium smegmatis	1291	CP000480	клада_374	НЕТ	ОП
Mycobacterium sp. HE5	1304	AJ012738	клада_374	НЕТ	НЕТ
Dysgonomonas gadei	775	ADLV01000001	клада_377	НЕТ	НЕТ
Dysgonomonas mossii	776	ADLW01000023	клада_377	НЕТ	НЕТ
50 Porphyromonas levii	1474	NR_025907	клада_377	НЕТ	НЕТ
Porphyromonas somerae	1476	AB547667	клада_377	НЕТ	НЕТ
Bacteroides barnesiae	267	NR_041446	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides coprocola	272	ABIY02000050	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides coprophilus	273	ACBW01000012	клада_378	НЕТ	НЕТ
55 Bacteroides dorei	274	ABWZ01000093	клада_378	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенный статус
Bacteroides massiliensis	284	AB200226	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides plebeius	289	AB200218	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 3_1_33FAA	309	ACPS01000085	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 3_1_40A	310	ACRT01000136	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 4_3_47FAA	313	ACDR02000029	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 9_1_42FAA	314	ACAA01000096	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. NB_8	323	AB117565	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides vulgatus	331	CP000139	клада_378	НЕТ	НЕТ
Bacteroides ovatus	287	ACWH01000036	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 1_1_30	294	ADCL01000128	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 2_1_22	297	ACPQ01000117	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 2_2_4	299	ABZZ01000168	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 3_1_23	308	ACRS01000081	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. D1	318	ACAB02000030	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. D2	321	ACGA01000077	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. D22	320	ADCK01000151	клада_38	НЕТ	НЕТ
Bacteroides xylanisolvens	332	ADKP01000087	клада_38	НЕТ	НЕТ
Treponema лецитинолитическое	1931	NR_026247	клада_380	НЕТ	ОП
Treponema parvum	1933	AF302937	клада_380	НЕТ	ОП
Treponema sp., оральная колония JU025	1940	AY349417	клада_380	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральная колония 270	1954	GQ422733	клада_380	НЕТ	НЕТ
Parascardovia denticolens	1428	ADEB01000020	клада_381	НЕТ	НЕТ
Scardovia inopinata	1688	AB029087	клада_381	НЕТ	НЕТ
Scardovia wiggsiae	1689	AY278626	клада_381	НЕТ	НЕТ
Бактерия Clostridiales 9400853	533	HM587320	клада_384	НЕТ	НЕТ
Mogibacterium diversum	1254	NR_027191	клада_384	НЕТ	НЕТ
Mogibacterium neglectum	1255	NR_027203	клада_384	НЕТ	НЕТ
Mogibacterium pumilum	1256	NR_028608	клада_384	НЕТ	НЕТ
Mogibacterium timidum	1257	Z36296	клада_384	НЕТ	НЕТ
Borrelia burgdorferi	389	ABGI01000001	клада_386	НЕТ	ОП
Borrelia garinii	392	ABJV01000001	клада_386	НЕТ	ОП
Borrelia sp. NE49	397	AJ224142	клада_386	НЕТ	ОП
Caldimonas manganoxidans	457	NR_040787	клада_387	НЕТ	НЕТ
Бактерия Comamonadaceae, оральная колония F47	667	HM099651	клада_387	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Lautropia mirabilis	1149	AEQP01000026	клада_387	НЕТ	НЕТ
Lautropia sp., оральный клон AP009	1150	AY005030	клада_387	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus asaccharolyticus	1441	D14145	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus duerdenii	1442	EU526290	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus harei	1443	NR_026358	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus indolicus	1444	AY153431	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus lacrimalis	1446	ADDO01000050	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus sp. gpac077	1450	AM176527	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus sp. JC140	1447	JF824803	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus sp., оральный таксон 386	1452	ADCS01000031	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus sp., оральный таксон 836	1453	AEAA01000090	клада_389	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcaceae бактерия ph1	1454	JN837495	клада_389	НЕТ	НЕТ
Dialister pneumosintes	765	HM596297	клада_390	НЕТ	НЕТ
Dialister sp., оральный таксон 502	767	GQ422739	клада_390	НЕТ	НЕТ
Cupriavidus metallidurans	741	GU230889	клада_391	НЕТ	НЕТ
Herbaspirillum seropedicae	1001	CP002039	клада_391	НЕТ	НЕТ
Herbaspirillum sp. JC206	1002	JN657219	клада_391	НЕТ	НЕТ
Janthinobacterium sp. SY12	1015	EF455530	клада_391	НЕТ	НЕТ
Massilia sp. CCUG 43427A	1197	FR773700	клада_391	НЕТ	НЕТ
Ralstonia pickettii	1615	NC_010682	клада_391	НЕТ	НЕТ
Ralstonia sp. 5_7_47FAA	1616	ACUF01000076	клада_391	НЕТ	НЕТ
Francisella novicida	889	ABSS01000002	клада_392	НЕТ	НЕТ
Francisella philomiragia	890	AY928394	клада_392	НЕТ	НЕТ
Francisella tularensis	891	ABAZ01000082	клада_392	НЕТ	Категори я А
Ignatzschineria indica	1009	HQ823562	клада_392	НЕТ	НЕТ
Ignatzschineria sp. NML 95_0260	1010	HQ823559	клада_392	НЕТ	НЕТ
Streptococcus mutans	1814	AP010655	клада_394	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus gasseri	1084	AC0Z01000018	клада_398	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus hominis	1090	FR681902	клада_398	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus iners	1091	AEKJ01000002	клада_398	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus johnsonii	1093	AE017198	клада_398	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus senioris	1119	AB602570	клада_398	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Lactobacillus sp., оральный клон HT002	1135	AY349382	клада_398	НЕТ	НЕТ
Weissella beninensis	2006	EU439435	клада_398	НЕТ	НЕТ
Sphingomonas echinoides	1744	NR_024700	клада_399	НЕТ	НЕТ
Sphingomonas sp., оральный таксон A09	1747	HM099639	клада_399	НЕТ	НЕТ
Sphingomonas sp., оральный таксон F71	1748	HM099645	клада_399	НЕТ	НЕТ
Zymomonas mobilis	2032	NR_074274	клада_399	НЕТ	НЕТ
Arcanobacterium haemolyticum	174	NR_025347	клада_400	НЕТ	НЕТ
Arcanobacterium pyogenes	175	GU585578	клада_400	НЕТ	НЕТ
Trueperella pyogenes	1962	NR_044858	клада_400	НЕТ	НЕТ
Lactococcus garvieae	1144	AF061005	клада_401	НЕТ	НЕТ
Lactococcus lactis	1145	CP002365	клада_401	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium mcbrellneri	424	ADNU01000076	клада_402	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium paucivorans	425	EU086796	клада_402	НЕТ	НЕТ
Brevibacterium sp. JC43	428	JF824806	клада_402	НЕТ	НЕТ
Selenomonas artemidis	1692	HM596274	клада_403	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp. FOBRC9	1704	HQ616378	клада_403	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный таксон 137	1715	AENV01000007	клада_403	НЕТ	НЕТ
Desmospora activa	751	AM940019	клада_404	НЕТ	НЕТ
Desmospora sp. 8437	752	AFHT01000143	клада_404	НЕТ	НЕТ
Paenibacillus sp., оральный таксон F45	1407	HM099647	клада_404	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium ammoniagenes	682	ADNS01000011	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium aurimucosum	687	ACLH01000041	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium bovis	688	AF537590	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium canis	689	GQ871934	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium casei	690	NR_025101	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium durum	694	Z97069	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium efficiens	695	ACLI01000121	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium falsenii	696	Y13024	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium flavescens	697	NR_037040	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium glutamicum	701	BA000036	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium jeikeium	704	ACYW01000001	клада_405	НЕТ	ОП
Corynebacterium kroppenstedtii	705	NR_026380	клада_405	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium lipophiloflavum	706	ACHJ01000075	клада_405	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	709	ACSH02000003	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	710	X82064	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium resistens</i>	718	ADGN01000058	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium simulans</i>	720	AF537604	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium singulare</i>	721	NR_026394	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium</i> sp. 1 ex sheep	722	Y13427	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium</i> sp. NML 99_0018	726	GU238413	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Corynebacterium striatum</i>	727	ACGE01000001	клада_405	НЕТ	ОП
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	732	X81913	клада_405	НЕТ	ОП
<i>Corynebacterium variabile</i>	734	NR_025314	клада_405	НЕТ	НЕТ
<i>Aerococcus sanguincola</i>	98	AY837833	клада_407	НЕТ	НЕТ
<i>Aerococcus urinae</i>	99	CP002512	клада_407	НЕТ	НЕТ
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	100	NR_043443	клада_407	НЕТ	НЕТ
<i>Aerococcus viridans</i>	101	ADNT01000041	клада_407	НЕТ	НЕТ
<i>Fusobacterium naviforme</i>	898	HQ223106	клада_408	НЕТ	НЕТ
<i>Moryella indoligenes</i>	1268	AF527773	клада_408	НЕТ	НЕТ
<i>Selenomonas</i> , геномовид P5	1697	AY341820	клада_410	НЕТ	НЕТ
<i>Selenomonas</i> sp., оральный клон IQ048	1710	AY349408	клада_410	НЕТ	НЕТ
<i>Selenomonas sputigena</i>	1717	ACKP02000033	клада_410	НЕТ	НЕТ
<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	1007	AY468372	клада_411	НЕТ	НЕТ
<i>Methylocella silvestris</i>	1228	NR_074237	клада_411	НЕТ	НЕТ
<i>Legionella pneumophila</i>	1153	NC_002942	клада_412	НЕТ	ОП
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	1077	NR_044705	клада_413	НЕТ	НЕТ
<i>Arthrobacter agilis</i>	178	NR_026198	клада_414	НЕТ	НЕТ
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	179	NR_074608	клада_414	НЕТ	НЕТ
<i>Arthrobacter bergerei</i>	180	NR_025612	клада_414	НЕТ	НЕТ
<i>Arthrobacter globiformis</i>	181	NR_026187	клада_414	НЕТ	НЕТ
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	182	NR_026190	клада_414	НЕТ	НЕТ
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1269	AGQU01000002	клада_418	НЕТ	ОП
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1273	AB548610	клада_418	НЕТ	ОП
<i>Bacteroides salanitronis</i>	291	CP002530	клада_419	НЕТ	НЕТ
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	1427	AFBR01000011	клада_419	НЕТ	НЕТ
<i>Barnesiella intestinihominis</i>	336	AB370251	клада_420	НЕТ	НЕТ
<i>Barnesiella viscericola</i>	337	NR_041508	клада_420	НЕТ	НЕТ
<i>Parabacteroides</i> sp. NS31_3	1422	JN029805	клада_420	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Бактерия Porphyromonadaceae NML 060648	1470	EF184292	клада_420	НЕТ	НЕТ
Tannerella forsythia	1913	CP003191	клада_420	НЕТ	НЕТ
Tannerella sp. 6_1_58FAA_CT1	1914	ACWX01000068	клада_420	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma amphoriforme	1311	AY531656	клада_421	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma genitalium	1317	L43967	клада_421	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma pneumoniae	1322	NC_000912	клада_421	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma penetrans	1321	NC_004432	клада_422	НЕТ	НЕТ
Ureaplasma parvum	1966	AE002127	клада_422	НЕТ	НЕТ
Ureaplasma urealyticum	1967	AAYN01000002	клада_422	НЕТ	НЕТ
Treponema, геномovid P1	1927	AY341822	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 228	1943	GU408580	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 230	1944	GU408603	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 231	1945	GU408631	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 232	1946	GU408646	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 235	1947	GU408673	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema sp. ovine footrot	1959	AJ010951	клада_425	НЕТ	НЕТ
Treponema vincentii	1960	ACYH01000036	клада_425	НЕТ	ОП
Burkholderiales бактерия 1_1_47	452	ADCQ01000066	клада_432	НЕТ	ОП
Parasutterella excrementihominis	1429	AFBP01000029	клада_432	НЕТ	НЕТ
Parasutterella secunda	1430	AB491209	клада_432	НЕТ	НЕТ
Sutterella morbirenis	1898	AJ832129	клада_432	НЕТ	НЕТ
Sutterella sanguinus	1900	AJ748647	клада_432	НЕТ	НЕТ
Sutterella sp. YIT 12072	1901	AB491210	клада_432	НЕТ	НЕТ
Sutterella stercoricanis	1902	NR_025600	клада_432	НЕТ	НЕТ
Sutterella wadsworthensis	1903	ADMF01000048	клада_432	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium freudenreichii	1572	NR_036972	клада_433	НЕТ	НЕТ
Propionibacterium sp., оральный таксон 192	1580	GQ422728	клада_433	НЕТ	НЕТ
Tessaracoccus sp., оральный таксон F04	1917	HM099640	клада_433	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus ivorii	1445	Y07840	клада_434	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus sp. gpac007	1448	AM176517	клада_434	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Peptoniphilus sp. gpac018A	1449	AM176519	клада_434	НЕТ	НЕТ
Peptoniphilus sp. gpac148	1451	AM176535	клада_434	НЕТ	НЕТ
Flexispira rappini	887	AY126479	клада_436	НЕТ	НЕТ
Helicobacter bilis	993	ACDN01000023	клада_436	НЕТ	НЕТ
Helicobacter cinaedi	995	ABQT01000054	клада_436	НЕТ	НЕТ
Helicobacter sp. Het	998	U44756	клада_436	НЕТ	НЕТ
Brevundimonas subvibrioides	429	CP002102	клада_438	НЕТ	НЕТ
Hyphomonas neptunium	1008	NR_074092	клада_438	НЕТ	НЕТ
Phenylobacterium zucineum	1465	AY628697	клада_438	НЕТ	НЕТ
Streptococcus downei	1793	AEKN01000002	клада_441	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. SHV515	1848	Y07601	клада_441	НЕТ	НЕТ
Acinetobacter sp. CIP 53.82	40	JQ638584	клада_443	НЕТ	НЕТ
Halomonas elongata	990	NR_074782	клада_443	НЕТ	НЕТ
Halomonas johnsoniae	991	FR775979	клада_443	НЕТ	НЕТ
Butyrivibrio fibrisolvens	456	U41172	клада_444	НЕТ	НЕТ
Roseburia sp. 11SE37	1640	FM954975	клада_444	НЕТ	НЕТ
Roseburia sp. 11SE38	1641	FM954976	клада_444	НЕТ	НЕТ
Shuttleworthia satellites	1728	ACIP02000004	клада_444	НЕТ	НЕТ
Shuttleworthia sp. MSX8B	1729	HQ616383	клада_444	НЕТ	НЕТ
Shuttleworthia sp., оральный таксон G69	1730	GU432167	клада_444	НЕТ	НЕТ
Bdellovibrio sp. MPA	344	AY294215	клада_445	НЕТ	НЕТ
Desulfohalobium sp., оральный клон CH031	755	AY005036	клада_445	НЕТ	НЕТ
Desulfovibrio desulfuricans	757	DQ092636	клада_445	НЕТ	НЕТ
Desulfovibrio fairfieldensis	758	U42221	клада_445	НЕТ	НЕТ
Desulfovibrio piger	759	AF192152	клада_445	НЕТ	НЕТ
Desulfovibrio sp. 3_1_syn3	760	ADDR01000239	клада_445	НЕТ	НЕТ
Geobacter bemidjiensis	941	CP001124	клада_445	НЕТ	НЕТ
Brachybacterium alimentarium	401	NR_026269	клада_446	НЕТ	НЕТ
Brachybacterium conglomeratum	402	AB537169	клада_446	НЕТ	НЕТ
Brachybacterium tyrofermentans	403	NR_026272	клада_446	НЕТ	НЕТ
Dermabacter hominis	749	FJ263375	клада_446	НЕТ	НЕТ
Aneurinibacillus thermoaerophilus	171	NR_029303	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus agri	409	NR_040983	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus centrosporus	411	NR_043414	клада_448	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогени й статус
Brevibacillus choshinensis	412	NR_040980	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus invocatus	413	NR_041836	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus parabrevis	415	NR_040981	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus reuszeri	416	NR_040982	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus sp. phR	417	JN837488	клада_448	НЕТ	НЕТ
Brevibacillus thermoruber	418	NR_026514	клада_448	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus murinus	1100	NR_042231	клада_449	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus oeni	1102	NR_043095	клада_449	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus ruminis	1115	ACGS02000043	клада_449	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus vini	1141	NR_042196	клада_449	НЕТ	НЕТ
Gemella haemolysans	924	ACDZ02000012	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella morbillorum	925	NR_025904	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella morbillorum	926	ACRX01000010	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella sanguinis	927	ACRY01000057	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella sp., оральный клон ASCE02	929	AY923133	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella sp., оральный клон ASCF04	930	AY923139	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella sp., оральный клон ASCF12	931	AY923143	клада_450	НЕТ	НЕТ
Gemella sp. WAL 1945J	928	EU427463	клада_450	НЕТ	НЕТ
Sporolactobacillus nakayamae	1753	NR_042247	клада_451	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter entanii	945	NR_028909	клада_452	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter europaeus	946	NR_026513	клада_452	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter hansenii	947	NR_026133	клада_452	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter oboediens	949	NR_041295	клада_452	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter xylinus	950	NR_074338	клада_452	НЕТ	НЕТ
Auritibacter ignavus	193	FN554542	клада_453	НЕТ	НЕТ
Dermacoccus sp. Ellin185	750	AEIQ01000090	клада_453	НЕТ	НЕТ
Janibacter limosus	1013	NR_026362	клада_453	НЕТ	НЕТ
Janibacter melonis	1014	EF063716	клада_453	НЕТ	НЕТ
Acetobacter aceti	7	NR_026121	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter fabarum	8	NR_042678	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter lovaniensis	9	NR_040832	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter malorum	10	NR_025513	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter orientalis	11	NR_028625	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter pasteurianus	12	NR_026107	клада_454	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Acetobacter pomorum	13	NR_042112	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter syzygii	14	NR_040868	клада_454	НЕТ	НЕТ
Acetobacter tropicalis	15	NR_036881	клада_454	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter azotocaptans	943	NR_028767	клада_454	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter diazotrophicus	944	NR_074292	клада_454	НЕТ	НЕТ
Gluconacetobacter johannae	948	NR_024959	клада_454	НЕТ	НЕТ
Nocardia brasiliensis	1351	AIHV01000038	клада_455	НЕТ	НЕТ
Nocardia cyriacigeorgica	1352	HQ009486	клада_455	НЕТ	НЕТ
Nocardia puris	1354	NR_028994	клада_455	НЕТ	НЕТ
Nocardia sp. 01_Je_025	1355	GU574059	клада_455	НЕТ	НЕТ
Rhodococcus equi	1623	ADNW01000058	клада_455	НЕТ	НЕТ
Oceanobacillus caeni	1358	NR_041533	клада_456	НЕТ	НЕТ
Oceanobacillus sp. Ndiop	1359	CAER01000083	клада_456	НЕТ	НЕТ
Ornithinibacillus bavariensis	1384	NR_044923	клада_456	НЕТ	НЕТ
Ornithinibacillus sp. 7_10A1A	1385	FN397526	клада_456	НЕТ	НЕТ
Virgibacillus proomii	2005	NR_025308	клада_456	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium amycolatum	683	ABZU01000033	клада_457	НЕТ	ОП
Corynebacterium hansenii	702	AM946639	клада_457	НЕТ	НЕТ
Corynebacterium xerosis	735	FN179330	клада_457	НЕТ	ОП
Бактерия Staphylococcaceae NML 92_0017	1756	AY841362	клада_458	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus fleurettii	1766	NR_041326	клада_458	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus sciuri	1774	NR_025520	клада_458	НЕТ	НЕТ
Staphylococcus vitulinus	1779	NR_024670	клада_458	НЕТ	НЕТ
Stenotrophomonas maltophilia	1782	AAVZ01000005	клада_459	НЕТ	НЕТ
Stenotrophomonas sp. FG_6	1783	EF017810	клада_459	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium africanum	1270	AF480605	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium alsiensis	1271	AJ938169	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium avium	1272	CP000479	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium colombiense	1274	AM062764	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium gordonae	1276	GU142930	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium intracellulare	1277	GQ153276	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium kansasii	1278	AF480601	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium lacus	1279	NR_025175	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium leprae	1280	FM211192	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium lepromatosis	1281	EU203590	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium mantenii	1283	FJ042897	клада_46	НЕТ	ОП

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Mycobacterium marinum	1284	NC_010612	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium microti	1285	NR_025234	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium parascrofulaceum	1287	ADNV01000350	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium seoulense	1290	DQ536403	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium sp. 1761	1292	EU703150	клада_46	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. 1791	1295	EU703148	клада_46	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. 1797	1296	EU703149	клада_46	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. B10_07.09.0206	1298	HQ174245	клада_46	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. NLA001000736	1305	HM627011	клада_46	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium sp. W	1306	DQ437715	клада_46	НЕТ	НЕТ
Mycobacterium tuberculosis	1307	CP001658	клада_46	НЕТ	Категори я С
Mycobacterium ulcerans	1308	AB548725	клада_46	НЕТ	ОП
Mycobacterium vulneris	1309	EU834055	клада_46	НЕТ	ОП
Xanthomonas campestris	2016	EF101975	клада_461	НЕТ	НЕТ
Xanthomonas sp. kmd_489	2017	EU723184	клада_461	НЕТ	НЕТ
Dietzia natronolimnaea	769	GQ870426	клада_462	НЕТ	НЕТ
Dietzia sp. BBDP51	770	DQ337512	клада_462	НЕТ	НЕТ
Dietzia sp. CA149	771	GQ870422	клада_462	НЕТ	НЕТ
Dietzia timorensis	772	GQ870424	клада_462	НЕТ	НЕТ
Gordonia bronchialis	951	NR_027594	клада_463	НЕТ	НЕТ
Gordonia polyisoprenivorans	952	DQ385609	клада_463	НЕТ	НЕТ
Gordonia sp. KTR9	953	DQ068383	клада_463	НЕТ	НЕТ
Gordonia sputi	954	FJ536304	клада_463	НЕТ	НЕТ
Gordonia terrae	955	GQ848239	клада_463	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia goodfellowii	1167	ADAD01000110	клада_465	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp., оральный клон IK040	1174	AY349387	клада_465	НЕТ	НЕТ
Leptotrichia sp., оральный клон P2PB_51 P1	1175	AY207053	клада_465	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P7 оральный клон MB3_P19	264	DQ003623	клада_466	НЕТ	НЕТ
Butyricimonas virosa	454	AB443949	клада_466	НЕТ	НЕТ
Odoribacter laneus	1363	AB490805	клада_466	НЕТ	НЕТ
Odoribacter splanchnicus	1364	CP002544	клада_466	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga gingivalis	478	ACLQ01000011	клада_467	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Capnocytophaga granulosa	479	X97248	клада_467	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp., оральный клон AH015	483	AY005074	клада_467	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp. оральный штамм S3	487	AY005073	клада_467	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp., оральный таксон 338	488	AEXX01000050	клада_467	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga canimorsus	476	CP002113	клада_468	НЕТ	НЕТ
Capnocytophaga sp., оральный клон ID062	485	AY349368	клада_468	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus cateniformis	1075	M23729	клада_469	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus vitulinus	1142	NR_041305	клада_469	НЕТ	НЕТ
Cetobacterium somerae	501	AJ438155	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium gonidiaformans	896	ACET01000043	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium mortiferum	897	ACDB02000034	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium necrogenes	899	X55408	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium necrophorum	900	AM905356	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 12_1B	905	AGWJ01000070	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 3_1_5R	911	ACDD01000078	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. D12	918	ACDG02000036	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium ulcerans	921	ACDH01000090	клада_470	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium varium	922	ACIE01000009	клада_470	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma arthritidis	1312	NC_011025	клада_473	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma faucium	1314	NR_024983	клада_473	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma hominis	1318	AF443616	клада_473	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma orale	1319	AY796060	клада_473	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma salivarium	1324	M24661	клада_473	НЕТ	НЕТ
Mitsuokella jalaludinii	1247	NR_028840	клада_474	НЕТ	НЕТ
Mitsuokella multacida	1248	ABWK02000005	клада_474	НЕТ	НЕТ
Mitsuokella sp., оральный таксон 521	1249	GU413658	клада_474	НЕТ	НЕТ
Mitsuokella sp., оральный таксон G68	1250	GU432166	клада_474	НЕТ	НЕТ
Selenomonas, геномовид C1	1695	AY278627	клада_474	НЕТ	НЕТ
Selenomonas, геномовид P8 оральный клон MB5_P06	1700	DQ003628	клада_474	НЕТ	НЕТ
Selenomonas ruminantium	1703	NR_075026	клада_474	НЕТ	НЕТ
Veillonellaceae бактерия,	1994	GU402916	клада_474	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообро- вители	Патогенны й статус
оральный таксон 131					
Alloscardovia omnicoles	139	NR_042583	клада_475	НЕТ	НЕТ
Alloscardovia sp. OB7196	140	AB425070	клада_475	НЕТ	НЕТ
Bifidobacterium urinalis	366	AJ278695	клада_475	НЕТ	НЕТ
Prevotella loescheii	1503	JN867231	клада_48	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон ASCG12	1530	DQ272511	клада_48	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон GU027	1540	AY349398	клада_48	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 472	1553	ACZS01000106	клада_48	НЕТ	НЕТ
Selenomonas dianaе	1693	GQ422719	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas flueggei	1694	AF287803	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas, геномовид C2	1696	AY278628	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas, геномовид P6 оральный клон MB3_C41	1698	DQ003636	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas, геномовид P7 оральный клон MB5_C08	1699	DQ003627	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas infelix	1701	AF287802	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas noxia	1702	GU470909	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон FT050	1705	AY349403	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон GI064	1706	AY349404	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон GT010	1707	AY349405	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон HU051	1708	AY349406	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон IK004	1709	AY349407	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон JI021	1711	AY349409	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон JS031	1712	AY349410	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон OH4A	1713	AY947498	клада_480	НЕТ	НЕТ
Selenomonas sp., оральный клон P2PA_80 P4	1714	AY207052	клада_480	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогени й статус
Selenomonas sp., оральный таксон 149	1716	AEEJ01000007	клада_480	НЕТ	НЕТ
Бактерия Veillonellaceae, оральный таксон 155	1995	GU470897	клада_480	НЕТ	НЕТ
Agrococcus jenensis	117	NR_026275	клада_484	НЕТ	НЕТ
Microbacterium gubbeenense	1232	NR_025098	клада_484	НЕТ	НЕТ
Pseudoclavibacter sp. Timone	1590	FJ375951	клада_484	НЕТ	НЕТ
Tropheryma whipplei	1961	BX251412	клада_484	НЕТ	НЕТ
Zimmermannella bifida	2031	AB012592	клада_484	НЕТ	НЕТ
Legionella hackeliae	1151	M36028	клада_486	НЕТ	ОП
Legionella longbeachae	1152	M36029	клада_486	НЕТ	ОП
Legionella sp. D3923	1154	JN380999	клада_486	НЕТ	ОП
Legionella sp. D4088	1155	JN381012	клада_486	НЕТ	ОП
Legionella sp. H63	1156	JF831047	клада_486	НЕТ	ОП
Legionella sp. NML 93L054	1157	GU062706	клада_486	НЕТ	ОП
Legionella steelei	1158	HQ398202	клада_486	НЕТ	ОП
Tatlockia micdadei	1915	M36032	клада_486	НЕТ	НЕТ
Helicobacter pullorum	996	ABQU01000097	клада_489	НЕТ	НЕТ
Acetobacteraceae бактерия AT_5844	16	AGEZ01000040	клада_490	НЕТ	НЕТ
Roseomonas cervicalis	1643	ADV.L01000363	клада_490	НЕТ	НЕТ
Roseomonas mucosa	1644	NR_028857	клада_490	НЕТ	НЕТ
Roseomonas sp. NML94_0193	1645	AF533357	клада_490	НЕТ	НЕТ
Roseomonas sp. NML97_0121	1646	AF533359	клада_490	НЕТ	НЕТ
Roseomonas sp. NML98_0009	1647	AF533358	клада_490	НЕТ	НЕТ
Roseomonas sp. NML98_0157	1648	AF533360	клада_490	НЕТ	НЕТ
Rickettsia akari	1627	CP000847	клада_492	НЕТ	ОП
Rickettsia conorii	1628	AE008647	клада_492	НЕТ	ОП
Rickettsia prowazekii	1629	M21789	клада_492	НЕТ	Категори я В
Rickettsia rickettsii	1630	NC_010263	клада_492	НЕТ	ОП
Rickettsia slovaca	1631	L36224	клада_492	НЕТ	ОП
Rickettsia typhi	1632	AE017197	клада_492	НЕТ	ОП
Anaeroglobus geminatus	160	AGCJ01000054	клада_493	НЕТ	НЕТ
Megasphaera, геномовид C1	1201	AY278622	клада_493	НЕТ	НЕТ
Megasphaera micronuciformis	1203	AECS01000020	клада_493	НЕТ	НЕТ
Clostridiales, геномовид BVAB3	540	CP001850	клада_495	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Tsukamurella paurometabola	1963	X80628	клада_496	НЕТ	НЕТ
Tsukamurella tyrosinosolvens	1964	AB478958	клада_496	НЕТ	НЕТ
Abiotrophia para_adiacens	2	AB022027	клада_497	НЕТ	НЕТ
Carnobacterium divergens	492	NR_044706	клада_497	НЕТ	НЕТ
Carnobacterium maltaromaticum	493	NC_019425	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus avium	800	AF133535	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus caccae	801	AY943820	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus casseliflavus	802	AEWT01000047	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus durans	803	AJ276354	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus faecalis	804	AE016830	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus faecium	805	AM157434	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus gallinarum	806	AB269767	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus gilvus	807	AY033814	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus hawaiiensis	808	AY321377	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus hirae	809	AF061011	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus italicus	810	AEPV01000109	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus mundtii	811	NR_024906	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus raffinosus	812	FN600541	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus sp. BV2CASA2	813	JN809766	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus sp. CCRI_16620	814	GU457263	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus sp. F95	815	FJ463817	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus sp. RfL6	816	AJ133478	клада_497	НЕТ	НЕТ
Enterococcus thailandicus	817	AY321376	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium canifelinum	893	AY162222	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium, геномовид C1	894	AY278616	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium, геномовид C2	895	AY278617	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium periodonticum	902	ACJY01000002	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 1_1_41FAA	906	ADGG01000053	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 11_3_2	904	ACUO01000052	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 2_1_31	907	ACDC02000018	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 3_1_27	908	ADGF01000045	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 3_1_33	909	ACQE01000178	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. 3_1_36A2	910	ACPU01000044	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. AC18	912	HQ616357	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. ACB2	913	HQ616358	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. AS2	914	HQ616361	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. CM1	915	HQ616371	клада_497	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Fusobacterium sp. CM21	916	HQ616375	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp. CM22	917	HQ616376	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp., оральный клон ASCF06	919	AY923141	клада_497	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium sp., оральный клон ASCF11	920	AY953256	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella adiacens	959	ACKZ01000002	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella elegans	960	AB252689	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella paradiacens	961	AY879298	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella sp., оральный клон ASC02	963	AY923126	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella sp., оральный клон ASCA05	964	DQ341469	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella sp., оральный клон ASCB09	965	AY953251	клада_497	НЕТ	НЕТ
Granulicatella sp., оральный клон ASCG05	966	AY923146	клада_497	НЕТ	НЕТ
Tetragenococcus halophilus	1918	NR_075020	клада_497	НЕТ	НЕТ
Tetragenococcus koreensis	1919	NR_043113	клада_497	НЕТ	НЕТ
Vagococcus fluvialis	1973	NR_026489	клада_497	НЕТ	НЕТ
Chryseobacterium anthropi	514	AM982793	клада_498	НЕТ	НЕТ
Chryseobacterium gleum	515	ACKQ02000003	клада_498	НЕТ	НЕТ
Chryseobacterium hominis	516	NR_042517	клада_498	НЕТ	НЕТ
Treponema refringens	1936	AF426101	клада_499	НЕТ	ОП
Treponema sp., оральный клон JU031	1941	AY349416	клада_499	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 239	1948	GU408738	клада_499	НЕТ	НЕТ
Treponema sp., оральный таксон 271	1955	GU408871	клада_499	НЕТ	НЕТ
Alistipes finegoldii	129	NR_043064	клада_500	НЕТ	НЕТ
Alistipes onderdonkii	131	NR_043318	клада_500	НЕТ	НЕТ
Alistipes putredinis	132	ABFK02000017	клада_500	НЕТ	НЕТ
Alistipes shahii	133	FP929032	клада_500	НЕТ	НЕТ
Alistipes sp. HGB5	134	AENZ01000082	клада_500	НЕТ	НЕТ
Alistipes sp. JC50	135	JF824804	клада_500	НЕТ	НЕТ
Alistipes sp. RMA 9912	136	GQ140629	клада_500	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma agalactiae	1310	AF010477	клада_501	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Mycoplasma bovoculi	1313	NR_025987	клада_501	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma fermentans	1315	CP002458	клада_501	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma flocculare	1316	X62699	клада_501	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma ovipneumoniae	1320	NR_025989	клада_501	НЕТ	НЕТ
Arcobacter butzleri	176	AEPT01000071	клада_502	НЕТ	НЕТ
Arcobacter cryaerophilus	177	NR_025905	клада_502	НЕТ	НЕТ
Campylobacter curvus	461	NC_009715	клада_502	НЕТ	ОП
Campylobacter rectus	467	ACFU01000050	клада_502	НЕТ	ОП
Campylobacter showae	468	ACVQ01000030	клада_502	НЕТ	ОП
Campylobacter sp. FOBRC14	469	HQ616379	клада_502	НЕТ	ОП
Campylobacter sp. FOBRC15	470	HQ616380	клада_502	НЕТ	ОП
Campylobacter sp., оральный клон BB120	471	AY005038	клада_502	НЕТ	ОП
Campylobacter sputorum	472	NR_044839	клада_502	НЕТ	ОП
Bacteroides ureolyticus	330	GQ167666	клада_504	НЕТ	НЕТ
Campylobacter gracilis	463	ACYG01000026	клада_504	НЕТ	ОП
Campylobacter hominis	464	NC_009714	клада_504	НЕТ	ОП
Dialister invisus	762	ACIM02000001	клада_506	НЕТ	НЕТ
Dialister microaerophilus	763	AFBB01000028	клада_506	НЕТ	НЕТ
Dialister microaerophilus	764	AENT01000008	клада_506	НЕТ	НЕТ
Dialister propionificiens	766	NR_043231	клада_506	НЕТ	НЕТ
Dialister succinatiphilus	768	AB370249	клада_506	НЕТ	НЕТ
Megasphaera elsdenii	1200	AY038996	клада_506	НЕТ	НЕТ
Megasphaera, геномовид type_1	1202	ADGP01000010	клада_506	НЕТ	НЕТ
Megasphaera sp. BLPYG_07	1204	HM990964	клада_506	НЕТ	НЕТ
Megasphaera sp. UPII 199_6	1205	AFIJ01000040	клада_506	НЕТ	НЕТ
Chromobacterium violaceum	513	NC_005085	клада_507	НЕТ	НЕТ
Laribacter hongkongensis	1148	CP001154	клада_507	НЕТ	НЕТ
Methylophilus sp. ECd5	1229	AY436794	клада_507	НЕТ	НЕТ
Finegoldia magna	883	ACHM02000001	клада_509	НЕТ	НЕТ
Parvimonas micra	1431	AB729072	клада_509	НЕТ	НЕТ
Parvimonas sp., оральный таксон 110	1432	AFII01000002	клада_509	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus micros	1456	AM176538	клада_509	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus sp., оральный клон FJ023	1460	AY349390	клада_509	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus sp. P4P_31 P3	1458	AY207059	клада_509	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Helicobacter pylori	997	CP000012	клада_510	НЕТ	ОП
Anaplasma marginale	165	ABOR01000019	клада_511	НЕТ	НЕТ
Anaplasma phagocytophilum	166	NC_007797	клада_511	НЕТ	НЕТ
Ehrlichia chaffeensis	783	AAIF01000035	клада_511	НЕТ	ОП
Neorickettsia risticii	1349	CP001431	клада_511	НЕТ	НЕТ
Neorickettsia sennetsu	1350	NC_007798	клада_511	НЕТ	НЕТ
Pseudoramibacter alactolyticus	1606	AB036759	клада_512	НЕТ	НЕТ
Veillonella montpellierensis	1977	AF473836	клада_513	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp., оральный клон ASCA08	1988	AY923118	клада_513	НЕТ	НЕТ
Veillonella sp., оральный клон ASCB03	1989	AY923122	клада_513	НЕТ	НЕТ
Inquilinus limosus	1012	NR_029046	клада_514	НЕТ	НЕТ
Sphingomonas sp., оральный клон FZ016	1746	AY349412	клада_514	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus lactolyticus	145	ABY001000217	клада_515	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus prevotii	147	CP001708	клада_515	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. gpac104	152	AM176528	клада_515	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. gpac126	153	AM176530	клада_515	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. gpac155	154	AM176536	клада_515	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus sp. gpac199	155	AM176539	клада_515	НЕТ	НЕТ
Anaerococcus tetradius	157	ACGC01000107	клада_515	НЕТ	НЕТ
Bacteroides coagulans	271	AB547639	клада_515	НЕТ	НЕТ
Бактерия Clostridiales 9403326	534	HM587324	клада_515	НЕТ	НЕТ
Бактерия Clostridiales ph2	539	JN837487	клада_515	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus sp. 9succ1	1457	X90471	клада_515	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus sp., оральный клон AP24	1459	AB175072	клада_515	НЕТ	НЕТ
Tissierella praeacuta	1924	NR_044860	клада_515	НЕТ	НЕТ
Helicobacter canadensis	994	ABQS01000108	клада_518	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus anaerobius	1455	AY326462	клада_520	НЕТ	НЕТ
Peptostreptococcus stomatis	1461	ADGQ01000048	клада_520	НЕТ	НЕТ
Bilophila wadsworthia	367	ADCP01000166	клада_521	НЕТ	НЕТ
Desulfovibrio vulgaris	761	NR_074897	клада_521	НЕТ	НЕТ
Actinomyces nasicola	64	AJ508455	клада_523	НЕТ	НЕТ
Cellulosimicrobium funkei	500	AY501364	клада_523	НЕТ	НЕТ
Lactococcus raffinolactis	1146	NR_044359	клада_524	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Bacteroidales, геномовид P1	258	AY341819	клада_529	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P2 оральный клон MB1_G13	259	DQ003613	клада_529	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P3 оральный клон MB1_G34	260	DQ003615	клада_529	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P4 оральный клон MB2_G17	261	DQ003617	клада_529	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P5 оральный клон MB2_P04	262	DQ003619	клада_529	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P6 оральный клон MB3_C19	263	DQ003634	клада_529	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales, геномовид P8 оральный клон MB4_G15	265	DQ003626	клада_529	НЕТ	НЕТ
Бактерия Bacteroidetes, оральный таксон D27	333	HM099638	клада_530	НЕТ	НЕТ
Бактерия Bacteroidetes, оральный таксон F31	334	HM099643	клада_530	НЕТ	НЕТ
Бактерия Bacteroidetes, оральный таксон F44	335	HM099649	клада_530	НЕТ	НЕТ
Flavobacterium sp. NF2_1	885	FJ195988	клада_530	НЕТ	НЕТ
Myroides odoratimimus	1326	NR_042354	клада_530	НЕТ	НЕТ
Myroides sp. MY15	1327	GU253339	клада_530	НЕТ	НЕТ
Бактерия Chlamydiales NS16	507	JN606076	клада_531	НЕТ	НЕТ
Chlamydomydia pecorum	508	D88317	клада_531	НЕТ	ОП
Parachlamydia sp. UWE25	1423	BX908798	клада_531	НЕТ	НЕТ
Fusobacterium russii	903	NR_044687	клада_532	НЕТ	НЕТ
Streptobacillus moniliformis	1784	NR_027615	клада_532	НЕТ	НЕТ
Бактерия Eubacteriaceae P4P_50 P4	833	AY207060	клада_533	НЕТ	НЕТ
Abiotrophia defectiva	1	ACIN02000016	клада_534	НЕТ	НЕТ
Abiotrophia sp., оральный клон P4PA_155 P1	3	AY207063	клада_534	НЕТ	НЕТ
Catonella, геномовид P1 оральный клон MB5_P12	496	DQ003629	клада_534	НЕТ	НЕТ
Catonella morbi	497	ACIL02000016	клада_534	НЕТ	НЕТ
Catonella sp., оральный клон FL037	498	AY349369	клада_534	НЕТ	НЕТ
Eremococcus coleocola	818	AENN01000008	клада_534	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
<i>Facklamia hominis</i>	879	Y10772	клада_534	НЕТ	НЕТ
<i>Granulicatella</i> sp. M658_99_3	962	AJ271861	клада_534	НЕТ	НЕТ
<i>Campylobacter coli</i>	459	AAFL01000004	клада_535	НЕТ	ОП
<i>Campylobacter concisus</i>	460	CP000792	клада_535	НЕТ	ОП
<i>Campylobacter fetus</i>	462	ACLG01001177	клада_535	НЕТ	ОП
<i>Campylobacter jejuni</i>	465	AL139074	клада_535	НЕТ	Категори я В
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	473	AEP01000040	клада_535	НЕТ	ОП
<i>Atopobium minutum</i>	183	HM007583	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium parvulum</i>	184	CP001721	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium rimaе</i>	185	ACFE01000007	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium</i> sp. BS2	186	HQ616367	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium</i> sp. F0209	187	EU592966	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium</i> sp. ICM42b10	188	HQ616393	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium</i> sp. ICM57	189	HQ616400	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Atopobium vaginae</i>	190	AEDQ01000024	клада_539	НЕТ	НЕТ
Бактерия <i>Coriobacteriaceae</i> BV3Ac1	677	JN809768	клада_539	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces naeslundii</i>	63	X81062	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces oricola</i>	67	NR_025559	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces oris</i>	69	BABV01000070	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp. 7400942	70	EU484334	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B197	72	AF543275	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp. GEJ15	73	GU561313	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp. M2231_94_1	79	AJ234063	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp., оральный клон GU067	83	AY349362	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp., оральный клон IO077	85	AY349364	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp., оральный клон IP073	86	AY349365	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp., оральный клон JA063	88	AY349367	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp., оральный таксон 170	89	AFBL01000010	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp., оральный таксон 171	90	AECW01000034	клада_54	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	95	ACFH01000038	клада_54	НЕТ	НЕТ

	OUT	SEQ ID №	HET		
			№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи
5	Actinomyces viscosus	96	ACRE01000096	клада_54	НЕТ
	Orientia tsutsugamushi	1383	AP008981	клада_541	НЕТ
	Megamonas funiformis	1198	AB300988	клада_542	НЕТ
	Megamonas hypermegale	1199	AJ420107	клада_542	НЕТ
10	Aeromicrobium marinum	102	NR_025681	клада_544	НЕТ
	Aeromicrobium sp. JC14	103	JF824798	клада_544	НЕТ
	Luteococcus sanguinis	1190	NR_025507	клада_544	НЕТ
	Propionibacteriaceae бактерия NML 02_0265	1568	EF599122	клада_544	НЕТ
15	Rhodococcus corynebacterioides	1622	X80615	клада_546	НЕТ
	Rhodococcus erythropolis	1624	ACNO01000030	клада_546	НЕТ
	Rhodococcus fascians	1625	NR_037021	клада_546	НЕТ
	Segniliparus rotundus	1690	CP001958	клада_546	НЕТ
	Segniliparus rugosus	1691	ACZI01000025	клада_546	НЕТ
20	Exiguobacterium acetylicum	878	FJ970034	клада_547	НЕТ
	Macrococcus caseolyticus	1194	NR_074941	клада_547	НЕТ
	Streptomyces sp. 1 AIP_2009	1890	FJ176782	клада_548	НЕТ
	Streptomyces sp. SD 524	1892	EU544234	клада_548	НЕТ
25	Streptomyces sp. SD 528	1893	EU544233	клада_548	НЕТ
	Streptomyces thermoviolaceus	1895	NR_027616	клада_548	НЕТ
	Borrelia afzelii	388	ABCU01000001	клада_549	НЕТ
	Borrelia crocidurae	390	DQ057990	клада_549	НЕТ
30	Borrelia duttonii	391	NC_011229	клада_549	НЕТ
	Borrelia hermsii	393	AY597657	клада_549	НЕТ
	Borrelia hispanica	394	DQ057988	клада_549	НЕТ
	Borrelia persica	395	HM161645	клада_549	НЕТ
	Borrelia рецидивирующейis	396	AF107367	клада_549	НЕТ
35	Borrelia spielmanii	398	ABKB01000002	клада_549	НЕТ
	Borrelia turicatae	399	NC_008710	клада_549	НЕТ
	Borrelia valaisiana	400	ABCV01000002	клада_549	НЕТ
	Providencia alcalifaciens	1586	ABXW01000071	клада_55	НЕТ
40	Providencia rettgeri	1587	AM040492	клада_55	НЕТ
	Providencia rustigianii	1588	AM040489	клада_55	НЕТ
	Providencia stuartii	1589	AF008581	клада_55	НЕТ
	Treponema pallidum	1932	CP001752	клада_550	НЕТ
	Treponema phagedenis	1934	AEFH01000172	клада_550	НЕТ
45	Treponema sp. клон DDKL_4	1939	Y08894	клада_550	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Acholeplasma laidlawii	17	NR_074448	клада_551	НЕТ	НЕТ
Mycoplasma putrefaciens	1323	U26055	клада_551	НЕТ	НЕТ
Mycoplasmataceae, геномовид P1 оральный клон MB1_G23	1325	DQ003614	клада_551	НЕТ	НЕТ
Spiroplasma insolitum	1750	NR_025705	клада_551	НЕТ	НЕТ
Collinsella intestinalis	660	ABXH02000037	клада_553	НЕТ	НЕТ
Collinsella stercoris	661	ABXJ01000150	клада_553	НЕТ	НЕТ
Collinsella tanakaеi	662	AB490807	клада_553	НЕТ	НЕТ
Caminicella sporogenes	458	NR_025485	клада_554	НЕТ	НЕТ
Acidaminococcus fermentans	21	CP001859	клада_556	НЕТ	НЕТ
Acidaminococcus intestini	22	CP003058	клада_556	НЕТ	НЕТ
Acidaminococcus sp. D21	23	ACGB01000071	клада_556	НЕТ	НЕТ
Phascolarctobacterium faecium	1462	NR_026111	клада_556	НЕТ	НЕТ
Phascolarctobacterium sp. YIT 12068	1463	AB490812	клада_556	НЕТ	НЕТ
Phascolarctobacterium succinatutens	1464	AB490811	клада_556	НЕТ	НЕТ
Acidithiobacillus ferrivorans	25	NR_074660	клада_557	НЕТ	НЕТ
Бактерия Xanthomonadaceae NML 03_0222	2015	EU313791	клада_557	НЕТ	НЕТ
Catabacter hongkongensis	494	AB671763	клада_558	НЕТ	НЕТ
Christensenella minuta	512	AB490809	клада_558	НЕТ	НЕТ
Бактерия Clostridiales оральный клон P4PA_66 P1	536	AY207065	клада_558	НЕТ	НЕТ
Бактерия Clostridiales, оральный таксон 093	537	GQ422712	клада_558	НЕТ	НЕТ
Heliobacterium modesticaldum	1000	NR_074517	клада_560	НЕТ	НЕТ
Alistipes indistinctus	130	AB490804	клада_561	НЕТ	НЕТ
Bacteroidales бактерия ph8	257	JN837494	клада_561	НЕТ	НЕТ
Candidatus Sulcia muelleri	475	CP002163	клада_561	НЕТ	НЕТ
Cytophaga xylanolytica	742	FR733683	клада_561	НЕТ	НЕТ
Flavobacteriaceae, геномовид C1	884	AY278614	клада_561	НЕТ	НЕТ
Gramella forsetii	958	NR_074707	клада_561	НЕТ	НЕТ
Sphingobacterium faecium	1740	NR_025537	клада_562	НЕТ	НЕТ
Sphingobacterium mizutaii	1741	JF708889	клада_562	НЕТ	НЕТ
Sphingobacterium multivorum	1742	NR_040953	клада_562	НЕТ	НЕТ
Sphingobacterium spiritivorum	1743	ACHA02000013	клада_562	НЕТ	НЕТ
Jonquetella anthropi	1017	ACOO02000004	клада_563	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Pyramidobacter piscolens	1614	AY207056	клада_563	НЕТ	НЕТ
Synergistes, геномовид C1	1904	AY278615	клада_563	НЕТ	НЕТ
Synergistes sp. RMA 14551	1905	DQ412722	клада_563	НЕТ	НЕТ
Бактерия Synergistetes ADV897	1906	GQ258968	клада_563	НЕТ	НЕТ
Candidatus Arthromitus sp. SFB_mouse_Yit	474	NR_074460	клада_564	НЕТ	НЕТ
Gracilibacter thermotolerans	957	NR_043559	клада_564	НЕТ	НЕТ
Brachyspira aalborgi	404	FM178386	клада_565	НЕТ	НЕТ
Brachyspira sp. HIS3	406	FM178387	клада_565	НЕТ	НЕТ
Brachyspira sp. HIS4	407	FM178388	клада_565	НЕТ	НЕТ
Brachyspira sp. HIS5	408	FM178389	клада_565	НЕТ	НЕТ
Adlercreutzia equolifaciens	97	AB306661	клада_566	НЕТ	НЕТ
Бактерия Coriobacteriaceae JC110	678	CAEM01000062	клада_566	НЕТ	НЕТ
Бактерия Coriobacteriaceae phl	679	JN837493	клада_566	НЕТ	НЕТ
Cryptobacterium curtum	740	GQ422741	клада_566	НЕТ	НЕТ
Eggerthella sinensis	779	AY321958	клада_566	НЕТ	НЕТ
Eggerthella sp. 1_3_56FAA	780	ACWN01000099	клада_566	НЕТ	НЕТ
Eggerthella sp. HGA1	781	AEXR01000021	клада_566	НЕТ	НЕТ
Eggerthella sp. YY7918	782	AP012211	клада_566	НЕТ	НЕТ
Gordonibacter pamelaee	680	AM886059	клада_566	НЕТ	НЕТ
Gordonibacter pamelaee	956	FP929047	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia equolifaciens	1732	EU377663	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia exigua	1733	ACUX01000029	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia faecicanis	1734	NR_042220	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia heliotrinireducens	1735	NR_074439	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia isoflavoniconvertens	1736	AB566418	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia piriformis	1737	AB490806	клада_566	НЕТ	НЕТ
Slackia sp. NATTS	1738	AB505075	клада_566	НЕТ	НЕТ
Бактерия Chlamydiales NS13	506	JN606075	клада_567	НЕТ	НЕТ
Бактерия Victivallaceae NML 080035	2003	FJ394915	клада_567	НЕТ	НЕТ
Victivallis vadensis	2004	ABDE02000010	клада_567	НЕТ	НЕТ
Streptomyces griseus	1889	NR_074787	клада_573	НЕТ	НЕТ
Streptomyces sp. SD 511	1891	EU544231	клада_573	НЕТ	НЕТ
Streptomyces sp. SD 534	1894	EU544232	клада_573	НЕТ	НЕТ
Cloacibacillus evryensis	530	GQ258966	клада_575	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
5 Deferribacteres sp., оральный клон JV001	743	AY349370	клада_575	НЕТ	НЕТ
Deferribacteres sp., оральный клон JV023	745	AY349372	клада_575	НЕТ	НЕТ
10 Бактерия Synergistetes LBVCM1157	1907	GQ258969	клада_575	НЕТ	НЕТ
Бактерия Synergistetes, оральный таксон 362	1909	GU410752	клада_575	НЕТ	НЕТ
15 Бактерия Synergistetes, оральный таксон D48	1910	GU430992	клада_575	НЕТ	НЕТ
Peptococcus sp., оральный клон JM048	1439	AY349389	клада_576	НЕТ	НЕТ
Helicobacter winhamensis	999	ACDO01000013	клада_577	НЕТ	НЕТ
Wolinella succinogenes	2014	BX571657	клада_577	НЕТ	НЕТ
20 Olsenella, геномовид C1	1368	AY278623	клада_578	НЕТ	НЕТ
Olsenella profusa	1369	FN178466	клада_578	НЕТ	НЕТ
Olsenella sp. F0004	1370	EU592964	клада_578	НЕТ	НЕТ
25 Olsenella sp., оральный таксон 809	1371	ACVE01000002	клада_578	НЕТ	НЕТ
Olsenella uli	1372	CP002106	клада_578	НЕТ	НЕТ
Nocardiopsis dassonvillei	1356	CP002041	клада_579	НЕТ	НЕТ
Peptococcus niger	1438	NR_029221	клада_580	НЕТ	НЕТ
30 Peptococcus sp., оральный таксон 167	1440	GQ422727	клада_580	НЕТ	НЕТ
Akkermansia muciniphila	118	CP001071	клада_583	НЕТ	НЕТ
Opitutus terrae	1373	NR_074978	клада_583	НЕТ	НЕТ
35 Бактерия Clostridiales, оральный таксон F32	538	HM099644	клада_584	НЕТ	НЕТ
Leptospira borgpetersenii	1161	NC_008508	клада_585	НЕТ	ОП
Leptospira broomii	1162	NR_043200	клада_585	НЕТ	ОП
Leptospira interrogans	1163	NC_005823	клада_585	НЕТ	ОП
40 Methanobrevibacter gottschalkii	1213	NR_044789	клада_587	НЕТ	НЕТ
Methanobrevibacter millerae	1214	NR_042785	клада_587	НЕТ	НЕТ
Methanobrevibacter oralis	1216	HE654003	клада_587	НЕТ	НЕТ
Methanobrevibacter thaueri	1219	NR_044787	клада_587	НЕТ	НЕТ
Methanobrevibacter smithii	1218	ABYV02000002	клада_588	НЕТ	НЕТ
45 Deinococcus radiodurans	746	AE000513	клада_589	НЕТ	НЕТ
Deinococcus sp. R_43890	747	FR682752	клада_589	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
<i>Thermus aquaticus</i>	1923	NR_025900	клада_589	НЕТ	НЕТ
<i>Actinomyces</i> sp. c109	81	AB167239	клада_590	НЕТ	НЕТ
Syntrophomonadaceae, геномовид P1	1912	AY341821	клада_590	НЕТ	НЕТ
<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i>	141	ACJX02000009	клада_591	НЕТ	НЕТ
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1246	NC_010296	клада_592	НЕТ	НЕТ
<i>Prochlorococcus marinus</i>	1567	CP000551	клада_592	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter acididurans</i>	1208	NR_028779	клада_593	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	1209	NR_042783	клада_593	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter curvatus</i>	1210	NR_044796	клада_593	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter cuticularis</i>	1211	NR_044776	клада_593	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter filiformis</i>	1212	NR_044801	клада_593	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter woesei</i>	1220	NR_044788	клада_593	НЕТ	НЕТ
<i>Roseiflexus castenholzii</i>	1642	CP000804	клада_594	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter olleyae</i>	1215	NR_043024	клада_595	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	1217	NR_042784	клада_595	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobrevibacter wolinii</i>	1221	NR_044790	клада_595	НЕТ	НЕТ
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	1222	AY196684	клада_595	НЕТ	НЕТ
<i>Chloroflexi</i> , геномовид P1	511	AY331414	клада_596	НЕТ	НЕТ
<i>Halorubrum lipolyticum</i>	992	AB477978	клада_597	НЕТ	НЕТ
<i>Methanobacterium formicicum</i>	1207	NR_025028	клада_597	НЕТ	НЕТ
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	24	AY350586	клада_598	НЕТ	НЕТ
<i>Hyperthermus butylicus</i>	1006	CP000493	клада_598	НЕТ	НЕТ
<i>Ignicoccus islandicus</i>	1011	X99562	клада_598	НЕТ	НЕТ
<i>Metallosphaera sedula</i>	1206	D26491	клада_598	НЕТ	НЕТ
<i>Thermofilum pendens</i>	1922	X14835	клада_598	НЕТ	НЕТ
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1506	CP002122	клада_6	НЕТ	НЕТ
<i>Prevotella</i> sp. ICM1	1520	HQ616385	клада_6	НЕТ	НЕТ
<i>Prevotella</i> sp., оральныи клон FU048	1535	AY349393	клада_6	НЕТ	НЕТ
<i>Prevotella</i> sp., оральныи клон GI030	1537	AY349395	клада_6	НЕТ	НЕТ
<i>Prevotella</i> sp. SEQ116	1526	JN867246	клада_6	НЕТ	НЕТ
<i>Streptococcus anginosus</i>	1787	AECT01000011	клада_60	НЕТ	НЕТ
<i>Streptococcus milleri</i>	1812	X81023	клада_60	НЕТ	НЕТ
<i>Streptococcus</i> sp. 16362	1829	JN590019	клада_60	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Streptococcus sp. 69130	1832	X78825	клада_60	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. AC15	1833	HQ616356	клада_60	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. CM7	1839	HQ616373	клада_60	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. OBRC6	1847	HQ616352	клада_60	НЕТ	НЕТ
Burkholderia ambifaria	442	AAUZ01000009	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia cenocepacia	443	AAHI01000060	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia cepacia	444	NR_041719	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia mallei	445	CP000547	клада_61	НЕТ	Категори я В
Burkholderia multivorans	446	NC_010086	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia oklahomensis	447	DQ108388	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia pseudomallei	448	CP001408	клада_61	НЕТ	Категори я В
Burkholderia rhizoxinica	449	HQ005410	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia sp. 383	450	CP000151	клада_61	НЕТ	ОП
Burkholderia xenovorans	451	U86373	клада_61	НЕТ	ОП
Prevotella buccae	1488	ACRB01000001	клада_62	НЕТ	НЕТ
Prevotella, геномовид P8 оральный клон MB3_P13	1498	DQ003622	клада_62	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон FW035	1536	AY349394	клада_62	НЕТ	НЕТ
Prevotella bivia	1486	ADFO01000096	клада_63	НЕТ	НЕТ
Prevotella disiens	1494	AEDO01000026	клада_64	НЕТ	НЕТ
Bacteroides faecis	276	GQ496624	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides fragilis	279	AP006841	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides nordii	285	NR_043017	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides salyersiae	292	EU136690	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 1_1_14	293	ACRP01000155	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 1_1_6	295	ACIC01000215	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 2_1_56FAA	298	ACWI01000065	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. AR29	316	AF139525	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. B2	317	EU722733	клада_65	НЕТ	НЕТ
Bacteroides thetaiotaomicron	328	NR_074277	клада_65	НЕТ	НЕТ
Actinobacillus minor	45	ACFT01000025	клада_69	НЕТ	НЕТ
Haemophilus parasuis	978	GU226366	клада_69	НЕТ	НЕТ
Vibrio cholerae	1996	AAUR01000095	клада_71	НЕТ	Категори я В
Vibrio fluvialis	1997	X76335	клада_71	НЕТ	Категори

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
					я В
Vibrio furnissii	1998	CP002377	клада_71	НЕТ	Категори я В
Vibrio mimicus	1999	ADAF01000001	клада_71	НЕТ	Категори я В
Vibrio parahaemolyticus	2000	AAWQ01000116	клада_71	НЕТ	Категори я В
Vibrio sp. RC341	2001	ACZT01000024	клада_71	НЕТ	Категори я В
Vibrio vulnificus	2002	AE016796	клада_71	НЕТ	Категори я В
Lactobacillus acidophilus	1067	CP000033	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus amylolyticus	1069	ADNY01000006	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus amylovorus	1070	CP002338	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus crispatus	1078	ACOG01000151	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus delbrueckii	1080	CP002341	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus helveticus	1088	ACLM01000202	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus kalixensis	1094	NR_029083	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus kefirifaciens	1095	NR_042440	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus leichmannii	1098	JX986966	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. 66c	1120	FR681900	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0701	1122	EU600905	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp. KLDS 1.0712	1130	EU600916	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus sp., оральн ый клон HT070	1136	AY349383	клада_72	НЕТ	НЕТ
Lactobacillus ultunensis	1139	ACGU01000081	клада_72	НЕТ	НЕТ
Prevotella intermedia	1502	AF414829	клада_81	НЕТ	НЕТ
Prevotella nigrescens	1511	AFPX01000069	клада_81	НЕТ	НЕТ
Prevotella pallens	1515	AFPY01000135	клада_81	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральн ый таксон 310	1551	GQ422737	клада_81	НЕТ	НЕТ
Prevotella, геномовид C1	1495	AY278624	клада_82	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. CM38	1519	HQ610181	клада_82	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральн ый таксон 317	1552	ACQH01000158	клада_82	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. SG12	1527	GU561343	клада_82	НЕТ	НЕТ
Prevotella denticola	1493	CP002589	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella, геномовид P7	1497	DQ003620	клада_83	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
оральный клон MB2_P31					
Prevotella histicola	1501	JN867315	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella multiformis	1508	AEWX01000054	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. JCM 6330	1522	AB547699	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный клон GI059	1539	AY349397	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон 782	1555	GQ422745	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp., оральный таксон G71	1559	GU432180	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella sp. SEQ065	1524	JN867234	клада_83	НЕТ	НЕТ
Prevotella veroralis	1565	ACVA01000027	клада_83	НЕТ	НЕТ
Bacteroides acidifaciens	266	NR_028607	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides cellulosilyticus	269	ACCH01000108	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides clarus	270	AFBM01000011	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides eggerthii	275	ACWG01000065	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides oleiciplenus	286	AB547644	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides pyogenes	290	NR_041280	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 315_5	300	FJ848547	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 31SF15	301	AJ583248	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 31SF18	302	AJ583249	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 35AE31	303	AJ583244	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 35AE37	304	AJ583245	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 35BE34	305	AJ583246	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. 35BE35	306	AJ583247	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. WH2	324	AY895180	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides sp. XB12B	325	AM230648	клада_85	НЕТ	НЕТ
Bacteroides stercoris	327	ABFZ02000022	клада_85	НЕТ	НЕТ
Actinobacillus pleuropneumoniae	46	NR_074857	клада_88	НЕТ	НЕТ
Actinobacillus ureae	48	AEVG01000167	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus aegyptius	969	AFBC01000053	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus ducreyi	970	AE017143	клада_88	НЕТ	ОП
Haemophilus haemolyticus	973	JN175335	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus influenzae	974	AADP01000001	клада_88	НЕТ	ОП
Haemophilus parahaemolyticus	975	GU561425	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus parainfluenzae	976	AEWU01000024	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus	977	M75076	клада_88	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
paraphrophaemolyticus					
Haemophilus somnus	979	NC_008309	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp. 70334	980	HQ680854	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp. HK445	981	FJ685624	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp., оральный клон ASCA07	982	AY923117	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp., оральный клон ASCG06	983	AY923147	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp., оральный клон BJ021	984	AY005034	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp., оральный клон BJ095	985	AY005033	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp., оральный таксон 851	987	AGRK01000004	клада_88	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sputorum	988	AFNK01000005	клада_88	НЕТ	НЕТ
Histophilus somni	1003	AF549387	клада_88	НЕТ	НЕТ
Mannheimia haemolytica	1195	ACZX01000102	клада_88	НЕТ	НЕТ
Pasteurella bettyae	1433	L06088	клада_88	НЕТ	НЕТ
Moellerella wisconsensis	1253	JN175344	клада_89	НЕТ	НЕТ
Morganella morganii	1265	AJ301681	клада_89	НЕТ	НЕТ
Morganella sp. JB_T16	1266	AJ781005	клада_89	НЕТ	НЕТ
Proteus mirabilis	1582	ACLE01000013	клада_89	НЕТ	НЕТ
Proteus penneri	1583	ABVP01000020	клада_89	НЕТ	НЕТ
Proteus sp. HS7514	1584	DQ512963	клада_89	НЕТ	НЕТ
Proteus vulgaris	1585	AJ233425	клада_89	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sinus	1374	ACKX01000142	клада_90	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp. ACB1	1375	HM120210	клада_90	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp. ACB7	1376	HM120211	клада_90	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp. CM12	1377	HQ616374	клада_90	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp. ICM51	1378	HQ616397	клада_90	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp. OBRC12	1379	HQ616355	клада_90	НЕТ	НЕТ
Oribacterium sp., оральный таксон 108	1382	AFIH01000001	клада_90	НЕТ	НЕТ
Actinobacillus actinomycetemcomitans	44	AY362885	клада_92	НЕТ	НЕТ
Actinobacillus succinogenes	47	CP000746	клада_92	НЕТ	НЕТ
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	112	CP001733	клада_92	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Aggregatibacter aphrophilus	113	CP001607	клада_92	НЕТ	НЕТ
Aggregatibacter segnis	114	AEPS01000017	клада_92	НЕТ	НЕТ
Averyella dalhousiensis	194	DQ481464	клада_92	НЕТ	НЕТ
Bisgaard Taxon	368	AY683487	клада_92	НЕТ	НЕТ
Bisgaard Taxon	369	AY683489	клада_92	НЕТ	НЕТ
Bisgaard Taxon	370	AY683491	клада_92	НЕТ	НЕТ
Bisgaard Taxon	371	AY683492	клада_92	НЕТ	НЕТ
Buchnera aphidicola	440	NR_074609	клада_92	НЕТ	НЕТ
Cedecea davisae	499	AF493976	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter amalonaticus	517	FR870441	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter braakii	518	NR_028687	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter farmeri	519	AF025371	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter freundii	520	NR_028894	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter gillenii	521	AF025367	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter koseri	522	NC_009792	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter murlinae	523	AF025369	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter rodentium	524	NR_074903	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter sedlakii	525	AF025364	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter sp. 30_2	526	ACDJ01000053	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter sp. KMSI_3	527	GQ468398	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter werkmanii	528	AF025373	клада_92	НЕТ	НЕТ
Citrobacter youngae	529	ABWL02000011	клада_92	НЕТ	НЕТ
Cronobacter malonaticus	737	GU122174	клада_92	НЕТ	НЕТ
Cronobacter sakazakii	738	NC_009778	клада_92	НЕТ	НЕТ
Cronobacter turicensis	739	FN543093	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter aerogenes	786	AJ251468	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter asburiae	787	NR_024640	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter cancerogenus	788	Z96078	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter cloacae	789	FP929040	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter cowanii	790	NR_025566	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter hormaechei	791	AFHR01000079	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter sp. 247BMC	792	HQ122932	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter sp. 638	793	NR_074777	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter sp. JC163	794	JN657217	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter sp. SCSS	795	HM007811	клада_92	НЕТ	НЕТ
Enterobacter sp. TSE38	796	HM156134	клада_92	НЕТ	НЕТ
Бактерия Enterobacteriaceae	797	ADCU01000033	клада_92	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
9_2_54FAA					
Бактерия Enterobacteriaceae CF01Ent_1	798	AJ489826	клада_92	НЕТ	НЕТ
Бактерия Enterobacteriaceae Smarlab 3302238	799	AY538694	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia albertii	824	ABKX01000012	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia coli	825	NC_008563	клада_92	НЕТ	Категори я В
Escherichia fergusonii	826	CU928158	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia hermannii	827	HQ407266	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia sp. 1_1_43	828	ACID01000033	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia sp. 4_1_40B	829	ACDM02000056	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia sp. B4	830	EU722735	клада_92	НЕТ	НЕТ
Escherichia vulneris	831	NR_041927	клада_92	НЕТ	НЕТ
Ewingella americana	877	JN175329	клада_92	НЕТ	НЕТ
Haemophilus, геномовид P2 оральный клон MB3_C24	971	DQ003621	клада_92	НЕТ	НЕТ
Haemophilus, геномовид P3 оральный клон MB3_C38	972	DQ003635	клада_92	НЕТ	НЕТ
Haemophilus sp., оральный клон JM053	986	AY349380	клада_92	НЕТ	НЕТ
Hafnia alvei	989	DQ412565	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella oxytoca	1024	AY292871	клада_92	НЕТ	ОП
Klebsiella pneumoniae	1025	CP000647	клада_92	НЕТ	ОП
Klebsiella sp. AS10	1026	HQ616362	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. Co9935	1027	DQ068764	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. обогащение culture clone SRC_DSD25	1036	HM195210	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. OBRC7	1028	HQ616353	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SP_BA	1029	FJ999767	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SRC_DSD1	1033	GU797254	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SRC_DSD11	1030	GU797263	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SRC_DSD12	1031	GU797264	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SRC_DSD15	1032	GU797267	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SRC_DSD2	1034	GU797253	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella sp. SRC_DSD6	1035	GU797258	клада_92	НЕТ	НЕТ
Klebsiella variicola	1037	CP001891	клада_92	НЕТ	НЕТ
Kluyvera ascorbata	1038	NR_028677	клада_92	НЕТ	НЕТ

5

10

15

20

25

30

35

40

45

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообразователи	Патогенный статус
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1039	NR_028803	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Leminorella grimontii</i>	1159	AJ233421	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Leminorella richardii</i>	1160	HF558368	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pantoea agglomerans</i>	1409	AY335552	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pantoea ananatis</i>	1410	CP001875	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pantoea brenneri</i>	1411	EU216735	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pantoea citrea</i>	1412	EF688008	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pantoea conspicua</i>	1413	EU216737	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pantoea septica</i>	1414	EU216734	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pasteurella dagmatis</i>	1434	ACZR01000003	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Pasteurella multocida</i>	1435	NC_002663	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1469	X60418	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1617	AB364958	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Raoultella planticola</i>	1618	AF129443	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Raoultella terrigena</i>	1619	NR_037085	клада_92	НЕТ	НЕТ
<i>Salmonella bongori</i>	1683	NR_041699	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1672	NC_011149	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1673	NC_011205	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1674	DQ344532	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1675	ABEH02000004	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1676	ABAK02000001	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1677	NC_011080	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1678	EU118094	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1679	NC_011094	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1680	AE014613	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1682	ABFH02000001	клада_92	НЕТ	Категория В
<i>Salmonella enterica</i>	1684	ABEM01000001	клада_92	НЕТ	Категория В

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
					я В
Salmonella enterica	1685	ABAM02000001	клада_92	НЕТ	Категори я В
Salmonella typhimurium	1681	DQ344533	клада_92	НЕТ	Категори я В
Salmonella typhimurium	1686	AF170176	клада_92	НЕТ	Категори я В
Serratia fonticola	1718	NR_025339	клада_92	НЕТ	НЕТ
Serratia liquefaciens	1719	NR_042062	клада_92	НЕТ	НЕТ
Serratia marcescens	1720	GU826157	клада_92	НЕТ	НЕТ
Serratia odorifera	1721	ADBY01000001	клада_92	НЕТ	НЕТ
Serratia proteamaculans	1722	AAUN01000015	клада_92	НЕТ	НЕТ
Shigella boydii	1724	AAKA01000007	клада_92	НЕТ	Категори я В
Shigella dysenteriae	1725	NC_007606	клада_92	НЕТ	Категори я В
Shigella flexneri	1726	AE005674	клада_92	НЕТ	Категори я В
Shigella sonnei	1727	NC_007384	клада_92	НЕТ	Категори я В
Tatumella ptyseos	1916	NR_025342	клада_92	НЕТ	НЕТ
Trabulsiella guamensis	1925	AY373830	клада_92	НЕТ	НЕТ
Yersinia aldovae	2019	AJ871363	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia aleksiciae	2020	AJ627597	клада_92	НЕТ	
Yersinia bercovieri	2021	AF366377	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia enterocolitica	2022	FR729477	клада_92	НЕТ	Категори я В
Yersinia frederiksenii	2023	AF366379	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia intermedia	2024	AF366380	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia kristensenii	2025	ACCA01000078	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia mollaretii	2026	NR_027546	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia pestis	2027	AE013632	клада_92	НЕТ	Категори я А
Yersinia pseudotuberculosis	2028	NC_009708	клада_92	НЕТ	ОП
Yersinia rohdei	2029	ACCD01000071	клада_92	НЕТ	ОП
Yokenella regensburgei	2030	AB273739	клада_92	НЕТ	НЕТ
Conchiformibius kuhniae	669	NR_041821	клада_94	НЕТ	НЕТ
Morococcus cerebrosus	1267	JN175352	клада_94	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Neisseria bacilliformis	1328	AFAY01000058	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria cinerea	1329	ACDY01000037	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria flavescens	1331	ACQV01000025	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria gonorrhoeae	1333	CP002440	клада_94	НЕТ	ОП
Neisseria lactamica	1334	ACEQ01000095	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria macacae	1335	AFQE01000146	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria meningitidis	1336	NC_003112	клада_94	НЕТ	ОП
Neisseria mucosa	1337	ACDX01000110	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria pharyngis	1338	AJ239281	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria polysaccharea	1339	ADBE01000137	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria sicca	1340	ACKO02000016	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp. KEM232	1341	GQ203291	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp., оральный клон AP132	1344	AY005027	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp. оральный штамм B33KA	1346	AY005028	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp., оральный таксон 014	1347	ADEA01000039	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria sp. TM10_1	1343	DQ279352	клада_94	НЕТ	НЕТ
Neisseria subflava	1348	ACEO01000067	клада_94	НЕТ	НЕТ
Okadaella gastrococcus	1365	HQ699465	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus agalactiae	1785	AAJO01000130	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus alactolyticus	1786	NR_041781	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus australis	1788	AEQR01000024	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus bovis	1789	AEEL01000030	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus canis	1790	AJ413203	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus constellatus	1791	AY277942	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus cristatus	1792	AEVC01000028	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus dysgalactiae	1794	AP010935	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus equi	1795	CP001129	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus equinus	1796	AEVB01000043	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus gallolyticus	1797	FR824043	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C1	1798	AY278629	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C2	1799	AY278630	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C3	1800	AY278631	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C4	1801	AY278632	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C5	1802	AY278633	клада_98	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Streptococcus, геномовид C6	1803	AY278634	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C7	1804	AY278635	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus, геномовид C8	1805	AY278609	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus gordonii	1806	NC_009785	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus infantarius	1807	ABJK02000017	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus infantis	1808	AFNN01000024	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus intermedius	1809	NR_028736	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus lutetiensis	1810	NR_037096	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus massiliensis	1811	AY769997	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus mitis	1813	AM157420	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus oligofermentans	1815	AY099095	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus oralis	1816	ADMV01000001	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus parasanguinis	1817	AEKM01000012	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus pasteurianus	1818	AP012054	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus peroris	1819	AEVF01000016	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus pneumoniae	1820	AE008537	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus porcinus	1821	EF121439	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus pseudopneumoniae	1822	FJ827123	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus pseudoporcinus	1823	AENS01000003	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus pyogenes	1824	AE006496	клада_98	НЕТ	ОП
Streptococcus ratti	1825	X58304	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sanguinis	1827	NR_074974	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sinensis	1828	AF432857	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. 2_1_36FAA	1831	ACOI01000028	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. 2285_97	1830	AJ131965	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. ACS2	1834	HQ616360	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. AS20	1835	HQ616366	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. BS35a	1836	HQ616369	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. C150	1837	ACRI01000045	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. CM6	1838	HQ616372	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. ICM10	1840	HQ616389	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. ICM12	1841	HQ616390	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. ICM2	1842	HQ616386	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. ICM4	1844	HQ616387	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. ICM45	1843	HQ616394	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. M143	1845	ACRK01000025	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp. M334	1846	ACRL01000052	клада_98	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Streptococcus sp., оральный клон ASB02	1849	AY923121	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCA03	1850	DQ272504	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCA04	1851	AY923116	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCA09	1852	AY923119	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCB04	1853	AY923123	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCB06	1854	AY923124	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCC04	1855	AY923127	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCC05	1856	AY923128	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCC12	1857	DQ272507	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCD01	1858	AY923129	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCD09	1859	AY923130	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCD10	1860	DQ272509	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE03	1861	AY923134	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE04	1862	AY953253	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE05	1863	DQ272510	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE06	1864	AY923135	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE09	1865	AY923136	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE10	1866	AY923137	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCE12	1867	AY923138	клада_98	НЕТ	НЕТ

OUT	SEQ ID №	№ доступа в общедоступной базе данных	Клада	Спорообраз ователи	Патогенны й статус
Streptococcus sp., оральный клон ASCF05	1868	AY923140	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCF07	1869	AY953255	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCF09	1870	AY923142	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон ASCG04	1871	AY923145	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон BW009	1872	AY005042	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон CH016	1873	AY005044	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон GK051	1874	AY349413	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон GM006	1875	AY349414	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон P2PA_41 P2	1876	AY207051	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный клон P4PA_30 P4	1877	AY207064	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный таксон 071	1878	AEEP01000019	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный таксон G59	1879	GU432132	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный таксон G62	1880	GU432146	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus sp., оральный таксон G63	1881	GU432150	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus suis	1882	FM252032	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus thermophilus	1883	CP000419	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus salivarius	1826	AGBV01000001	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus uberis	1884	HQ391900	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus urinalis	1885	DQ303194	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus vestibularis	1886	AEKO01000008	клада_98	НЕТ	НЕТ
Streptococcus viridans	1887	AF076036	клада_98	НЕТ	НЕТ
Бактерия Synergistetes, оральный клон 03 5 D05	1908	GU227192	клада_98	НЕТ	НЕТ

Таблица X4. Спорообразующие бактериальные виды

	Alkaliphilus metalliredigens
5	Ammonifex degensii
	Anaerofustis stercorihominis
	Anaerostipes caccae
10	Anaerotruncus colihominis
	Bacillus amyloliquefaciens
	Bacillus anthracis
	Bacillus cellulosilyticus
15	Bacillus cereus
	Bacillus clausii
	Bacillus coagulans
20	Bacillus cytotoxicus
	Bacillus halodurans
	Bacillus licheniformis
	Bacillus pumilus
25	Bacillus subtilis
	Bacillus thuringiensis
	Bacillus weihenstephanensis
30	Blautia hansenii
	Brevibacillus brevis
	Bryantella formatexigens
	Caldicellulosiruptor saccharolyticus
35	Candidatus Desulforudis audaxviato
	Carboxydibrachium pacificum
	Carboxydotherrnus hydrogenoformans
40	Clostridium acetobutylicum
	Clostridium asparagiforme
	Clostridium bartlettii
	Clostridium beijerinckii
45	Clostridium bolteae
	Clostridium botulinum A str. ATCC 19397

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridium botulinum B str. Eklund 17B
Clostridium butyricum, патогенный E4 штамм BoNT BL5262
Clostridium Carboxidivorans
Clostridium cellulolyticum
Clostridium cellulovorans
Clostridium difficile
Clostridium hathewayi
Clostridium hylemonae
Clostridium kluyveri
Clostridium leptum
Clostridium methylpentosum
Clostridium nexile
Clostridium novyi NT
Clostridium papyrosolvens
Clostridium perfringens
Clostridium phytofermentans ISDg
Clostridium scindens
Clostridium sp. 7_2_43FAA
Clostridium sporogenes
Clostridium tetani
Clostridium thermocellum
Coprococcus comes
Desulfotomaculum reducens
Dorea longicatena
Eubacterium eligens
Eubacterium hallii
Eubacterium rectale
Eubacterium ventriosum
Faecalibacterium prausnitzii
Geobacillus kaustophilus
Geobacillus sp. G11MC16
Geobacillus thermodenitrificans

	Heliobacterium modesticaldum
	Lysinibacillus sphaericus
5	Oceanobacillus iheyensis
	Paenibacillus sp. JDR-2
	Pelotomaculum thermopropionicum
	Roseburia intestinalis
10	Ruminococcus bromii
	Ruminococcus gnavus
	Ruminococcus obeum
15	Ruminococcus torques
	Subdoligranulum variabile
	Symbiobacterium thermophilum
	Thermoanaerobacter italicus
20	Thermoanaerobacter tengcongensis
	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum
	Thermosinus carboxydivorans

25

30

35

40

45

Таблица 2: Виды, выделенные из обработанного этанолом состава со спорами до (слева) и после (справа) этапа градиента CsCl

Изоляты	Обработанный этанолом состав со спорами	Обработанный этанолом очищенный в градиенте состав со спорами
<i>Bacillus coagulans</i>	7	2
<i>Blautia luti</i>	1	1
<i>Blautia sp</i>	14	13
<i>Blautia wexlerae</i>	3	1
<i>Ruminococcus obeum</i>	4	2
<i>Clostridiales sp</i>	1	2
<i>Clostridium aerotolerans</i>	1	2
<i>Clostridium disporicum</i>	0	1
<i>Clostridium sp</i>	1	1
<i>Clostridium symbiosum</i>	0	1
<i>Dorea longicatena</i>	8	6
<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	1	0
<i>Eubacterium ventriosum</i>	2	2
<i>Gemmiger formicilis</i>	0	1
<i>Robinsoniella peoriensis</i>	0	1
<i>Roseburia hominis</i>	3	6
<i>Roseburia intestinalis</i>	9	7
<i>Ruminococcus sp</i>	5	2

Syntrophococcus sucromutans	1	1
Turicibacter sanguinis	3	4
Clostridiales sp	7	9
Clostridium bartlettii	8	11
Clostridium irregulare	0	1
Clostridium sordellii	4	6
Lachnospiraceae sp	1	0

Таблица 3 Смертность и изменение массы тела у мышей, стимулированных *C. difficile*, с обработкой или без обработки обработанным этанолом споровым продуктом.

Тестируемый состав	Смертность (n=10)	% изменения массы тела на 3 день
Носитель (отрицательный контроль)	20%	-10,5%
Донорские экскременты (положительный контроль)	0	-0,1%
Обработанные EtOH экскременты 1×	0	2,3%
Обработанные EtOH экскременты 0,1×	0	2,4%
Обработанные EtOH экскременты 0,01×	0	-3%
Термообработанные экскременты	0	0,1%

Таблица 4: Идентифицированные на основании 16S рРНК спорообразующие виды из чашек с выделенными точечным методом колониями.

Обработка	Виды	Количество изолятов
70°C 1 ч	<i>Clostridium_celatum</i>	4
70°C 1 ч	<i>Clostridium_clostridioform</i>	1
70°C 1 ч	<i>Clostridium_hylemonae</i>	1
70°C 1 ч	<i>Clostridium_paraputrificum</i>	3
70°C 1 ч	<i>Clostridium_sp_D5</i>	1
70°C 1 ч	<i>Clostridium_symbiosum</i>	1
80°C 1 ч	<i>Clostridium_bartlettii</i>	6
80°C 1 ч	<i>Clostridium_butyricum</i>	1
80°C 1 ч	<i>Clostridium_paraputrificum</i>	5
80°C 1 ч	<i>Coprobacillus_sp_D7</i>	1
80°C 1 ч	<i>Eubacterium_sp_WAL_14571</i>	1
80°C 1 ч	<i>Ruminococcus_bromii</i>	1
90°C 1 ч	<i>Clostridium_butyricum</i>	1
90°C 10 мин	<i>Ruminococcus_bromii</i>	1
90°C 10 мин	<i>Anaerotruncus_colihominis</i>	2
90°C 10 мин	<i>Clostridium_bartlettii</i>	1
100°C 10 мин	<i>Ruminococcus_bromii</i>	1

Таблица 5: Спорообразующие виды, идентифицированные в обработанных этанолом или термообработанных образцах и не идентифицированные в необработанных образцах

Виды	Выделенные из необработанных образцов	Выделенные из обработанных EtOH образцов	Выделенные из термообработанных образцов
<i>Acetivibrio ethanolgignens</i>		x	
<i>Anaerofustis stercorihominis</i>		x	
<i>Bacillus anthracis</i>		x	
<i>Bacillus horti</i>		x	
<i>Bacillus licheniformis</i>			x
<i>Bacillus nealsonii</i>		x	
<i>Bacillus pumilus</i>			x
<i>Bacillus</i> sp. BT1B_CT2		x	
<i>Bacillus thuringiensis</i>		x	
<i>Bacteroides galacturonicus</i> (филогенетически относится к Clostridiales)		x	
<i>Bacteroides pectinophilus</i> (филогенетически относится к Clostridiales)		x	
<i>Blautia wexlerae</i>		x	x
<i>Brachyspira pilosicoli</i>		x	
<i>Brevibacillus parabrevis</i>			x
<i>Clostridium aldenense</i>		x	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridium beijerinckii		x	
Clostridium carnis		x	
Clostridium celatum		x	
Clostridium favosporum		x	
Clostridium hylemonae			x
Clostridium irregular		x	
Clostridium methylpentosum			x
Clostridium sp. D5		x	x
Clostridium sp. L2-50		x	
Clostridium sp. MT4 E		x	
Clostridium sp. NML 04A032		x	
Clostridium sp. SS2/1		x	
Clostridium sp. YIT 12069			x
Clostridium stercorearium		x	
Clostridium xylanolyticum		x	
Coprococcus sp. ART55/1		x	
Deferribacteres sp., оральный клон JV006		x	
Desulfitobacterium frappieri		x	
Eubacterium callanderi		x	
Eubacterium siracum		x	
Exiguobacterium acetylicum		x	
Gemmiger formicilis		x	

Lachnospira multipara		x	
Lachnospira pectinoschiza		x	
Roseburia faecalis		x	
Ruminococcus albus		x	

Таблица 6. Донор А, 45 видов в 374 секвенированных устойчивых к ЕtОН колониях

OUT
Anaerostipes_sp_3_2_56FAA
Bacillus_anthraxis
Bacillus_cereus
Bacillus_thuringiensis
Blautia_producta
Blautia_sp_M25
Clostridiales_sp_SSC_2
Clostridium_aldenense
Clostridium_bartlettii
Clostridium_bolteae
Clostridium_celatum
Clostridium_disporicum
Clostridium_ghonii
Clostridium_hathewayi
Clostridium_lactatifermentans

5

Clostridium_mayombeii

Clostridium_orbiscindens

Clostridium_paraputrificum

Clostridium_perfringens

10

Clostridium_sordellii

Clostridium_stercorarium

15

Clostridium_straminisolvens

Clostridium_tertium

Coprobacillus_sp_D7

20

Coproccoccus_catus

Deferribacteres_sp, оральный клон_JV006

25

Dorea_formicigenerans

Eubacterium_rectale

30

Eubacterium_siraeum

Eubacterium_sp_WAL_14571

Eubacterium_ventriosum

35

Flexistipes_sinusarabici

Fulvimonas_sp_NML_060897

40

Бактерия Lachnospiraceae_2_1_58FAA

Бактерия Lachnospiraceae_3_1_57FAA

45

Бактерия Lachnospiraceae_A4

Бактерия Lachnospiraceae_оральный_таксон_F15

	Moorella_thermoacetica
5	Roseburia_faecalis
	Roseburia_hominis
10	Ruminococcus_albus
	Ruminococcus_bromii
15	Ruminococcus_gnavus
	Ruminococcus_sp_5_1_39BFAA
20	Ruminococcus_torques

Таблица 7 Донор В, 26 видов в 195 секвенированных устойчивых к EtOH колониях

	OUT
25	Bacillus_horti
	Blautia_wexlerae
30	Chlamydiales_бактерия_NS11
	Clostridiales_sp_SSC_2
	Clostridium_bartlettii
35	Clostridium_celatum
	Clostridium_disporicum
40	Clostridium_ghonii
	Clostridium_oroticum
	Clostridium_paraputrificum
45	Clostridium_perfringens
	Clostridium_sordellii

	Clostridium_sp_L2_50
5	Clostridium_sp_MT4_E
	Clostridium_straminisolvens
10	Coprococcus_sp_ART55_1
	Eubacterium_callanderi
	Eubacterium_rectale
15	Eubacterium_ruminantium
	Gemmiger_formicilis
20	Lachnospira_pectinoschiza
	Ruminococcus_albus
25	Ruminococcus_gnavus
	Ruminococcus_obeum
30	Ruminococcus_sp_5_1_39BFAA
	Ruminococcus_sp_K_1

35

40

45

Таблица 8 Донор С, 39 видов в 416 секвенированных устойчивых к EtOH колониях

OTU
Bacteroides_galacturonicus
Bacteroides_pectinophilus
Blautia_producta
Blautia_sp_M25
Blautia_wexlerae
Clostridiales_sp_SS3_4
Clostridiales_sp_SSC_2

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridium_bartlettii
Clostridium_citroniae
Clostridium_disporicum
Clostridium_indolis
Clostridium_orbiscindens
Clostridium_paraputrificum
Clostridium_sordellii
Clostridium_sp_NML_04A032
Clostridium_sp_SS2_1
Clostridium_straminisolvens
Clostridium_viride
Clostridium_xylanolyticum
Coprobacillus_sp_D7
Dorea_longicatena
Eubacterium_rectale
Eubacterium_ventriosum
Hydrogenoanaerobacterium_saccharovorans
Lachnospira_multipara
Lachnospira_pectinoschiza
Бактерия Lachnospiraceae_A4
Oscillibacter_sp_G2
Pseudoflavonifractor_capillosus
Roseburia_hominis

	Roseburia_intestinalis
5	Ruminococcus_albus
	Ruminococcus_lactaris
10	Ruminococcus_obeum
	Ruminococcus_sp_5_1_39BFAA
15	Ruminococcus_sp_K_1
	Ruminococcus_torques
20	Syntrophococcus_sucromutans

25

30

35

40

45

Таблица 9 Донор D, 12 видов в 118 секвенированных устойчивых к EtOH колониях

5

OTU
Blautia_luti
Blautia_wexlerae
Brachyspira_pilosicoli
Clostridium_paraputrificum
Collinsella_aerofaciens
Coprobacillus_sp_D7
Desulfitobacterium_frappieri
Eubacterium_rectale
Moorella_thermoacetica
Ruminococcus_gnavus
Ruminococcus_obeum
Ruminococcus_sp_K_1

10

15

20

25

30

Таблица 10. Донор Е, 11 видов в 118 секвенированных устойчивых к EtOH колониях

	OTU
5	Blautia_luti
	Blautia_wexlerae
10	Brachyspira_pilosicoli
	Clostridium_paraputrificum
	Coprobacillus_sp_D7
15	Desulfitobacterium_frappieri
	Eubacterium_rectale
	Moorella_thermoacetica
20	Ruminococcus_gnavus
	Ruminococcus_obeum
25	Ruminococcus_sp_K_1

Таблица 11. Донор F, 54 OTU в 768 секвенированных устойчивых к EtOH колониях

30	OTU
	Anaerofustis_stercorihominis
	Anaerostipes_sp_3_2_56FAA
35	Bacillus_nealsonii
	Bacillus_sp_BT1B_CT2
40	Blautia_producta
	Butyrivibrio_crossotus

45

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridiales_бактерия_SY8519
Clostridiales_sp_1_7_47
Clostridium_aldenense
Clostridium_bartlettii
Clostridium_bolteae
Clostridium_butyricum
Clostridium_citroniae
Clostridium_clostridioforme
Clostridium_disporicum
Clostridium_favosporum
Clostridium_glycolicum
Clostridium_hathewayi
Clostridium_indolis
Clostridium_leptum
Clostridium_mayombei
Clostridium_nexile
Clostridium_orbiscindens
Clostridium_sordellii
Clostridium_sp_7_2_43FAA
Clostridium_sp_D5
Clostridium_sp_M62_1
Clostridium_sp_NML_04A032

	Clostridium_spiroforme
	Clostridium_symbiosum
5	Clostridium_tertium
	Coprobacillus_sp_29_1
10	Coprobacillus_sp_D7
	Eubacterium_contortum
15	Eubacterium_desmolans
	Eubacterium_ramulus
	Exiguobacterium_acetylicum
20	Faecalibacterium_prausnitzii
	Бактерия Lachnospiraceae_2_1_58FAA
25	Бактерия Lachnospiraceae_3_1_57FAA
	Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA
30	Бактерия Lachnospiraceae_6_1_63FAA
	Бактерия Lachnospiraceae,_оральный _таксон_F15
35	Marvinbryantia_formatexigens
	Mycoplasma_amphoriforme
	Oscillibacter_sp_G2
40	Pseudoflavonifractor_capillosus
	Ruminococcus_gnavus
45	Ruminococcus_hansenii
	Ruminococcus_obeum

Ruminococcus_sp_5_1_39BFAA
Ruminococcus_sp_ID8
Turicibacter_sanguinis

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 12 Организмы, вырастающие из обработанной этанолом популяции спор, на разных средах (см. в примере 5 полные наименования сред и ссылки).

Среда	Общее число прочтений	Уникальные OTU	% уникальных OTU
M2GSC	93	33	0,35
M-BHI	66	26	0,39
Sweet B	74	23	0,31
GAM фруктоза	44	18	0,41
M2 маннит	39	17	0,44
M2 растворимый крахмал	62	16	0,26
M2 лактат	43	14	0,33
GAM FOS/Инулин	52	14	0,27
EYA	29	13	0,45
Муцин	19	12	0,63
M2 с лактозой	32	12	0,38
BHIS az1/ge2	35	12	0,34
BHIS ClnM az1/ge2	24	11	0,46
GAM с маннитом	41	11	0,27
BBA	29	10	0,34

Полимиксин-сульфитный молочный	48	9	0,19
Агар для Eubacterium по Noack-Blaut	12	4	0,33
	всего проанализировано 742		

Таблица 13: Виды, идентифицированные как способные к прорастанию и способные к споруляции путем точечного выделения культуры из колоний

OTU	BBA	GAM + ФОС/инули н	M2GSC	Sweet B + ФОС/Инул ин	Sweet GAM	Всего
Blautia producta	1					1
Clostridium bartlettii	4		1			5
Clostridium boltae	2			5	1	8
Clostridium botulinum				5		5
Clostridium butyricum	37	43	8	1	33	122
Clostridium celatum	4				1	5
Clostridium clostridioforme	1				1	2
Clostridium disporicum	26	26	22	33	50	157
Clostridium glycolicum	4	9	14			27
Clostridium mayombeii	2	2				4
Clostridium paraputrificum	8	8	33	16	6	71
Clostridium sordellii			14			14
Clostridium sp. 7_2_43FAA		1				1

Clostridium symbiosum	3					3
Clostridium tertium		1		1		2
(пусто)		2		31		33
Всего	92	92	92	92	92	460

Таблица 15: Результаты профилактической модели на мышах и информация о дозировании для способных к прорастанию и способных к споруляции фракций.

[0428] Клинический показатель основано на комбинированной фенотипической оценке состояния здоровья мыши по шкале от 0 до 4 по нескольким параметрам, в том числе внешнему виду (0-2 пункта на основании нормального внешнего вида, сгорбленность, пилоэрекция или летаргическое состояние), и клинические признаки (0-2 пункта на основании нормального внешнего вида, мокрого хвоста, пониженной на ощупь температуры или изоляции от других животных).

Тестируемый состав	Доза	Число смертей к дню 6	Средняя масса тела на 3 день относительно дня -1	Средний клинический показатель на 3 день
Основа	Н/О	10	0,72	NA
Нестимулированные	Н/О	0	1,03	0
Донор В, суспензия фекалий	0,2 мл 10% суспензии	1	0,91	0,11
Донор А, споровый состав,	8,99*10 ⁷ Споровых эквивалента на	0	1,02	0

способный к прорастанию	дозу			
Донор А, споровый состав, способный к споруляции	7,46*10 ⁷ Споровых эквивалента на дозу	0	0,99	0

Таблица 16. Бактериальные OTU, связанные с приживлением и экологической стимуляцией, и приживление более разнообразной экогруппы микроорганизмов у пациентов, получавших лечение обработанным этанолом составом со спорами.

OTU	Филогенетическая клада	Спорообразу ющие OTU	Доминирующие OTU в стимулированно й экогруппе
Bacteroides sp. 2_1_22	клада38	НЕТ	ДА
Streptococcus anginosus	клада60	НЕТ	
Prevotella intermedia	клада81	НЕТ	
Prevotella nigrescens	клада81	НЕТ	
Oribacterium sp. ACB7	клада90	НЕТ	
Prevotella salivae	клада104	НЕТ	
Bacteroides intestinalis	клада171	НЕТ	ДА
Bifidobacterium dentium	клада172	НЕТ	
Alcaligenes faecalis	клада183	НЕТ	
Rothia dentocariosa	клада194	НЕТ	
Peptoniphilus lacrimalis	клада291	НЕТ	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Anaerococcus sp. gpac155	клада294	НЕТ	
Sutterella stercoricanis	клада302	НЕТ	ДА
Bacteroides sp. 3_1_19	клада335	НЕТ	ДА
Parabacteroides goldsteinii	клада335	НЕТ	
Bacteroides dorei	клада378	НЕТ	ДА
Bacteroides massiliensis	клада378	НЕТ	
Lactobacillus iners	клада398	НЕТ	
Granulicatella adiacens	клада460	НЕТ	
Eggerthella sp. 1_3_56FAA	клада477	НЕТ	
Gordonibacter pamelaee	клада477	НЕТ	
Finegoldia magna	клада509	НЕТ	
Actinomyces nasicola	клада523	НЕТ	
Streptobacillus moniliformis	клада532	НЕТ	
Oscillospira guilliermondii	клада540	НЕТ	
Orientia tsutsugamushi	клада541	НЕТ	
Christensenella minuta	клада558	НЕТ	
Clostridium oroticum	клада96	ДА	
Clostridium sp. D5	клада96	ДА	
Clostridium glycyrrhizinilyticum	клада147	ДА	
Coprococcus comes	клада147	ДА	
Ruminococcus lactaris	клада147	ДА	
Ruminococcus torques	клада147	ДА	ДА
Clostridiales sp. SS3/4	клада246	ДА	
Clostridium hylemonae	клада260	ДА	
Clostridium aerotolerans	клада269	ДА	

	<i>Clostridium asparagiforme</i>	клада300	ДА	ДА
	<i>Clostridium</i> sp. M62/1	клада300	ДА	
5	<i>Clostridium symbiosum</i>	клада300	ДА	
	Lachnospiraceae, геномовид C1	клада300	ДА	
	<i>Blautia</i> sp. M25	клада304	ДА	ДА
10	<i>Blautia stercoris</i>	клада304	ДА	
	<i>Ruminococcus hansenii</i>	клада304	ДА	
	<i>Ruminococcus obeum</i>	клада304	ДА	
15	<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	клада304	ДА	
	<i>Bryantella formatexigens</i>	клада309	ДА	
20	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	клада309	ДА	
	<i>Clostridium</i> sp. HGF2	клада351	ДА	
	<i>Clostridium bartlettii</i>	клада354	ДА	
25	<i>Clostridium bifermentans</i>	клада354	ДА	
	<i>Clostridium glycolicum</i>	клада354	ДА	
	<i>Eubacterium tenue</i>	клада354	ДА	
30	<i>Dorea formicigenerans</i>	клада360	ДА	
	<i>Dorea longicatena</i>	клада360	ДА	
	Бактерия Lachnospiraceae 2_1_46FAA	клада360	ДА	
35	Бактерия Lachnospiraceae 9_1_43BFAA	клада360	ДА	ДА
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	клада360	ДА	
	<i>Clostridium hathewayi</i>	клада362	ДА	
40	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	клада368	ДА	
	Бактерия Clostridiaceae END-2	клада368	ДА	
45	<i>Roseburia faecis</i>	клада369	ДА	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Roseburia hominis	клада370	ДА	
Roseburia intestinalis	клада370	ДА	
Eubacterium sp. WAL 14571	клада384	ДА	
Бактерия Erysipelotrichaceae5_2_54FAA	клада385	ДА	
Eubacterium biforme	клада385	ДА	
Eubacterium dolichum	клада385	ДА	
Coprococcus catus	клада393	ДА	
Acetivibrio ethanolgignens	клада396	ДА	
Anaerosporebacter mobilis	клада396	ДА	
Bacteroides pectinophilus	клада396	ДА	
Eubacterium hallii	клада396	ДА	
Eubacterium xylanophilum	клада396	ДА	
Anaerostipes caccae	клада408	ДА	
Бактерия Clostridiales 1_7_47FAA	клада408	ДА	
Clostridium aldenense	клада408	ДА	
Clostridium citroniae	клада408	ДА	
Eubacterium hadrum	клада408	ДА	ДА
Acetanaerobacterium elongatum	клада439	ДА	
Faecalibacterium prausnitzii	клада478	ДА	
Gemmiger formicilis	клада478	ДА	ДА
Eubacterium ramulus	клада482	ДА	
Бактерия Lachnospiraceae 3_1_57FAA_CT1	клада483	ДА	
Бактерия Lachnospiraceae A4	клада483	ДА	ДА
Бактерия Lachnospiraceae DJF VP30	клада483	ДА	
Holdemania filiformis	клада485	ДА	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridium orbiscindens	клада494	ДА	
Pseudoflavonifractor capillosus	клада494	ДА	
Бактерия Ruminococcaceae D16	клада494	ДА	
Acetivibrio cellulolyticus	клада495	ДА	
Eubacterium limosum	клада512	ДА	
Anaerotruncus colihominis	клада516	ДА	
Clostridium methylpentosum	клада516	ДА	
Clostridium sp. YIT 12070	клада516	ДА	
Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans	клада516	ДА	
Eubacterium ventriosum	клада519	ДА	
Eubacterium eligens	клада522	ДА	
Lachnospira pectinoschiza	клада522	ДА	
Lactobacillus rogosae	клада522	ДА	ДА
Clostridium leptum	клада537	ДА	
Eubacterium coprostanoligenes	клада537	ДА	
Ruminococcus bromii	клада537	ДА	
Clostridium viride	клада540	ДА	
Butyrivibrio crossotus	клада543	ДА	
Coprococcus eutactus	клада543	ДА	
Eubacterium ruminantium	клада543	ДА	
Eubacterium rectale	клада568	ДА	ДА
Roseburia inulinivorans	клада568	ДА	
Butyricicoccus pullicaecorum	клада572	ДА	
Eubacterium desmolans	клада572	ДА	
Papillibacter cinnamivorans	клада572	ДА	

Sporobacter termitidis	клада572	ДА	
Clostridium lactatifermentans	клада576	ДА	

Таблица 18. Снижение нагрузки оппортунистическими патогенами или патобионтами при применении обработанных этанолом спор.

	До лечения	День 5	День 14	День 25
Klebsiella (% от общих прочтений)	20,27%	1,32%	7,62%	0,00%
Fusobacterium (%от общих прочтений)	19,14%	3,01%	0,01%	0,00%

Таблица 19. Изменения Enterobacteria в зависимости от лечения, измеренные на цитратном агаре Симмонса

Пациент	Организм	Титр до лечения (КОЕ/г)	Титр на 25 день (КОЕ/г)
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9×10^6	1×10^3
1	<i>Klebsiella sp. Co9935</i>	4×10^6	1×10^3
1	<i>Escherichia coli</i>	7×10^6	1×10^6
2	<i>Klebsiella sp. Co9935</i>	4×10^6	1×10^3
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3×10^8	$< 1 \times 10^4$
4	<i>Klebsiella sp. Co9935</i>	6×10^7	$< 1 \times 10^4$
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^6	$< 1 \times 10^4$

Среда	Виды Bacteroides	Титр до лечения (КОЕ/г)	Титр на 25 день (КОЕ/г)
BBE	Группа <i>B. fragilis</i>	$<2 \times 10^4$	3×10^8
PFA	Все Bacteroides	$<2 \times 10^7$	2×10^{10}

Таблица 21. Bacteroides spp. после лечения обработанным этанолом составом со спорами на основании полных последовательностей 16S рРНК выделенных штаммов

Виды	% общиц КОЕ Bacteroides (1.58×10^{10} КОЕ/г)
Bacteroides sp. 4_1_36	63%
Bacteroides cellulosilyticus	14%
Bacteroides sp. 1_1_30	14%
Bacteroides uniformis	4,8%
Bacteroides ovatus	1,7%
Bacteroides dorei	0,91%
Bacteroides xylanisolvens	0,83%
Bacteroides sp. 3_1_19	0,23%

Таблица 22. Титры (в КОЕ/г) устойчивых к имипенему *M. morganii*, *P. rettgeri* и *P. pennerii* от пациентов В, Д и Е

Пациент	Организм	Титр до лечения	Титр на 28 день *
Пациент 2	<i>M. morganii</i>	1×10^4	6×10^2
Пациент 2	<i>P. rettgeri</i>	9×10^3	$<5 \times 10^1$
Пациент 4	<i>M. morganii</i>	2×10^4	$<5 \times 10^1$

Пациент 4	<i>P. pennerii</i>	2×10^4	$< 5 \times 10^1$
Пациент 5	<i>M. morganii</i>	5×10^3	$< 5 \times 10^1$

* Порог детекции на основании посева 200 мкл 10% (масса/объем) суспензии составляет 5×10^1

**Таблица УУУ. Виды, идентифицированные как способные к прорастанию согласно
16S с применением точечного метода выделения колоний**

5	Clostridium_paraputrificum
	Clostridium_disporicum
10	Clostridium_glycolicum
	Clostridium_bartlettii
	Clostridium_butyricum
15	Ruminococcus_bromii
	Бактерия Lachnospiraceae_2_1_58FAA
20	Eubacterium_hadrum
	Turicibacter_sanguinis
	Бактерия Lachnospiraceae_оральный_таксон_F15
25	Clostridium_perfringens
	Clostridium_bifermentans
30	Roseburia_sp_11SE37
	Clostridium_quinii
	Ruminococcus_lactaris
35	Clostridium_botulinum
	Clostridium_tyrobutyricum

40

45

5

10

15

20

25

30

35

Blautia_hansenii
Clostridium_kluyveri
Clostridium_sp_JC122
Clostridium_hylemonae
Clostridium_celatum
Clostridium_straminisolvens
Clostridium_orbiscindens
Roseburia_cecicola
Eubacterium_tenue
Clostridium_sp_7_2_43FAA
Бактерия Lachnospiraceae_4_1_37FAA
Eubacterium_rectale
Clostridium_viride
Ruminococcus_sp_K_1
Clostridium_symbiosum
Ruminococcus_torques
Clostridium_algidicarnis

Таблица ZZZ. Виды, идентифицированные как способные к споруляции с помощью методов 16S-NGS

40

45

Clostridium_paraputrificum
Clostridium_bartlettii
Бактерия Lachnospiraceae_2_1_58FAA

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridium_disporicum
Ruminococcus_bromii
Eubacterium_hadrum
Clostridium_butyricum
Roseburia_sp_11SE37
Clostridium_perfringens
Clostridium_glycolicum
Clostridium_hylemonae
Clostridium_orbiscindens
Ruminococcus_lactaris
Clostridium_symbiosum
Бактерия Lachnospiraceae_оральный_таксон_F15
Blautia_hansenii
Turicibacter_sanguinis
Clostridium_straminisolvens
Clostridium_botulinum
Бактерия Lachnospiraceae_4_1_37FAA
Roseburia_cecicola
Ruminococcus_sp_K_1
Clostridium_bif fermentans
Eubacterium_rectale
Clostridium_quinii
Clostridium_viride

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Clostridium_kluyveri
Clostridium_tyrobutyricum
Oscillibacter_sp_G2
Clostridium_sp_JC122
Бактерия Lachnospiraceae_3_1_57FAA
Clostridium_aldenense
Ruminococcus_torques
Clostridium_sp_7_2_43FAA
Clostridium_celatum
Eubacterium_sp_WAL_14571
Eubacterium_tenue
Бактерия Lachnospiraceae_5_1_57FAA
Clostridium_clostridioforme
Clostridium_sp_YIT_12070
Blautia_sp_M25
Anaerostipes_caccae
Roseburia_inulinivorans
Clostridium_sp_D5
Clostridium_asparagiforme
Coprobacillus_sp_D7
Clostridium_sp_HGF2
Clostridium_citroniae
Clostridium_difficile

Oscillibacter_valericigenes
Clostridium_algidicarnis

5

(57) Формула изобретения

1. Применение очищенной популяции способных к прорастанию бактериальных спор для лечения или предотвращения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома дисбиоза ЖКТ, связанного с *Clostridium difficile*, включая рецидивирующую инфекцию *C. difficile*, или язвенный колит у реципиента, представляющего собой млекопитающее, при этом способные к прорастанию бактериальные споры получены путем осуществления следующих этапов: а) обеспечение фекального материала от донора, представляющего собой млекопитающее, и б) проведение обработки этанолом или термообработки фекального материала, в результате которой получают популяцию способных к прорастанию бактериальных спор, причем из указанной очищенной популяции по существу устранен на детектируемом уровне патогенный материал, или патогенный материал по существу не имеет патогенной активности или имеет сниженный уровень патогенной активности, где необязательно указанный патогенный материал выбран из группы, состоящей из вируса, бактерии, эукариотического паразита, гельминта, фага, микоплазмы, токсоплазмы и гриба, причем споры содержат по меньшей мере два вида бактерий, содержащих последовательности нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 97% идентичные последовательностям нуклеиновых кислот, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 383, SEQ ID NO. 381, SEQ ID NO. 572, SEQ ID NO. 601, SEQ ID NO. 652, SEQ ID NO. 659, SEQ ID NO. 673, SEQ ID NO. 674, SEQ ID NO. 774, SEQ ID NO. 839, SEQ ID NO. 845, SEQ ID NO. 847, SEQ ID NO. 848, SEQ ID NO. 856, SEQ ID NO. 874, SEQ ID NO. 880, SEQ ID NO. 886, SEQ ID NO. 1049, SEQ ID NO. 1591, SEQ ID NO. 1655, SEQ ID NO. 1657, SEQ ID NO. 1670 и SEQ ID NO. 1896.

2. Применение очищенной популяции способных к прорастанию бактериальных спор для лечения или предотвращения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома дисбиоза ЖКТ, связанного с *Clostridium difficile*, включая рецидивирующую инфекцию *C. difficile*, или язвенный колит, причем из указанной очищенной популяции по существу устранен на детектируемом уровне патогенный материал, или патогенный материал по существу не имеет патогенной активности, или имеет сниженный уровень патогенной активности, где необязательно указанный патогенный материал выбран из группы, состоящей из вируса, бактерии, эукариотического паразита, гельминта, фага, микоплазмы, токсоплазмы и гриба, причем споры содержат по меньшей мере два вида бактерий, содержащих последовательности нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 97% идентичные последовательностям нуклеиновых кислот, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 383, SEQ ID NO. 381, SEQ ID NO. 572, SEQ ID NO. 601, SEQ ID NO. 652, SEQ ID NO. 659, SEQ ID NO. 673, SEQ ID NO. 674, SEQ ID NO. 774, SEQ ID NO. 839, SEQ ID NO. 845, SEQ ID NO. 847, SEQ ID NO. 848, SEQ ID NO. 856, SEQ ID NO. 874, SEQ ID NO. 880, SEQ ID NO. 886, SEQ ID NO. 1049, SEQ ID NO. 1591, SEQ ID NO. 1655, SEQ ID NO. 1657, SEQ ID NO. 1670 и SEQ ID NO. 1896.

3. Применение по любому из пп.1, 2, отличающееся тем, что реципиент-млекопитающее представляет собой человека.

4. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанный этап обработки включает

удаление по меньшей мере части бесклеточного компонента фекального материала с отделением тем самым способных к прорастанию бактериальных спор от бесклеточного материала.

5. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанный этап обработки включает

6. Применение по любому из пп.1, 2, отличающееся тем, что указанная очищенная популяция по существу лишена остаточного продукта среды обитания, такого как бесклеточный материал, такой как остаточные волокна, ДНК, материал вирусной оболочки, или нежизнеспособный материал, или эукариотическую клетку донора-млекопитающего.

7. Применение по любому из пп.1, 2, отличающееся тем, что указанная очищенная популяция очищена из фекального материала, полученного от донора-млекопитающего.

8. Применение по любому из пп.1, 2, отличающееся тем, что у указанного донора-млекопитающего подтверждено отсутствие детектируемого уровня патогена или

9. Применение по п.6, отличающееся тем, что количество указанного остаточного продукта среды обитания уменьшено по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более чем на 99% относительно фекального материала, полученного от донора-млекопитающего.

10. Применение по п.1, отличающееся тем, что обработка этанолом включает инкубирование в 50% этаноле при 37°C в течение 60 минут.

11. Применение по п.1, отличающееся тем, что термообработка включает инкубирование при 80°C в течение 30 минут.

12. Терапевтическая композиция, содержащая эффективное количество очищенной популяции способных к прорастанию бактериальных спор, полученных путем осуществления следующих этапов: а) обеспечение фекального материала от донора, представляющего собой млекопитающее, и б) проведение обработки этанолом или термообработки материала, в результате которой получают очищенную популяцию способных к прорастанию бактериальных спор, причем количество очищенной популяции является эффективным для лечения или предотвращения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома дисбиоза ЖКТ, связанного с *Clostridium difficile*, включая рецидивирующую инфекцию *C. difficile*, или язвенный колит у реципиента, представляющего собой млекопитающее, и i) размножения по меньшей мере одного типа бактерий, не присутствующих в указанной терапевтической композиции, у реципиента-млекопитающего, и/или ii) приживления по меньшей мере одного типа бактерий, присутствующих в терапевтической композиции, но не присутствующих у субъекта-млекопитающего до лечения; при этом из указанной очищенной популяции по существу устранен на детектируемом уровне патогенный материал, или патогенный материал по существу не имеет патогенной активности или имеет сниженный уровень патогенной активности, где необязательно указанный патогенный материал выбран из группы, состоящей из вируса, бактерии, эукариотического паразита, гельминта, фага, микоплазмы, токсоплазмы и гриба, причем споры содержат по меньшей мере два вида бактерий, содержащих последовательности нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 97% идентичные последовательностям нуклеиновых кислот, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 383, SEQ ID NO. 381, SEQ ID NO. 572, SEQ ID NO. 601, SEQ ID NO. 652, SEQ ID NO. 659, SEQ ID NO. 673, SEQ ID NO. 674, SEQ ID NO. 774, SEQ ID NO. 839, SEQ ID NO. 845, SEQ ID NO. 847, SEQ ID NO. 848, SEQ ID NO. 856, SEQ ID NO. 874, SEQ ID NO. 880, SEQ ID

NO. 886, SEQ ID NO. 1049, SEQ ID NO. 1591, SEQ ID NO. 1655, SEQ ID NO. 1657, SEQ ID NO. 1670 и SEQ ID NO. 1896.

13. Терапевтическая композиция, содержащая эффективное количество очищенной популяции способных к прорастанию бактериальных спор для лечения или предотвращения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома дисбиоза ЖКТ, связанного с *Clostridium difficile*, включая рецидивирующую инфекцию *C. difficile*, или язвенный колит, и i) размножения по меньшей мере одного типа бактерий, не присутствующих в указанной терапевтической композиции, у реципиента-млекопитающего, и/или ii) приживления по меньшей мере одного типа бактерий, присутствующих в терапевтической композиции, но не присутствующих у субъекта-млекопитающего до лечения, причем из указанной очищенной популяции по существу устранен на детектируемом уровне патогенный материал, или патогенный материал по существу не имеет патогенной активности, или имеет сниженный уровень патогенной активности, где необязательно указанный патогенный материал выбран из группы, состоящей из вируса, бактерии, эукариотического паразита, гельминта, фага, микоплазмы, токсоплазмы и гриба, причем споры содержат по меньшей мере два вида бактерий, содержащих последовательности нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 97% идентичные последовательностям нуклеиновых кислот, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 383, SEQ ID NO. 381, SEQ ID NO. 572, SEQ ID NO. 601, SEQ ID NO. 652, SEQ ID NO. 659, SEQ ID NO. 673, SEQ ID NO. 674, SEQ ID NO. 774, SEQ ID NO. 839, SEQ ID NO. 845, SEQ ID NO. 847, SEQ ID NO. 848, SEQ ID NO. 856, SEQ ID NO. 874, SEQ ID NO. 880, SEQ ID NO. 886, SEQ ID NO. 1049, SEQ ID NO. 1591, SEQ ID NO. 1655, SEQ ID NO. 1657, SEQ ID NO. 1670 и SEQ ID NO. 1896.

14. Терапевтическая композиция по любому из пп.12, 13, отличающаяся тем, что реципиент-млекопитающее представляет собой человека.

15. Терапевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что указанный этап обработки включает удаление по меньшей мере части бесклеточного компонента фекального материала, тем самым отделяя способные к прорастанию бактериальные споры от бесклеточного материала.

16. Терапевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что указанный этап обработки включает истощение или инактивацию патогенного материала.

17. Терапевтическая композиция по любому из пп.12, 13, отличающаяся тем, что из указанной очищенной популяции по существу удален остаточный продукт среды обитания, такой как бесклеточный материал, такой как остаточные волокна, ДНК, материал вирусной оболочки, или нежизнеспособный материал, или эукариотическая клетка донора-млекопитающего.

18. Терапевтическая композиция по любому из пп.12, 13, отличающаяся тем, что указанная очищенная популяция очищена из фекального материала, полученного от донора-млекопитающего.

19. Терапевтическая композиция по любому из пп.12, 13, отличающаяся тем, что у указанного донора-млекопитающего подтверждено отсутствие детектируемого уровня патогена или патобионта до получения фекального материала.

20. Терапевтическая композиция по п.17, отличающаяся тем, что количество указанного остаточного продукта среды обитания уменьшено по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более чем на 99% относительно фекального материала, полученного от донора-млекопитающего.

21. Терапевтическая композиция по любому из пп.12, 13, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^4 спор на грамм

или на дозу, или указанная композиция содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} или более чем на 1×10^{10} спор на грамм или на дозу.

5 22. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что обработка этанолом включает инкубирование в 50% этаноле при 37°C в течение 60 минут.

23. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что термообработка включает инкубирование при 80°C в течение 30 минут.

10

15

20

25

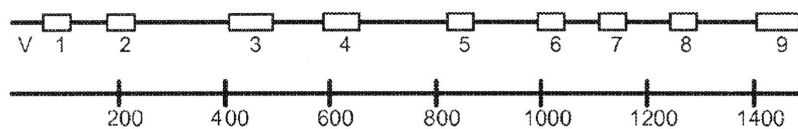
30

35

40

45

1/21



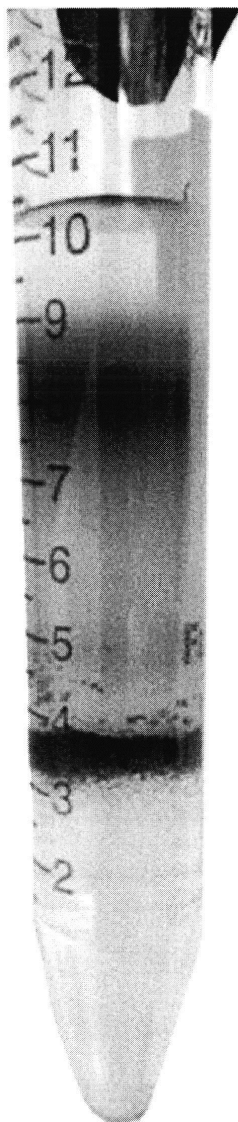
Фиг. 1А

```

1   AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTA
51  ACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTCTTTGCTGACGA
101 GTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATA
151 ACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG
201 GGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG
251 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
301 GATGACCAGCCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
351 CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC
401 GCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTAGCGGGGAGGA
451 AGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAAGC
501 ACCGGCTAACTCGTCCCCAGGCATGCCGAGGAATACGGAGGTGCAAGCGT
551 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAG
601 ATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGC
651 TTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
701 AGAGATCTGSAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACT
751 CACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTGT
801 AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
851 GCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
901 GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATG
951 TGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCAC
1001 GGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGC
1051 TGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
1101 ACGAGCGCAACCCCTTATCCCTTGTGTCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAA
1151 AGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
1201 TCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAA
1251 AGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGGCTGCTAGT
1301 CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
1351 CGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
1401 CCCGMCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTT
1451 CGGGAGGGGCGTTACCACCTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC
1501 AAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA

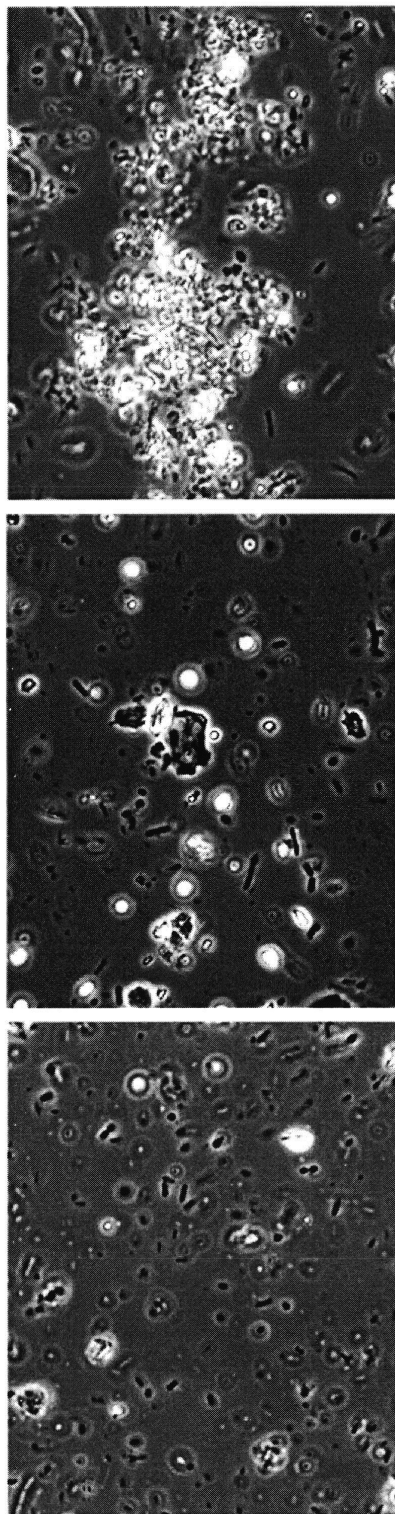
```

Фиг. 1В



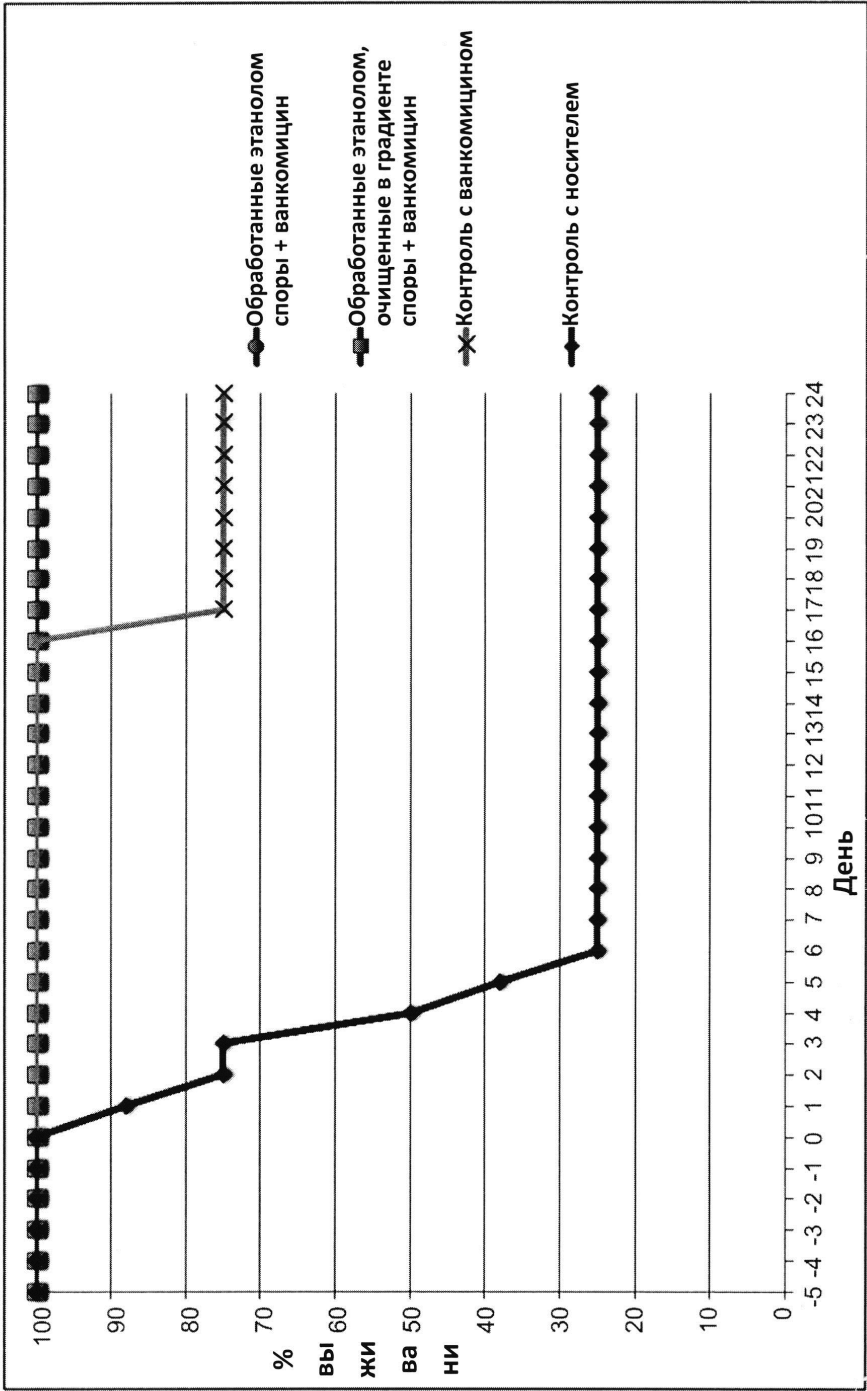
Фиг. 2

3/21



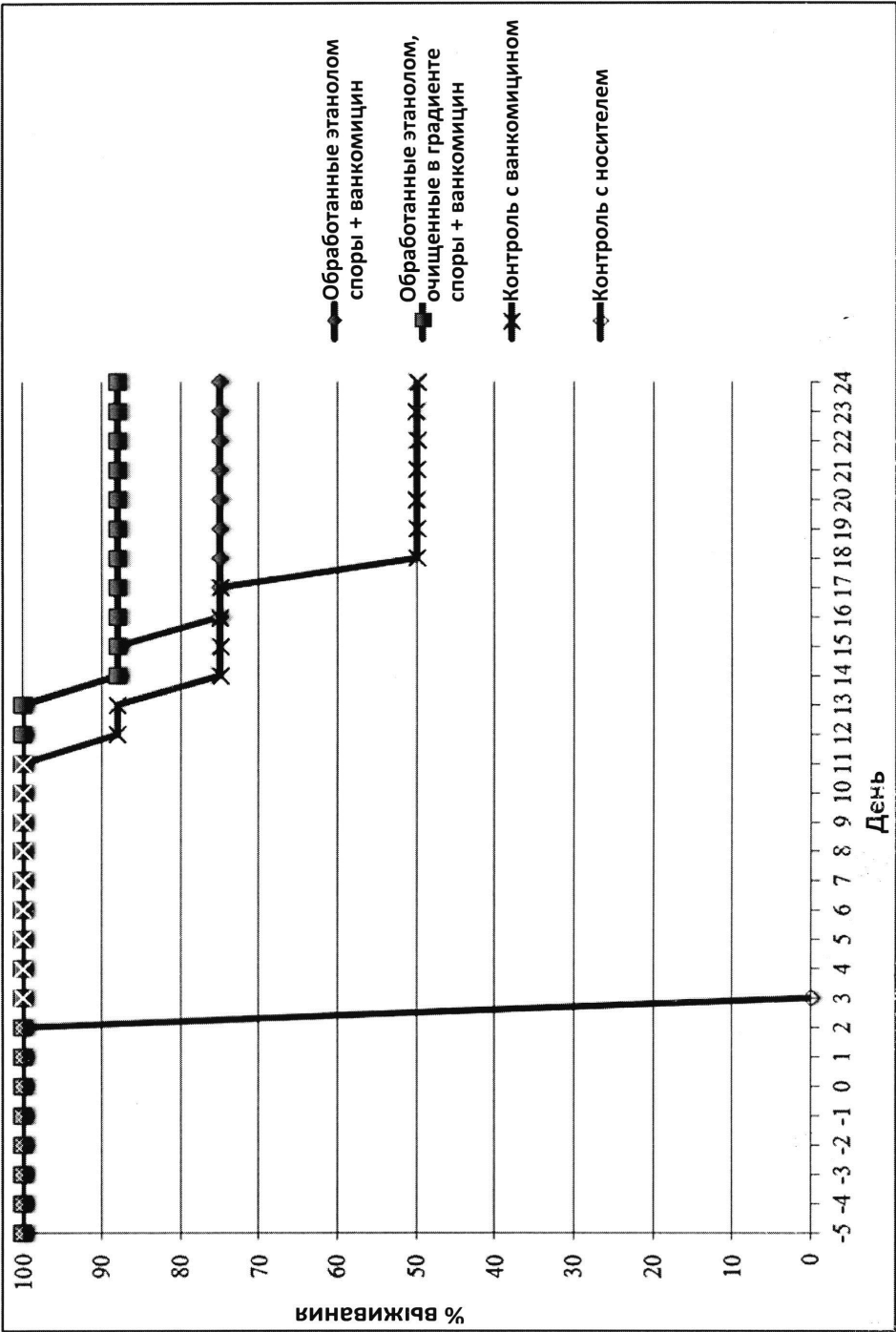
Фиг. 3

4/21



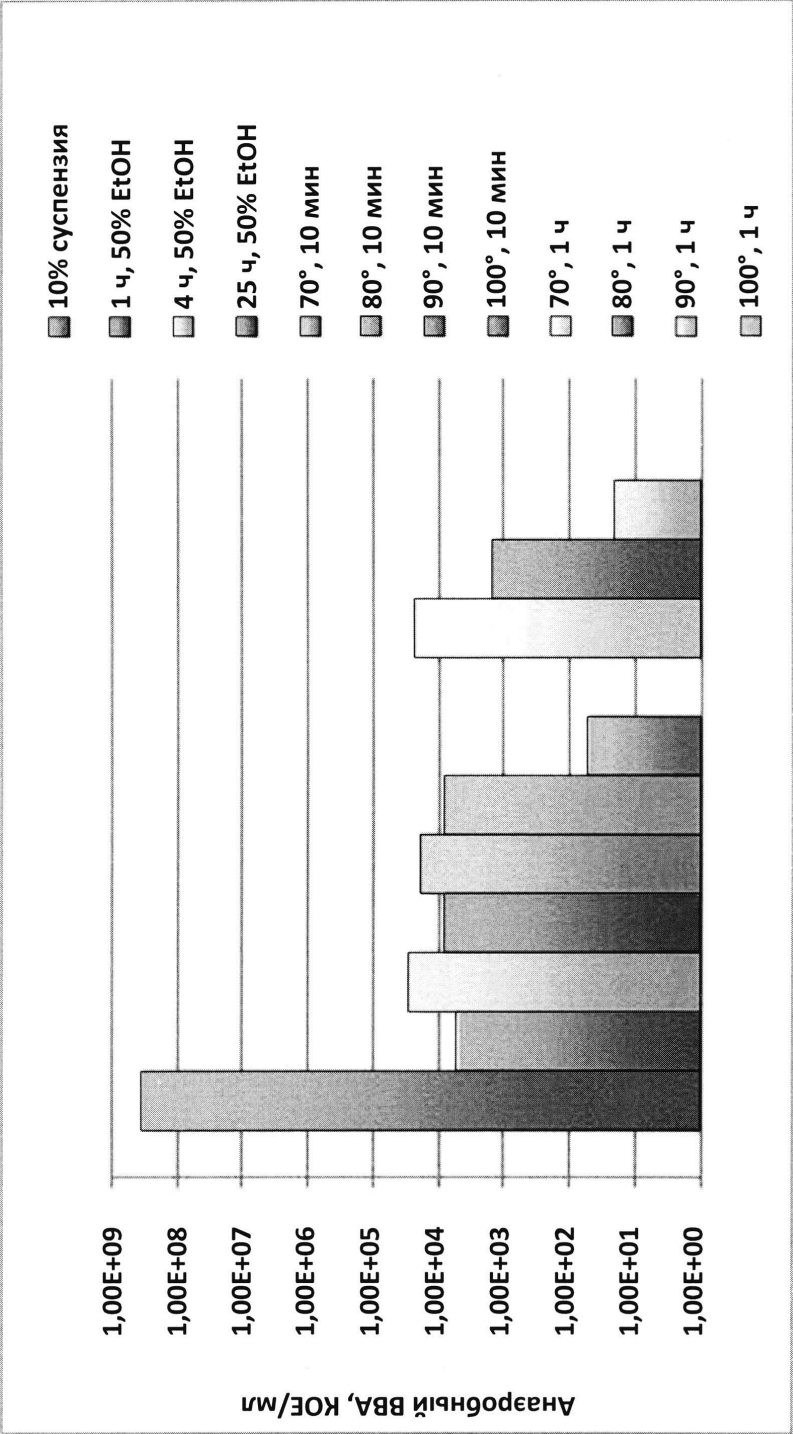
Фиг. 4

5/21

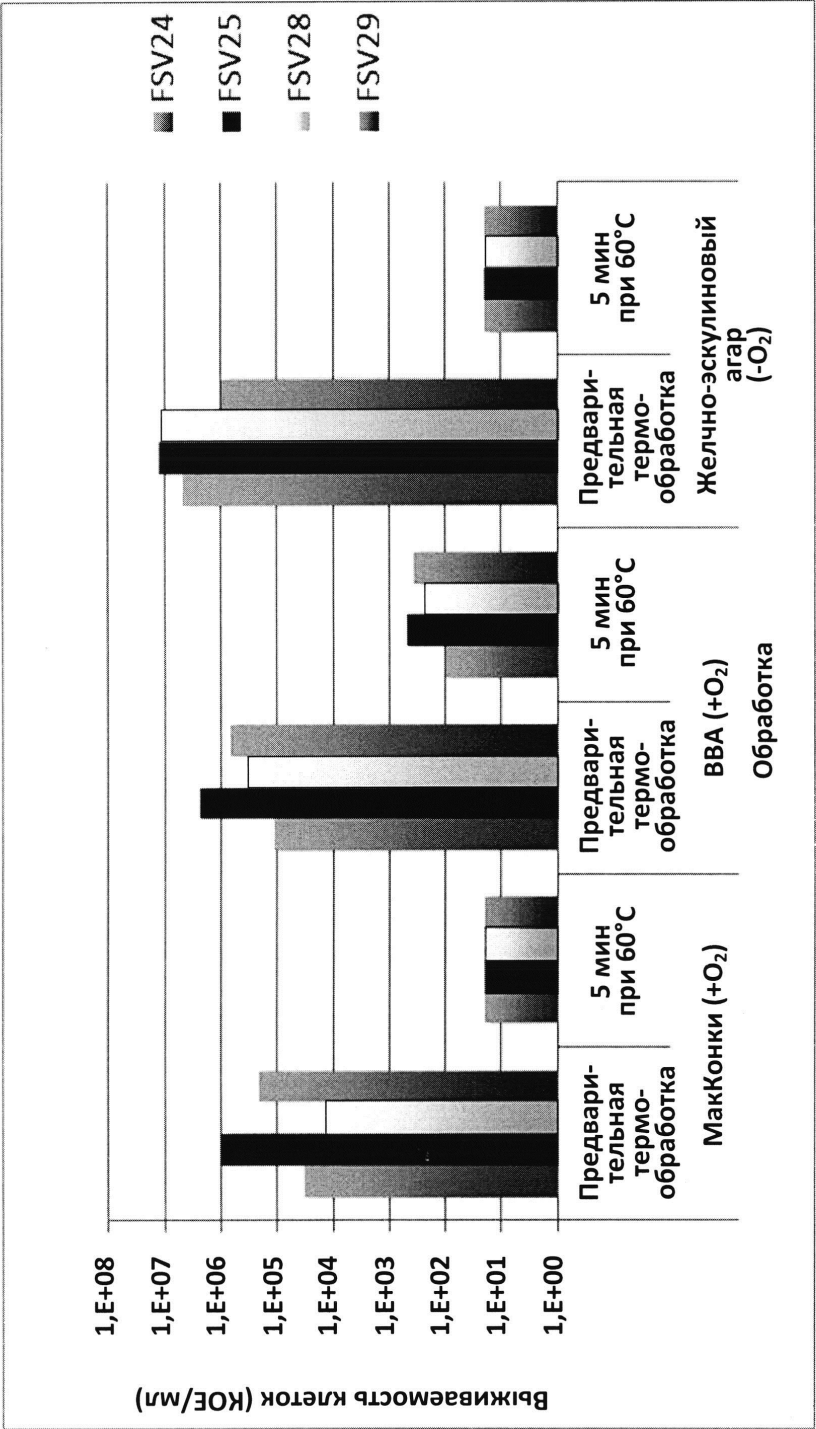


Фиг. 5

6/21

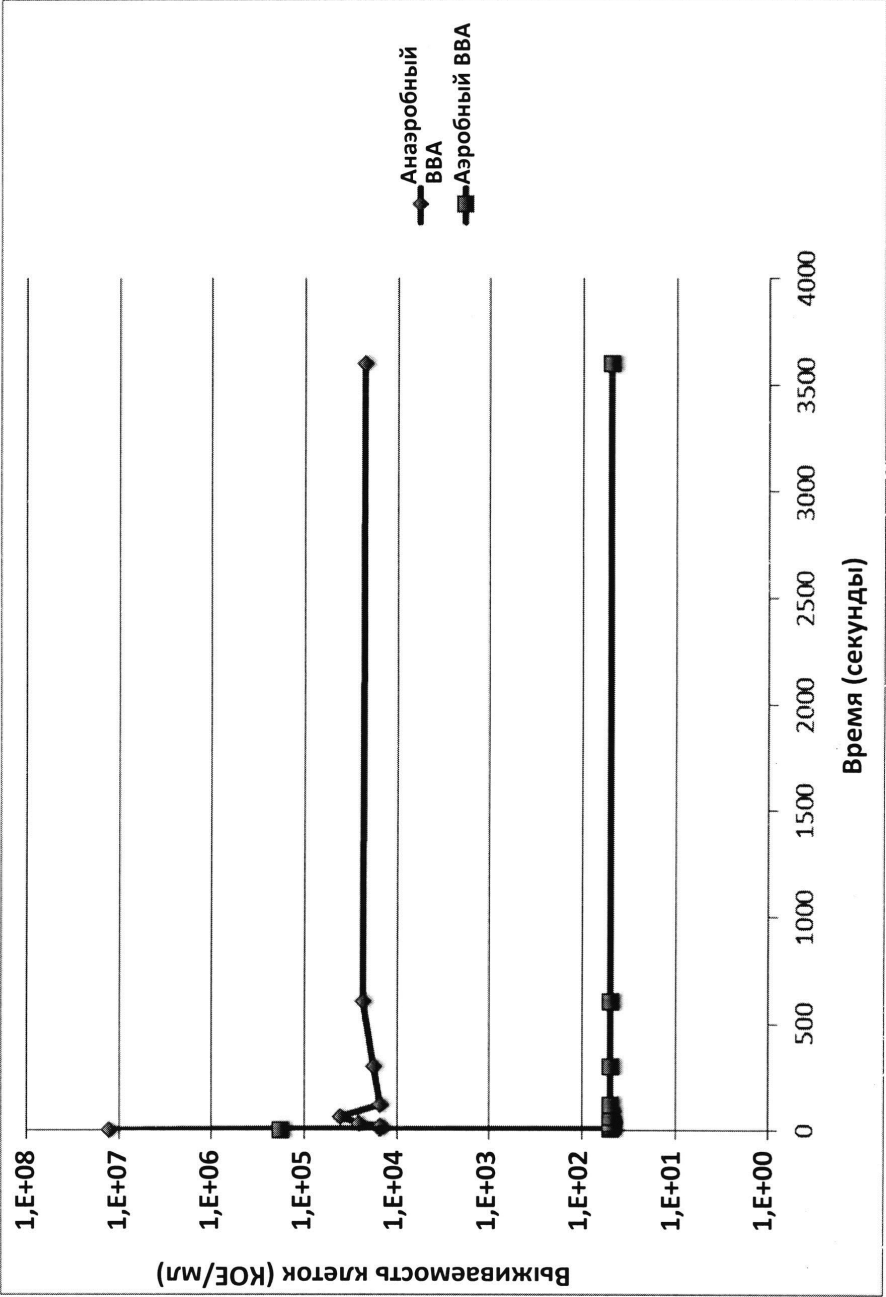


Фиг. 6



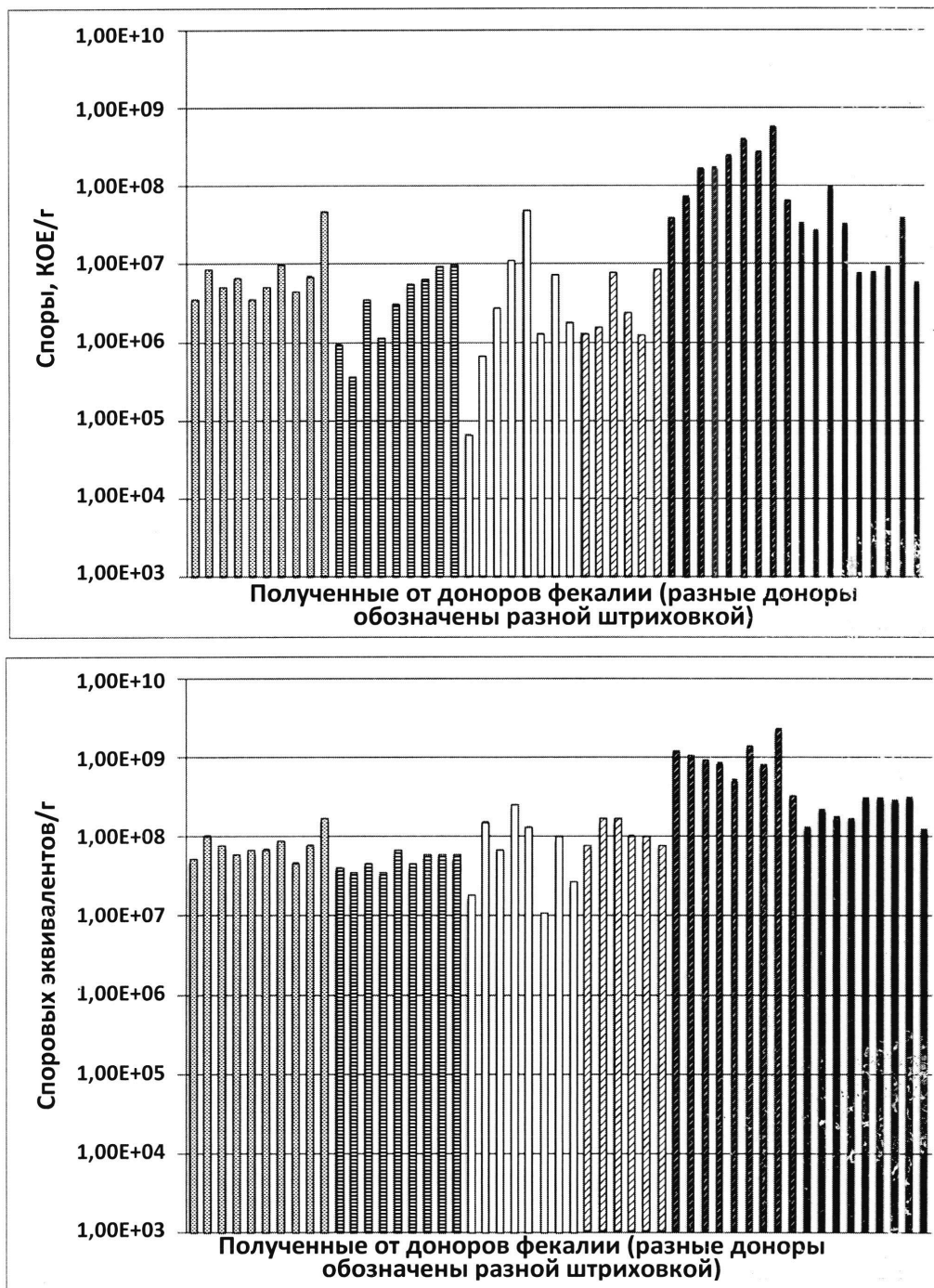
Фиг. 7

8/21



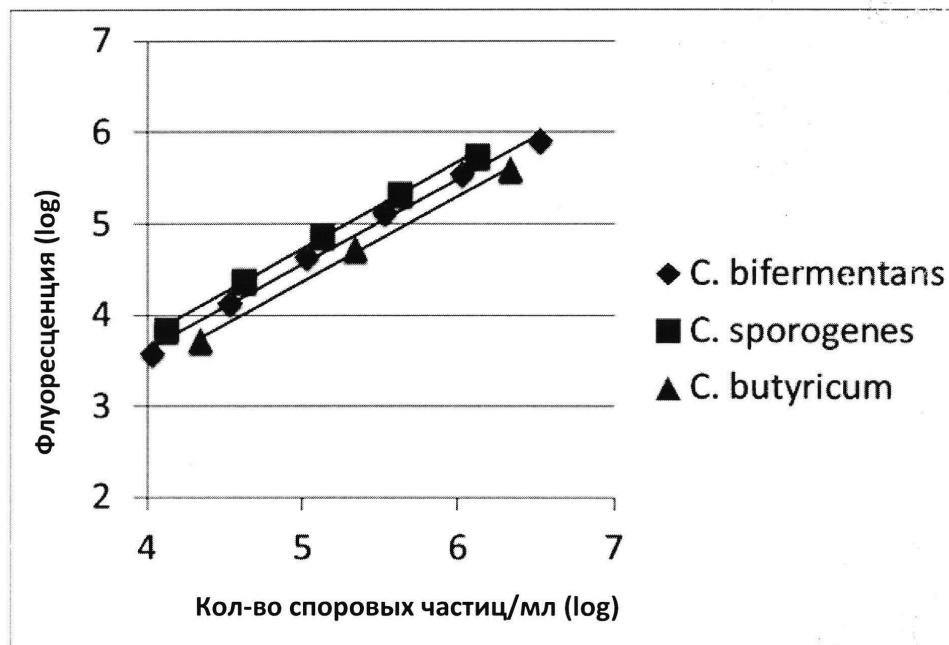
Фиг. 8

9/21



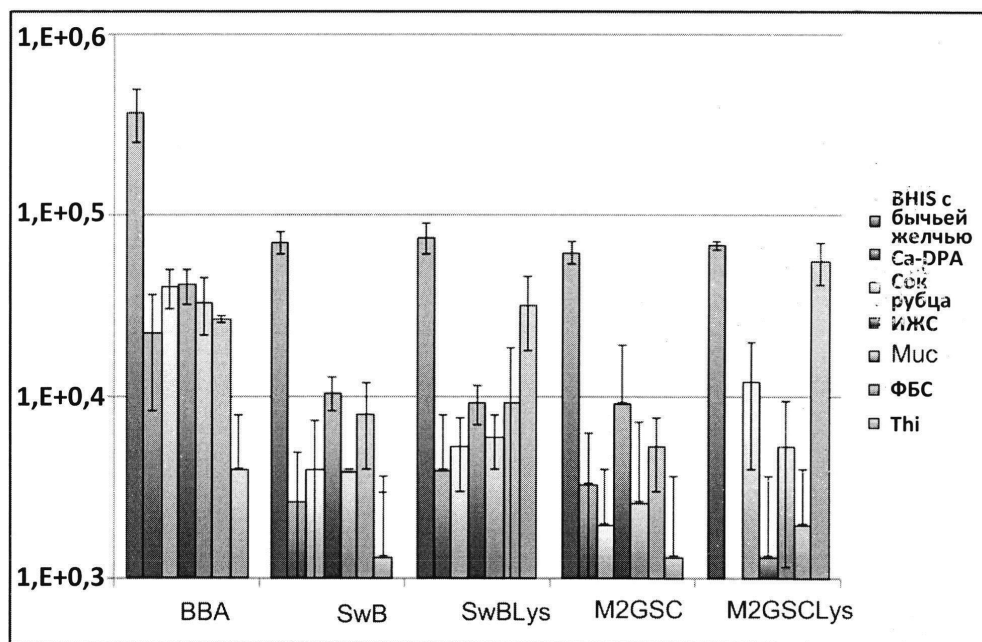
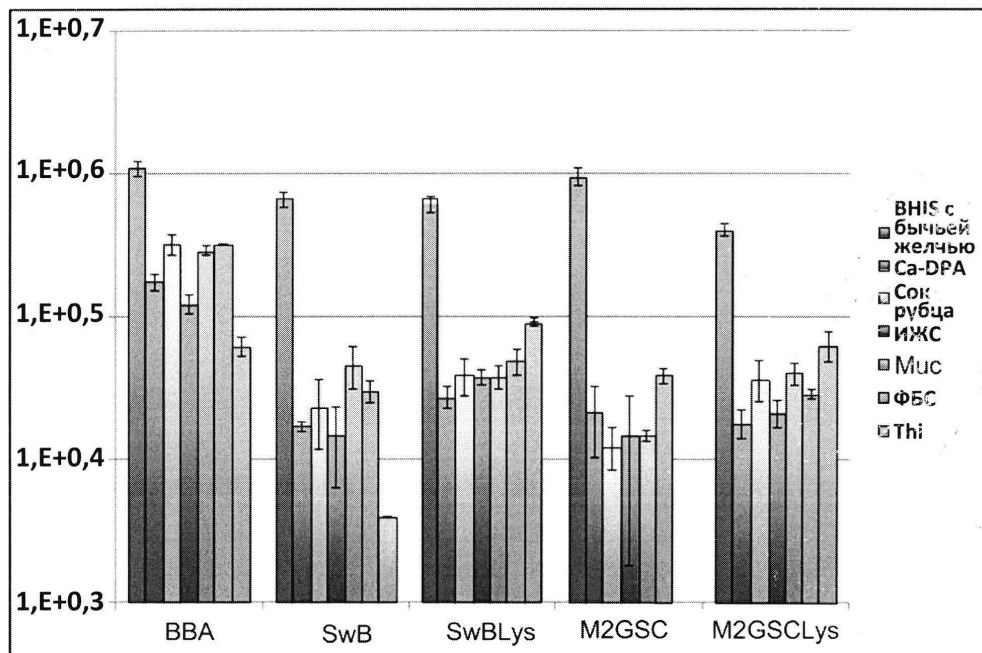
Фиг. 9

10/21



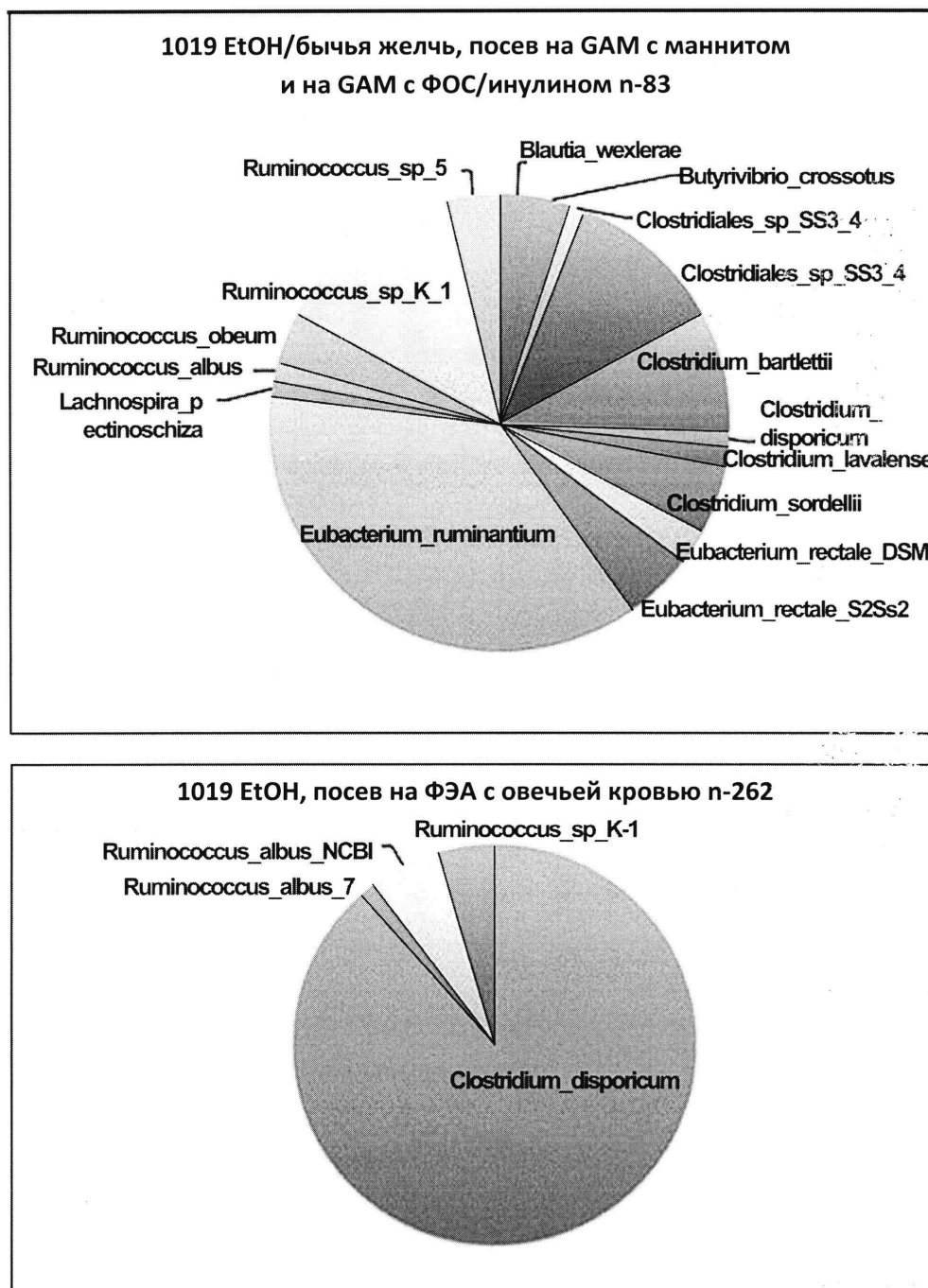
Фиг. 10

11/21



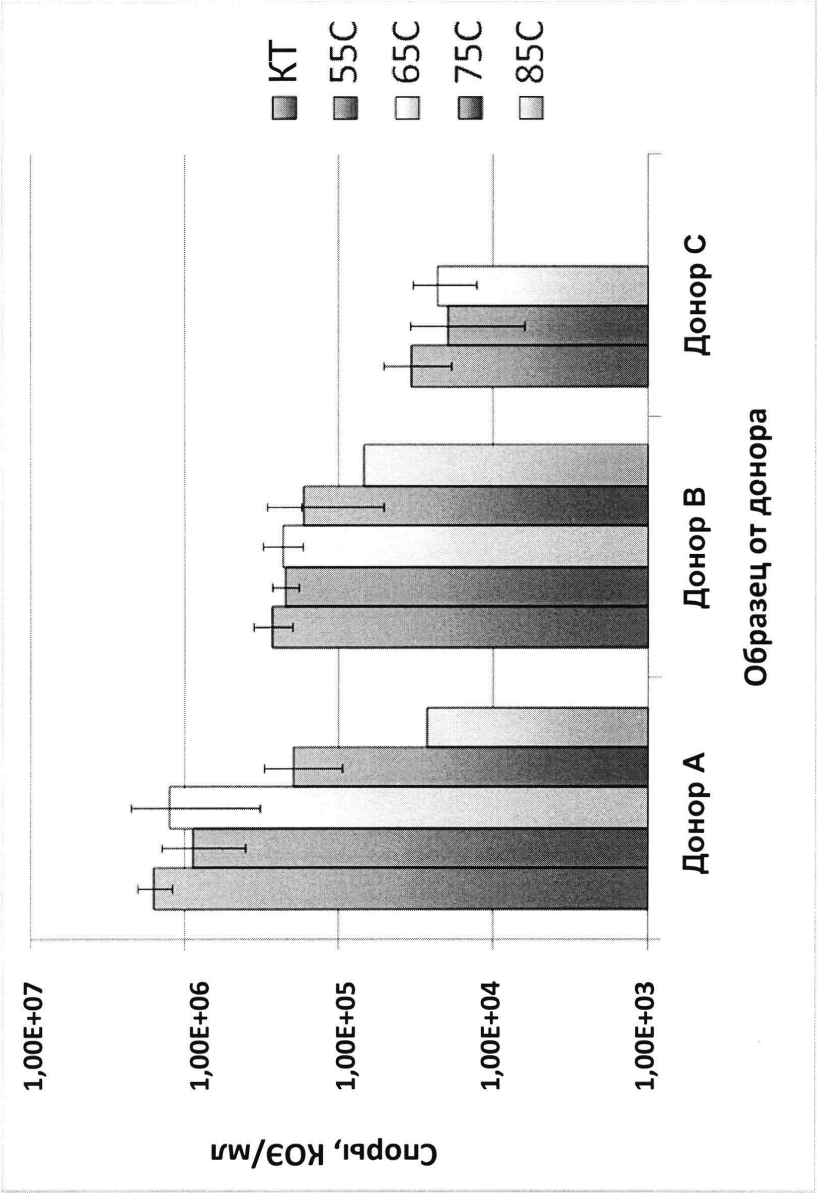
Фиг. 11

12/21



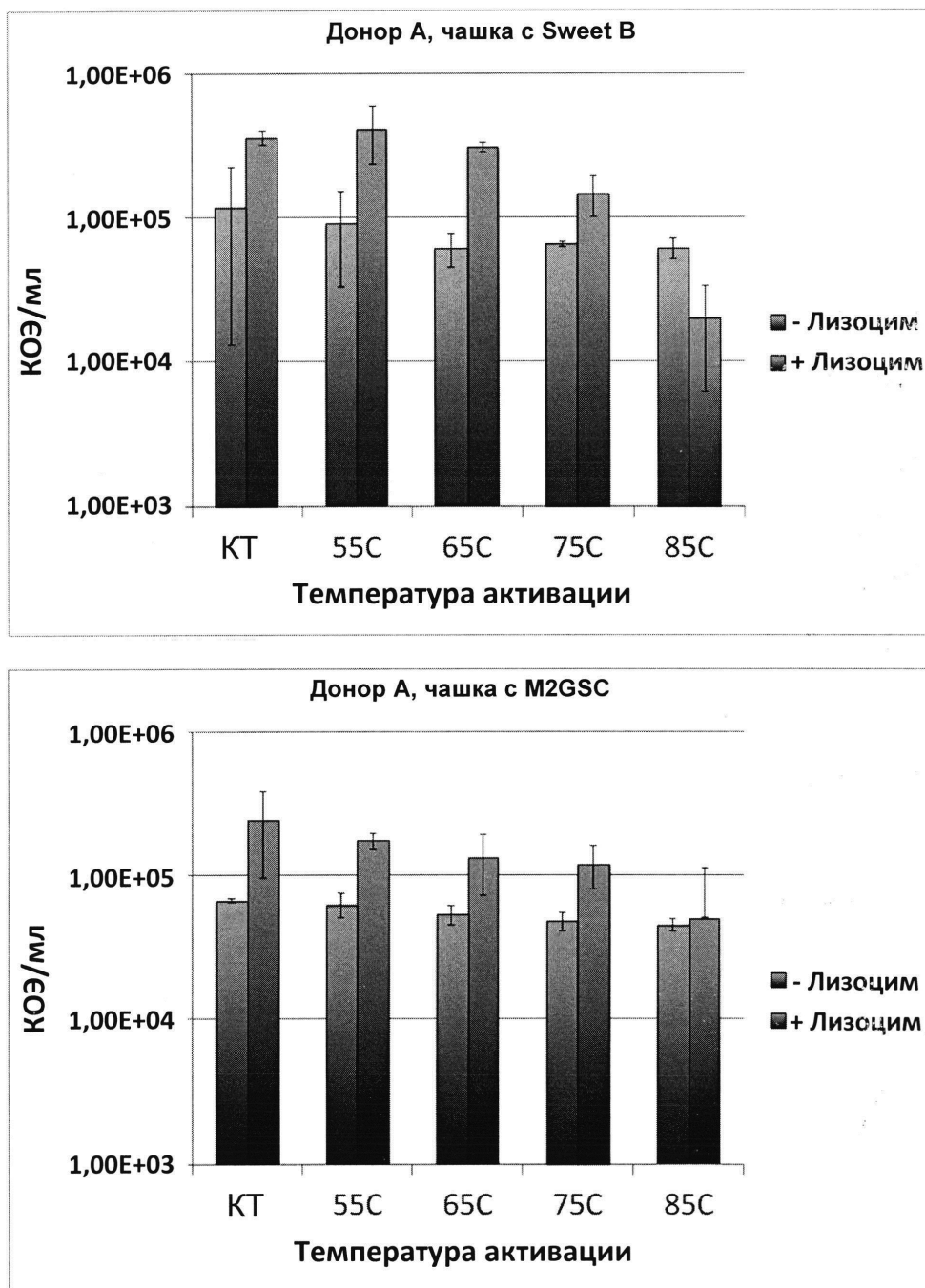
Фиг. 12

13/21



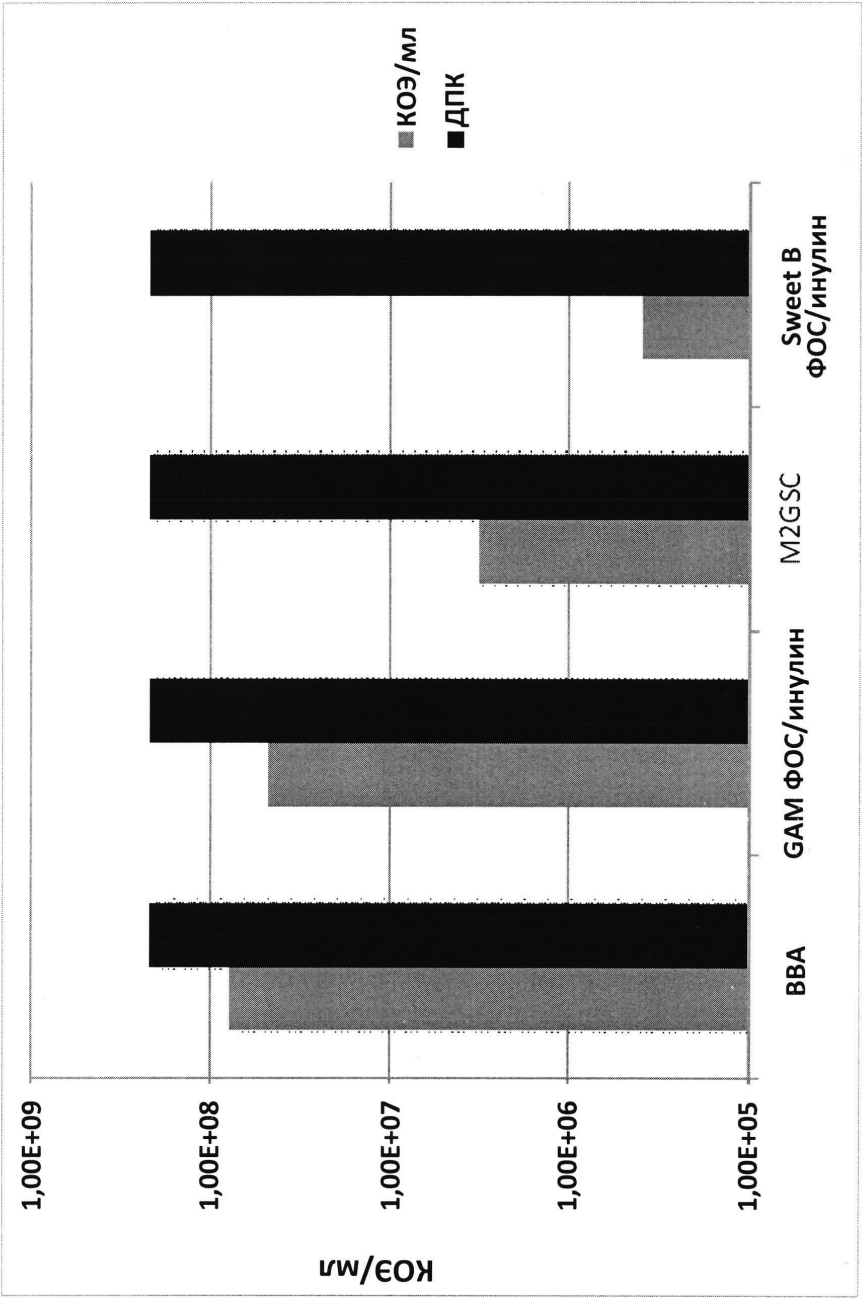
Фиг. 13

14/21



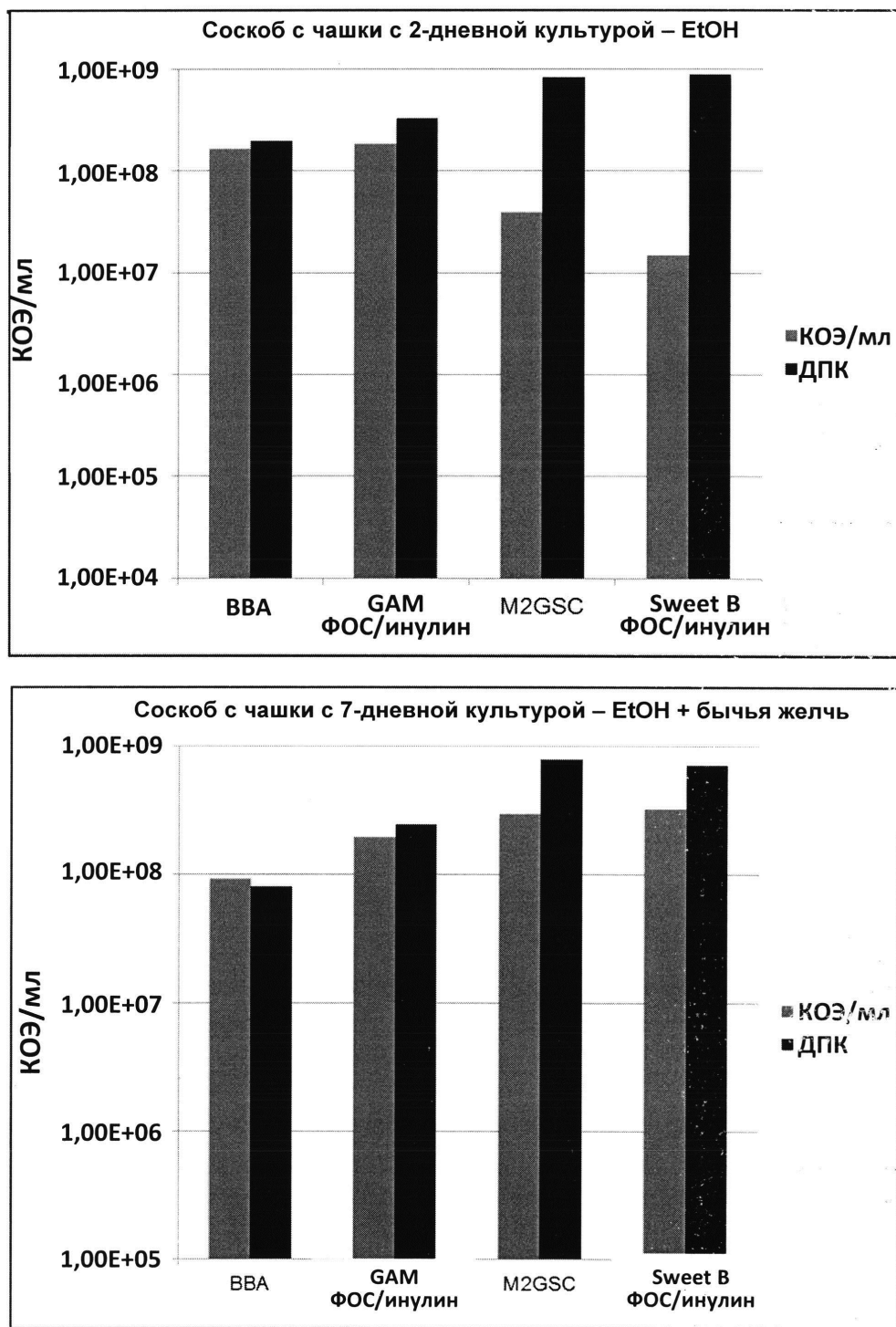
Фиг. 14

15/21

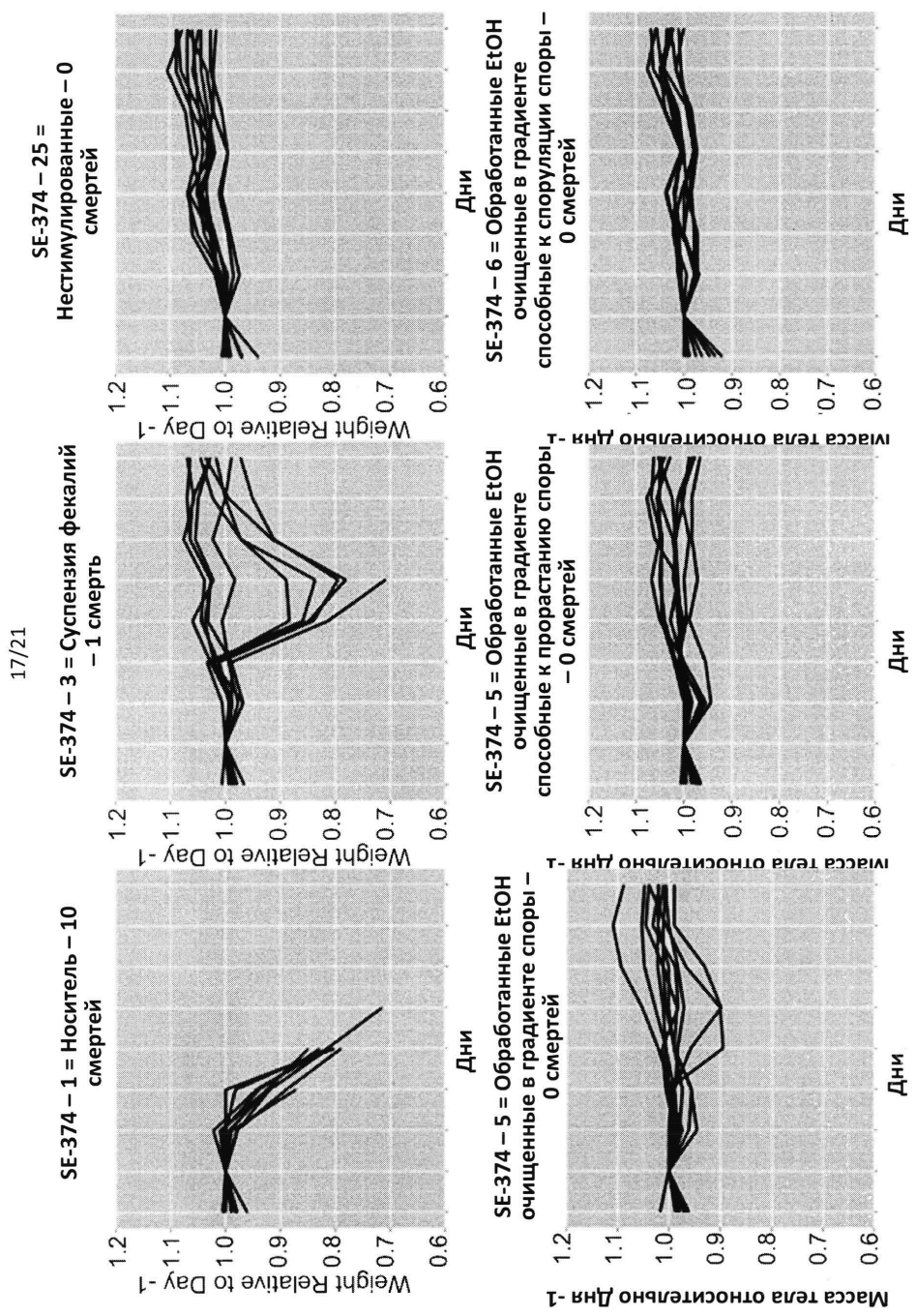


Фиг. 15

16/21

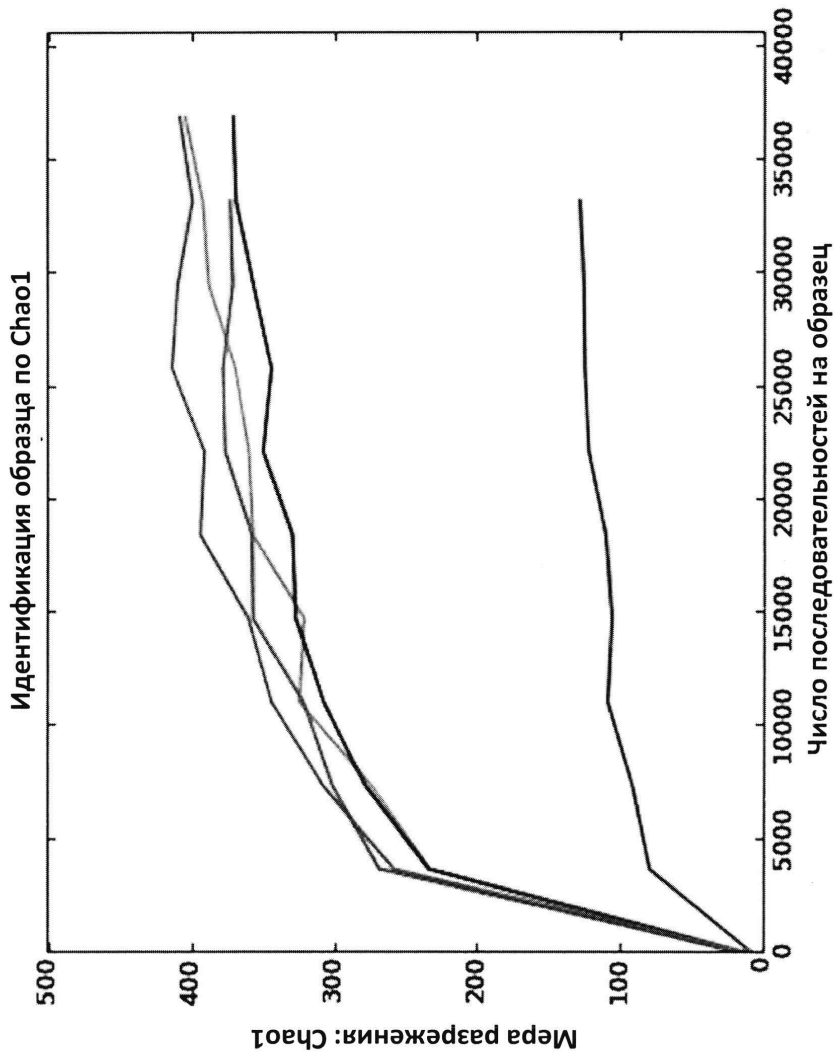


Фиг. 16

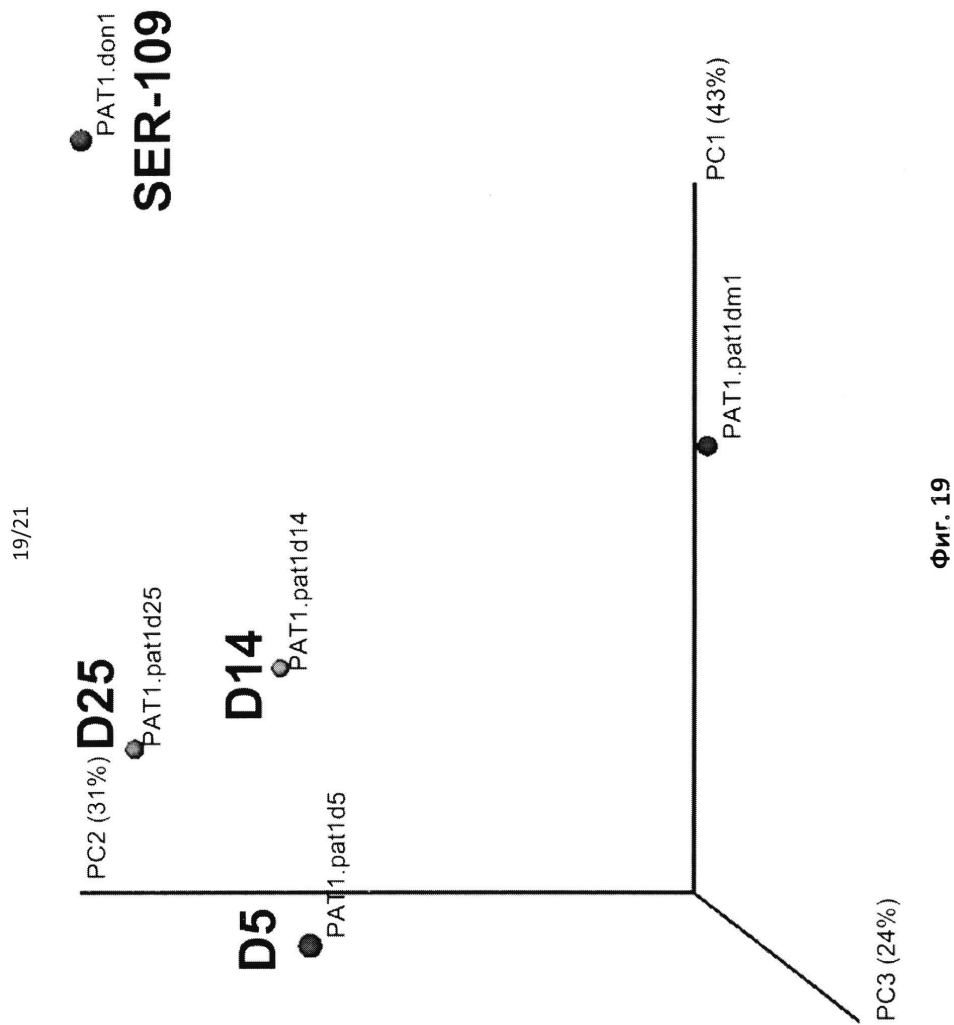


Фиг. 17

18/21

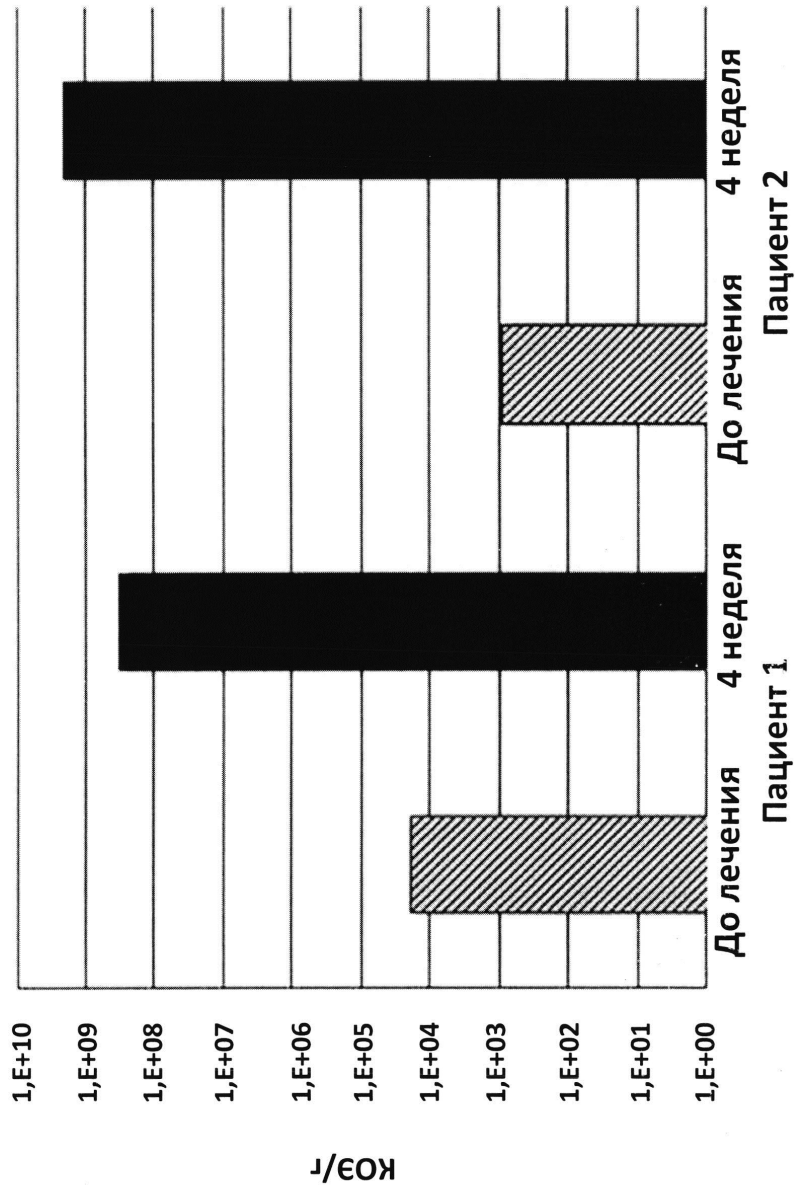


Фиг. 18



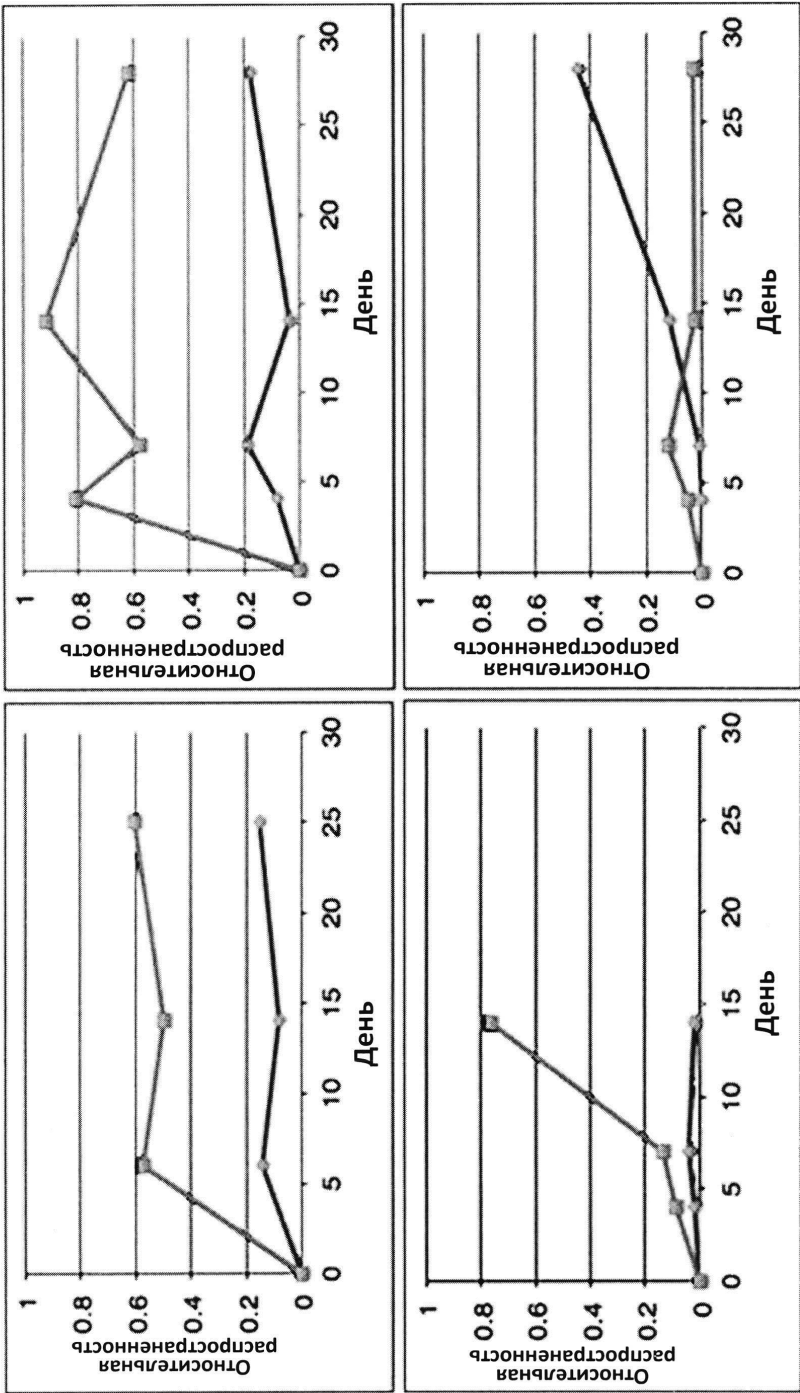
20/21

Группа *Bacteroides fragilis*



Фиг. 20

21/21



Фиг. 21