

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Оценка динамики выявления жизнеспособного SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в биологических образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в условиях стационара, как одного из показателей инфекционности вируса

Кузнецова Н.А.^{1, #}, Огаркова Д.А.^{1, #}, Гушин В.А.^{1, #}, Антипят Н.А.², Бакалин В.В.³, Бургасова О.А.³, Васильченко Л.А.¹, Дивисенко Е.В.¹, Колобухина Л.В.¹, Кружкова И.С.¹, Никифорова М.А.¹, Одноралов М.А.², Самков А.А.², Симакова Я.В.¹, Синявин А.Э.¹, Ткачук А.П.¹, Шидловская Е.В.¹, Тюрин И.Н.², Злобин В.И.¹, Гинцбург А.Л.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы», 125367, г. Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

Введение. Изучение механизмов передачи вируса SARS-CoV-2 является основой для выстраивания стратегии противоэпидемических мероприятий в условиях пандемии COVID-19. Понимание того, в какой временной перспективе больной может распространять SARS-CoV-2, так же важно, как и знание самих механизмов передачи вируса. Эта информация необходима для разработки эффективных мер профилактики инфицирования путём разрыва цепочки передачи вируса.

Цель работы – выявление инфекционного вируса SARS-CoV-2 в образцах пациентов в динамике заболевания и определение продолжительности выделения вируса пациентами с различной тяжестью течения COVID-19.

Материалы и методы. У пациентов, включённых в исследование, проводили сбор биоматериала (назофарингеальный мазок) для дальнейшего анализа методом количественной ОТ-ПЦР и вирусологического определения инфекционности для мазка.

Результаты. Нами определены сроки сохранения инфекционности вируса у пациентов, госпитализированных с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19. По результатам исследования проведён анализ зависимости между количеством детектируемой РНК SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР и инфекционностью вируса в культуре клеток *in vitro* у больных COVID-19. Медианное время выделения пациентами инфекционного вируса составило 8 дней. Кроме того, проведён сравнительный анализ разных протоколов выявления РНК вируса относительно обнаружения инфекционного вируса.

Заключение. Полученные данные позволяют оценить динамику выявления и вирусную нагрузку SARS-CoV-2 у больных COVID-19, а также значение установленных параметров для последующего распространения вируса и организации профилактических мероприятий.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; инфекционность; инфекционный вирус; ЦПЭ; ОТ-ПЦР; тяжесть течения COVID-19; ROC-анализ

Для цитирования: Кузнецова Н.А., Огаркова Д.А., Гушин В.А., Антипят Н.А., Бакалин В.В., Бургасова О.А., Васильченко Л.А., Дивисенко Е.В., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Никифорова М.А., Одноралов М.А., Самков А.А., Симакова Я.В., Синявин А.Э., Ткачук А.П., Шидловская Е.В., Тюрин И.Н., Злобин В.И., Гинцбург А.Л. Оценка динамики выявления жизнеспособного SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в биологических образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в условиях стационара, как одного из показателей инфекционности вируса. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 105-116. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160> EDN: <https://elibrary.ru/bhkjkr>

Для корреспонденции: Гушин Владимир Алексеевич, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: wowaniada@yandex.ru

[#]Авторы статьи, внесшие равный вклад в подготовку публикации.

Участие авторов: Кузнецова Н.А. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, написание статьи; Огаркова Д.А. – анализ и интерпретация данных, подготовка рисунков, написание статьи; Гушин В.А. – руководство исследованием, концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи; Антипят Н.А. – сбор материалов исследований и клинических данных; Бакалин В.В. – сбор материалов исследований и клинических данных; Бургасова О.А. – концепция и дизайн исследования, сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Васильченко Л.А. – проведение экспериментов; Дивисенко Е.В. – проведение экспериментов; Колобухина Л.В. – концепция и дизайн исследования, сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Кружкова И.С. – сбор материалов исследований и клинических данных; Никифорова М.А. – проведение экспериментов; Одрноралов М.А. – сбор материалов исследований и клинических данных; Самков А.А. – сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Симакова Я.В. – анализ и интерпретация данных; Синявин А.Э. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, корректировка текста публикации; Ткачук А.П. – обеспечение исследования; Шидловская Е.В. – проведение экспериментов; Тюрин И.Н. – сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Злобин В.И. – анализ и интерпретация данных, корректировка текста публикации; Гинцбург А.Л. – утверждение концепции исследования и принятие финального решения о публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета (№ АААА-А20-120113090054-6, №122100500017-9).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России А. Захаровой и Т. Ремизову за организацию поставки реагентов для исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (протоколы заседаний № 11а от 16.11.2020 и № 1 от 11.02.2021).

Поступила 25.01.2023

Принята в печать 13.03.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160>

Evaluation of the dynamics of detection of viable SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in biological samples obtained from patients with COVID-19 in a health care setting, as one of the indicators of the infectivity of the virus

Nadezhda A. Kuznetsova^{1, #}, Darya A. Ogarkova^{1, #}, Vladimir A. Gushchin^{1, #}, Natalya A. Antipyat², Valeria V. Bacalin³, Olga A. Burgasova³, Lyudmila A. Vasilchenko¹, Elizaveta V. Divisenko¹, Liudmila V. Kolobukhina¹, Irina S. Kruzhkova¹, Maria A. Nikiforova¹, Mikhail A. Odrnoralov², Alexey A. Samkov², Yana V. Simakova¹, Andrei E. Siniavin¹, Artem P. Tkachuk¹, Elena V. Shidlovskaya¹, Igor N. Tyurin², Vladimir I. Zlobin¹, Alexander L. Gintzburg¹

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Infectious Clinical Hospital No. 1 of the Department of Health of the Moscow, 125367, Moscow, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia

Introduction. The study of the mechanisms of transmission of the SARS-CoV-2 virus is the basis for building a strategy for anti-epidemic measures in the context of the COVID-19 pandemic. Understanding in what time frame a patient can spread SARS-CoV-2 is just as important as knowing the transmission mechanisms themselves. This information is necessary to develop effective measures to prevent infection by breaking the chains of transmission of the virus.

The aim of the work – is to identify the infectious SARS-CoV-2 virus in patient samples in the course of the disease and to determine the duration of virus shedding in patients with varying severity of COVID-19.

Materials and methods. In patients included in the study, biomaterial (nasopharyngeal swabs) was subjected to analysis by quantitative RT-PCR and virological determination of infectivity of the virus.

Results. We have determined the timeframe of maintaining the infectivity of the virus in patients hospitalized with severe and moderate COVID-19. Based on the results of the study, we made an analysis of the relationship between the amount of detected SARS-CoV-2 RNA and the infectivity of the virus *in vitro* in patients with COVID-19. The median time of the infectious virus shedding was 8 days. In addition, a comparative analysis of different protocols

[#]These authors contributed equally to this work.

for the detection of the viral RNA in relation to the identification of the infectious virus was carried out.

Conclusion. The obtained data make it possible to assess the dynamics of SARS-CoV-2 detection and viral load in patients with COVID-19 and indicate the significance of these parameters for the subsequent spread of the virus and the organization of preventive measures.

Keywords: SARS-CoV-2; infectivity; RT-PCR; severity of COVID-19; ROC analysis

For citation: Kuznetsova N.A., Ogarkova D.A., Gushchin V.A., Antipyat N.A., Bacalin V.V., Burgasova O.A., Vasilchenko L.A., Divisenko E.V., Kolobukhina L.V., Kruzhkova I.S., Nikiforova M.A., Odnoralov M.A., Samkov A.A., Simakova Ya.V., Siniavin A.E., Tkachuk A.P., Shidlovskaya E.V., Tyurin I.N., Zlobin V.I., Gintsburg A.L. Evaluation of the dynamics of detection of viable SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in biological samples obtained from patients with COVID-19 in a health care setting, as one of the indicators of the infectivity of the virus. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 105-116. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160> EDN: <https://elibrary.ru/bhjkjkp>

For correspondence: Vladimir A. Gushchin, PhD (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Population Variability of Pathogenic Microorganisms, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: wowaniada@yandex.ru

Information about the authors:

Kuznetsova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7399-7628>
Ogarkova D.A., <https://orcid.org/0000-0002-1152-4120>
Gushchin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>
Antipyat N.A., <https://orcid.org/0000-0001-8578-2838>
Bacalin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0491-9925>
Burgasova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5486-0837>
Vasilchenko L.A., <https://orcid.org/0000-0003-0780-7782>
Divisenko E.V. <https://orcid.org/0009-0000-5470-4917>
Kolobukhina L.V., <https://orcid.org/0000-0001-5775-3343>
Kruzhkova I.S., <https://orcid.org/0000-0002-1983-481X>
Nikiforova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-5823-6508>
Odnoralov M.A., <https://orcid.org/0000-0003-0525-6075>
Samkov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0365-3096>
Simakova Ya.V., <https://orcid.org/0000-0002-5033-6931>
Siniavin A.E., <https://orcid.org/0000-0001-7576-2059>
Tkachuk A.P., <https://orcid.org/0000-0003-3262-4873>
Shidlovskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0001-8199-6417>
Tyurin I.N., <https://orcid.org/0000-0002-5696-1586>
Zlobin V.I., <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>
Gintsburg A.L., <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Contribution: Kuznetsova N.A. – the concept and design of the study, conducting of the experiments, collecting, analyzing and interpreting data, writing an article; Ogarkova D.A. – analysis and interpretation of data, preparation of pictures, writing an article; Gushchin V.A. – study management, study concept and design, data analysis and interpretation, article writing; Antipyat N.A. – collection of research materials and clinical data; Bacalin V.V. – collection of research materials and clinical data; Burgasova O.A. – study concept and design, collection of study materials and clinical data, data analysis and interpretation; Vasilchenko L.A. – conducting of the experiments; Divisenko E.V. – conducting of the experiments; Kolobukhina L.V. – study concept and design, collection of study materials and clinical data, data analysis and interpretation; Kruzhkova I.S. – collection of research materials and clinical data; Nikiforova M.A. – conducting of the experiments; Odnoralov M.A. – collection of research materials and clinical data; Samkov A.A. – collection of research materials and clinical data, analysis and interpretation of data; Simakova Ya.V. – data analysis and interpretation; Siniavin A.E. – conducting of the experiments, analyzing and interpreting data, correcting the text of the publication; Tkachuk A.P. – provision of research; Shidlovskaya E.V. – conducting of the experiments; Tyurin I.N. – collection of research materials and clinical data, analysis and interpretation of data; Zlobin V.I. – analysis and interpretation of data, correction of the text of the publication; Gintsburg A.L. – approval of the research concept and final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget (grant No. AAAA-A20-120113090054-6, grant No. 122100500017-9).

Acknowledgement. The authors are grateful to the employees of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya A. Zakharova and T. Remizov for reagents supplying of research.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study approved by the Ethics Committee of the Infectious Clinical Hospital No. 1 of the Moscow (protocols No. 11 dated November 16, 2020 and No. 1 dated February 11, 2021).

Received 25 January 2023

Accepted 13 March 2023

Published 30 April 2023

Введение

Инфицирование вирусом SARS-CoV-2 вызывает заболевание COVID-19 [1], протекающее как в лёгкой, так и в крайне тяжёлой форме, требующей госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии [2]. При этом обычно у большей части инфицированных SARS-CoV-2 течение заболевания лёгкое или даже бессимптомное [3]. Понимание механизмов и путей передачи вируса SARS-CoV-2 является чрезвычайно важным для эффективного противодействия пандемии COVID-19 [4]. Предполагается, что риск передачи от бессимптомных больных довольно высокий, достигающий 62% случаев заражений, что может приводить к существенному объёму недиагностированных случаев инфицирования [5]. Вероятно, высока роль больных COVID-19, находящихся в продромальном периоде (за 2–3 дня до клинических проявлений болезни) и являющихся активными источниками инфекции, о чём пишет и ряд зарубежных авторов [6].

Основным механизмом передачи возбудителя COVID-19 от человека к человеку является аэрозольный, реализуемый посредством воздушно-капельного пути [4]. Передача вируса происходит при тесном контакте больного со здоровым. Возбудитель распространяется с мелкими каплями изо рта или носа инфицированного человека при кашле, чихании, разговоре или затруднённом дыхании [7]. Заражение происходит при вдыхании вирусосодержащих частиц или их попадании на слизистые глаз, носа или рта. Возможны и другие механизмы и пути передачи, включая аэрозольный (фомитный), фекально-оральный, гемоконтактный, вертикальный (от матери к ребёнку) и трансмиссивный (от животного к человеку) [8]. Важными факторами, определяющими передачу вируса от одного человека другому, являются количество выделяемого в окружающую среду вируса и продолжительность его выделения. Именно эти факторы оказывают непосредственное влияние на эффективность мер по ограничению распространения заболевания.

На сегодняшний день признанным стандартом диагностики COVID-19 является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР), позволяющая обнаруживать РНК вируса в различных биологических образцах [9, 10]. Самая высокая вирусная нагрузка, измеренная методом ОТ-ПЦР, наблюдается с момента появления первых симптомов и до 7-го дня болезни, что объясняет более эффективное распространение SARS-CoV-2 по сравнению с другими респираторными инфекциями [11]. По данным различных метаанализов, средняя продолжительность выявления РНК SARS-CoV-2 составляет от 9,3 до 20,0 дня в дыхательных путях и от 14,4 до 20,1 дня в стуле. В случаях длительной протекающей инфекции продолжительность выявления РНК может составлять более 100 дней [11, 12].

Длительность выделения инфекционного вируса является важным фактором передачи возбудителя при инфекции SARS-CoV-2, определяющим стратегию профилактических мероприятий, в том числе изоляции пациентов, с учётом сроков его заразности для

окружающих. На сегодняшний день опубликовано около 30 работ, в которых авторы определяли продолжительность выделения пациентами инфекционного вируса. В одном из последних исследований анализ связи уровня порогового цикла (Ct) с инфекционностью вируса позволил установить диапазон значений Ct от 26,25 до 34,00 (95% доверительный интервал (ДИ)) с медианой 30,5 и средним значением 30,82 для образцов с вирусом [11, 13]. При этом недостаточно изучена связь носительства вируса с тяжестью течения COVID-19, определяемой по критериям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [14]. Не исследован вопрос информативности ПЦР-тестов, нацеленных на различные участки генома вируса SARS-CoV-2 (с учётом различий в копийности геномных фрагментов РНК) в контексте выявления носителей инфекционного вируса.

В связи с этим **целью** настоящего исследования явилось изучение динамики выявления инфекционного SARS-CoV-2 у пациентов с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19 с характеристикой информативности вариантов ПЦР-систем, в том числе для оценки риска внутрибольничной передачи возбудителя.

Материалы и методы

Дизайн исследования и отбор пациентов. Набор пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19 и сбор биологического материала в динамике заболевания проводили на базе Инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы с 17.11.2020 по 03.02.2021. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (протоколы заседаний № 11а от 16.11.2020 и № 1 от 11.02.2021). Добровольцы подписывали информированное согласие на забор биологического материала, кроме того, проводился сбор анкетных данных.

В исследование были включены 1072 пациента с диагнозом COVID-19, госпитализированных в стационар в разные сроки от появления первых симптомов заболевания. Критерием включения пациента в исследование являлось наличие положительного результата ПЦР при поступлении в стационар. Результаты ПЦР, на основании которых пациенты были включены в исследование, были получены с использованием различных систем и разными организациями в зависимости от того, куда направлялся мазок пациента перед госпитализацией или непосредственно после неё. Пациентам проводили первичный клинический осмотр, наблюдение в динамике заболевания, давали оценку клиническим, лабораторным показателям, результатам инструментального обследования и в последующем определяли в группы наблюдения согласно критериям тяжести ВОЗ [14]. У пациентов проводили сбор биоматериала для дальнейшего анализа методом количественной ОТ-ПЦР и вирусологическое исследование назофарингеального мазка с использованием пермиссивных для репликации SARS-CoV-2 клеток. В течение всего госпитального

периода биоматериал пациентов получали со следующей периодичностью: мазок из носоглотки исследовали каждые 3 ± 2 дня, венозную кровь отбирали один раз в 5–7 дней в динамике заболевания. Диагностический алгоритм обязательно включал анализ эпидемиологических, клинико-лабораторных и инструментальных данных. В окончательный анализ были включены 584 пациента, у которых количественная ПЦР показала положительный результат для первой точки забора материала и были проведены основные исследования: дана оценка тяжести течения болезни, определена вирусная нагрузка в первый день госпитализации.

Оценка вирусной нагрузки SARS-CoV-2. Исследование образцов носоглоточных мазков проводили с использованием набора реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» производства ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи») согласно инструкции производителя. Относительное количество РНК SARS-CoV-2 определяли с помощью калибровочной прямой. Для её построения при каждой постановке анализа тестировали калибровочные стандарты, которые представляли собой рекомбинантные конструкции, содержащие амплифицируемый фрагмент генома SARS-CoV-2 с известной концентрацией. В связи с тем что сравнение количества фрагментов было относительным, РНК-фрагменты не использовались. Стадия обратной транскрипции контролировалась прохождением ПЦР по внутреннему РНК-контролю, предусмотренному системой.

Определение инфекционного SARS-CoV-2 in vitro. Определение инфекционного вируса SARS-CoV-2 проводили с использованием клеточной линии 293T/ACE2 (со стабильной экспрессией ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) рецептора человека) [15]. Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку (HyClone, США), $1 \times$ L-глутамин и $1 \times$ раствор антибиотиков пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Эксперименты выполняли в 96-луночном планшете. Для этого образцы назофарингеальных мазков (в объёме 100 мкл) от больных COVID-19 вносили в планшеты и делали последовательные десятикратные разведения. Планшеты инкубировали в течение 5 дней. Затем производили оценку вирус-индуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ). Также для образцов, где наблюдался ЦПЭ, проводили дополнительное подтверждение методом ОТ-ПЦР.

Тестирование ПЦР-систем, различающихся по детектируемым участкам генома SARS-CoV-2, для оценки возможности выявления установленных по ЦПЭ носителей инфекционного вируса. С целью оценки эффективности различных локусов генома вируса SARS-CoV-2 для выявления в ПЦР выявленных по ЦПЭ носителей инфекционного вируса

провели сравнение локусов ORF1b-nsp14, N-gene, Envelope protein, RdRP и NSP1 (в составе набора реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи») генома вируса. Использованные олигонуклеотиды и ссылки на источники литературы представлены в **табл. III**. Для проведения ОТ-ПЦР использовали реакционную смесь, содержащую (на одну реакцию) 5 пмоль каждого праймера, 3 пмоль зонда («Люмипроб», Россия), $2 \times$ буфер для ОТ-ПЦР-РВ и БиоМастер-микс (БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ ($2 \times$), «Биолабмикс», Россия). Общий объём одной реакционной смеси составлял 25 мкл. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Условия одностадийной RT-qPCR описаны ранее для праймеров, рекомендованных ВОЗ [16] и ЦКЗ (Центр по контролю и профилактике заболеваний США, CDC) [17].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8, а также посредством среды статистического анализа R (версия 4.0.3) и программного обеспечения RStudio (версия 1.3.1093), IBM SPSS Statistics 26.0. При анализе количественных показателей использовали тест Шапиро–Уилка для сравнения распределений с нормальным. Для большинства групп распределения значимо ($p > 0,05$) отличались от нормального, поэтому для описания центральных тенденций использовались медиана и межквартильный размах. Для определения статистической значимости различий между исследуемыми группами производили расчёт, используя критерий знаковых рангов Уилкоксона (W) для зависимых выборок и критерий Краскелла–Уоллиса или Манна–Уитни для независимых выборок (пояснения в тексте). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для описания связи количественных признаков использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. При сравнении качественных показателей использовали критерий χ^2 или точный критерий Фишера (пояснения в тексте).

Результаты

Характеристика исследуемой когорты. Исследование проводили на материалах, полученных от пациентов, госпитализированных с COVID-19. Анализировали данные пациентов, у которых был положительный ПЦР-тест на наличие РНК SARS-CoV-2. Характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в **табл. I**. Минимальный срок от начала появления первых клинических симптомов болезни до госпитализации составил 1 день, т.е. госпитализация произошла в день появления симптомов (со слов пациента). Всего известна продолжительность госпитализации для 378 пациентов (64,7%).

Возрастное распределение пациентов имело выработанную полимодальность, включающую два характерных пика в районе 60–65 и 80–85 лет. Подавляющее большинство пациентов было в возрасте

Таблица 1. Характеристика исследуемой когорты пациентов

Table 1. Characteristics of the patient cohort

Исследуемый показатель Characteristics	Min	Max	Me	IQR
День госпитализации от первых симптомов Day of hospitalization from first symptoms	1	76	7	5–8
Срок госпитализации, дней ($n = 378$ (64,7%)) Length of stay, days ($n = 378$ (64,7%))	1	52	9	7–13
Возраст, лет Age, years	18	97	67	58,0–78,5
Мужчины / женщины, n (%) Male / female, n (%)		243 (41,6) / 341 (58,4)		
Тяжесть, n (%) лёгкая / среднетяжёлая / тяжёлая Disease severity, n (%) mild / moderate / severe		3 (0,5) / 347 (59,4) / 234 (40,1)		
Летальный исход ($n = 415$), n (%) Fatal outcome ($n = 415$), n (%)		28 (6,7)		

Примечание. Min – минимальное значение; max – максимальное значение; Me – медиана; IQR – межквартильный размах.

Note. Min – minimum value; max – maximum value; Me – median; IQR – interquartile range.

от 51 до 90 лет (879 (84,1%) пациентов). Доля лиц в возрасте до 30 лет и после 91 года была минимальной и составила по 1,2% ($n = 7$ для обоих возрастных когорт). Доля пациентов 31–40 лет составила 4,8% ($n = 28$), 41–50 лет – 8,7% ($n = 51$), 51–60 лет – 15,8% ($n = 92$), 61–70 лет – 26,7% ($n = 156$), 71–80 лет – 23,3% ($n = 136$), 81–90 лет – 18,3% ($n = 107$), 91 год и старше – 1,2% ($n = 7$).

Характеристика пациентов в зависимости от тяжести течения COVID-19. Оценку тяжести течения заболевания COVID-19 проводили в соответствии с критериями ВОЗ [14] (табл. П2), учитывалась тяжесть при поступлении в больницу. В связи с тем что госпитализированных пациентов с лёгким течением заболевания было всего трое, мы не проводили сравнение с этой группой. Пациенты с положительным результатом ПЦР-анализа, поступившие в тяжёлом состоянии, были статистически значимо старше пациентов, поступивших в среднетяжёлом состоянии ($p < 0,001$).

В группах по тяжести течения заболевания выборки пациентов не отличались по полу ($p = 1,000$). При сравнении времени, прошедшего от начала симптомов заболевания до госпитализации, и продолжительности госпитализации пациентов статистически значимых различий не наблюдали ($p = 0,775$ и $p = 0,142$). Доля летальных исходов составила 3,8% в группе среднетяжёлого течения и 11,0% – в группе тяжёлого течения ($p = 0,021$).

Первый мазок был взят в среднем на 8-е сутки от начала заболевания в каждой из групп тяжести (табл. П2). Медианные значения St в группе тяжелобольных составили 31,75 и в группе среднетяжелых больных – 31,50. Погрешности измерения вирусной нагрузки в ГЭ/мл не позволили выявить статистически значимых различий. Инфекционная активность вируса к моменту первого взятия анализа статистически

значимо не различалась в группах со среднетяжёлым и тяжёлым течением ($p = 0,948$). В группах среднетяжёлых и тяжёлых ПЦР-положительных пациентов вирус был изолирован у 16,4 и 17,1% соответственно.

Медиана второй точки забора материала для лабораторных анализов составила 11 дней от начала симптомов (табл. П2). К 11-му дню было известно 550 из 584 исходно ПЦР-положительных (94,2% от общего числа пациентов), 307 (55,8%) из которых оказались ПЦР-положительными ($p = 0,537$). Статистически значимых различий в уровне вирусной нагрузки у среднетяжёлых и тяжёлых пациентов не выявлено (медианное значение St составило 32,02 (29,01–34,28) и 32,42 (29,96–34,48), $p = 0,316$ (критерий Манна–Уитни). Во втором заборе из 307 постановок изоляции вируса 27 (8,8%) оказались положительными. Статистически значимых различия между группами не выявлены ($p = 0,228$).

Медиана третьей точки исследований составила 13–14 дней от начала симптомов ($p = 0,057$) (табл. П2). По исследуемым показателям (вирусная нагрузка и инфекционность вируса) все группы оказались гомогенными ($p > 0,05$). Результаты ПЦР на третьей точке доступны для 226 человек, при этом 130 (57,5%) из них – ПЦР-положительные. Статистически значимых различий между группами не обнаружено ($p = 0,441$).

Характеристика взаимосвязи между показателями вирусной нагрузки и выявленным по ЦПЭ инфекционным вирусом. Нами была исследована взаимосвязь между выявлением инфекционного вируса и вирусной нагрузкой. В табл. П3 и П4 приведены сравнительные характеристики пациентов в зависимости от успешности выделения вируса. Статистически достоверной разницы между пациентами, выделяющими инфекционный вирус и имеющими только положительный ПЦР-тест, по полу, возрасту и тяжести протекания заболевания обнаружено не было.

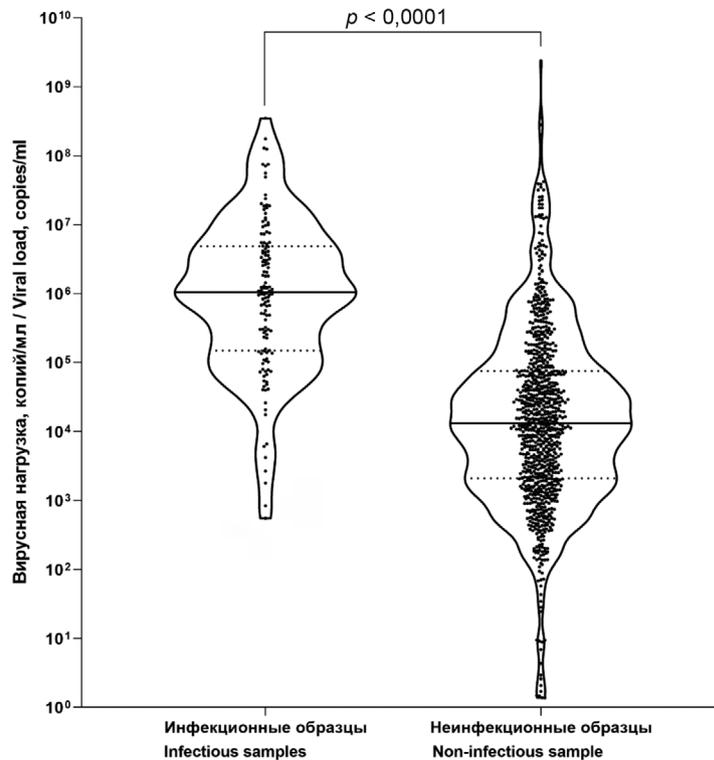


Рис. 1. Вирусная нагрузка в образцах с инфекционным и неинфекционным вирусом. $p < 0,0001$ при расчёте с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона (W); $p < 0,001^*$ при расчёте с использованием критерия Манна–Уитни.

Fig. 1. Viral load in samples with infectious and non-infectious virus. $p < 0.0001$ when calculated using the Wilcoxon signed rank test (W); $p < 0.001^*$ when calculated using the Mann–Whitney test.

Медианное количество дней от начала симптомов до взятия анализа в группе с инфекционным вирусом статистически отличается от такового в группе, в которой вирус не изолировался, и составило 7 и 8 дней соответственно ($p < 0,001^*$). Различия вирусной нагрузки также оказались статистически значимы ($p < 0,001^*$) для показателя Ct и вирусной нагрузки, измеренной в ГЭ/мл. Медиана Ct в группе пациентов, у которых не выделился вирус, составила 32,25, или $1,71 \times 10^4$ ГЭ/мл, а в группе с инфекционным вирусом – 26,14, или $1,09 \times 10^6$ ГЭ/мл (**рис. 1**).

Выявление инфекционного вируса у пациентов в динамике. Для анализа выявления вируса в динамике был взят результат с наибольшей вирусной нагрузкой (из трёх), при котором был получен одновременно положительный результат ПЦР и проведено исследование проб на наличие ЦПЭ. На первой неделе от начала симптомов (0–7 дней) был выявлен инфекционный вирус в образцах, полученных от 29 (22,8%) пациентов, на второй неделе (8–14 дней) – от 37 (10,0%), на третьей и далее (более 14 дней) – только от 4 (4,6%). Были обнаружены статистически значимые отличия при сравнении доли образцов с инфекционным вирусом на 0–7-е сутки от начала симптомов с таковой на 8–14-е сутки и с долей образцов на 14-е сутки и позднее от начала симптомов. При этом статистически значимых различий доли образцов, содержащих инфекционный вирус на второй неделе, по сравнению

с более далеким сроком не было выявлено ($p = 0,113$). Результаты представлены в **табл. 2** и на **рис. 2**.

Различия в долях образцов, содержащих инфекционный вирус, статистически значимы. Апостериорные сравнения проводили с внесением поправки на множественность Бенджамини–Хохберга. $p_{1vs2} < 0,001$ – достоверность различий между первой и второй неделями после появления симптомов, $p_{1vs3} < 0,001$ – достоверность различий между первой неделей и позже 14 дней после появления симптомов, $p_{2vs3} = 0,113$ – достоверность различий между второй неделей и позже 14 дней после появления симптомов; Me – медиана, IQR – межквартильный размах.

Учитывая, что не для всех пациентов известно, в какое время после появления симптомов произошла элиминация вируса, был проведён анализ результатов заражения клеток 293T/ACE2 материалами от больных в динамике. Доля образцов, содержащих инфекционный вирус, с учётом цензурированных данных (наблюдение вплоть до фиксации отсутствия инфекционного вируса) представлена в **табл. 3**.

Проведённый с помощью метода Каплана–Майера анализ показал, что медиана срока сохранения инфекционного вируса в мазках составила 8 дней (95% ДИ 7,77–8,24). Это означает, что у 50% пациентов к 8-му дню можно ожидать элиминацию инфекционного вируса даже при условии наличия положительного результата ПЦР. Кривая элиминации инфекци-

Таблица 2. Доля образцов инфекционного вируса в зависимости от времени после начала симптомов

Table 2. Percentage of samples with infectious virus by time after onset of symptoms

Время от проявления симптомов, сутки Time from onset of symptoms, days	Среднее время от начала симптомов, сутки, Ме (IQR) Mean time from symptom onset, days, Me (IQR)	<i>n</i>	Образцы, содержащие инфекционный вирус, <i>n</i> (%) Samples containing infectious virus, <i>n</i> (%)
0–7	6 (4–7)	127	29 (22,8)
8–14	10 (9–12)	370	37 (10,0)
Более 14 More than 14	16 (15–19)	87	4 (4,6)

Таблица 3. Сохранение инфекционности вируса с учётом цензурирования данных

Table 3. The duration of the infectivity of the virus, censored data

Срок наблюдения от начала симптомов, дней Time from onset of symptoms, days	Сохраняемость инфекционного вируса у ПЦР-положительных пациентов с COVID-19, % Persistence of infectious virus in PCR-positive patients with COVID-19, %
7	71,00
14	11,60
21	2,27

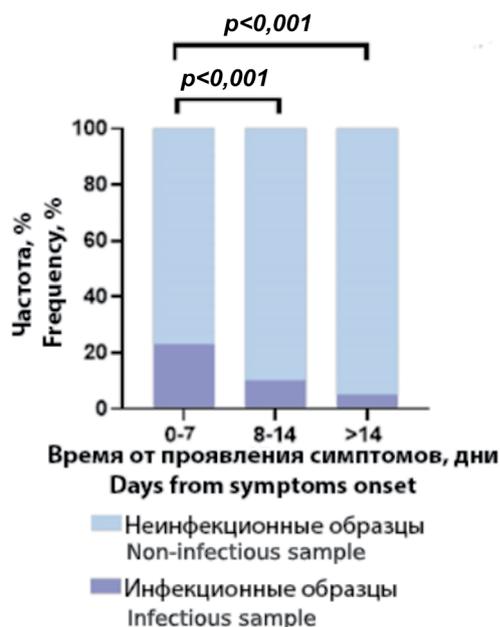


Рис. 2. Доля инфекционного вируса в зависимости от времени после начала развития симптомов.

Fig. 2. The percent of infectious virus depending on the time after the onset of symptoms.

онного вируса показана на рис. 3. Согласно критерию Мантеля–Кокса, не обнаружено статистически значимых различий в скорости снижения выявления инфекционного вируса в зависимости от тяжести течения COVID-19 ($p = 0,529$).

Оценка эффективности протоколов ПЦР для выявления пациентов, в биопробах которых содержится инфекционный вирус. Нами была проведена оценка эффективности различных протоколов выявления РНК вируса SARS-CoV-2 с целью определения

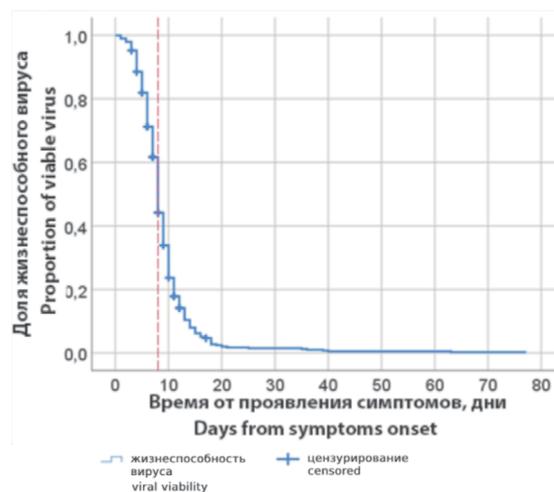


Рис. 3. Анализ сохранения инфекционного вируса в носоглоточном секрете пациентов в зависимости от времени проявления симптомов.

Красной вертикальной линией показано медианное время сохранения вируса (8 дней).

Fig. 3. Analysis of the persistence of an infectious virus in the nasopharyngeal swabs of patients depending on the time of onset of symptoms.

The vertical line shows the median virus persistence time (8 days).

способности тестов к обнаружению носителей инфекционного вируса. Для этого нами были использованы протоколы, ранее предложенные ВОЗ, ЦКЗ, а также разработанный нами тест, согласно инструкции. Комбинации праймеров и зондов приведены в табл. П1. В целом из 571 образца инфекционный вирус был обнаружен в 68, что составляет 11,9% образцов, использованных для сравнительного анализа. По результатам анализа длительности выявления положительных результатов ПЦР сформировалась груп-

Таблица 4. Результаты попарного сравнения длительности выявления РНК вируса с использованием различных протоколов ПЦР ($p < 0,05$ считали статистически достоверным)

Table 4. Results of pairwise comparison of the duration of viral RNA detection using various PCR protocols ($p < 0.05$ was considered statistically significant)

Статистика Уилкоксона (Гехана) Gehan–Wilcoxon test	HKU-ORF1b	HKU-N	E_Sarbeco	N_Sarbeco	RdRp	NSP1
Viral viability	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
HKU-ORF1b	–	0,649	< 0,001*	0,008*	< 0,001*	0,201
HKU-N		–	< 0,001*	0,002*	0,001*	0,479
E_Sarbeco			–	0,103	< 0,001*	< 0,001*
N_Sarbeco				–	< 0,001*	< 0,001*
RdRp					–	0,005*
NSP1						–

Примечание. * $p < 0,001$ при расчёте с использованием критерия Манна–Уитни.

Note. * $p < 0.001$ when calculated using the Mann–Whitney test.

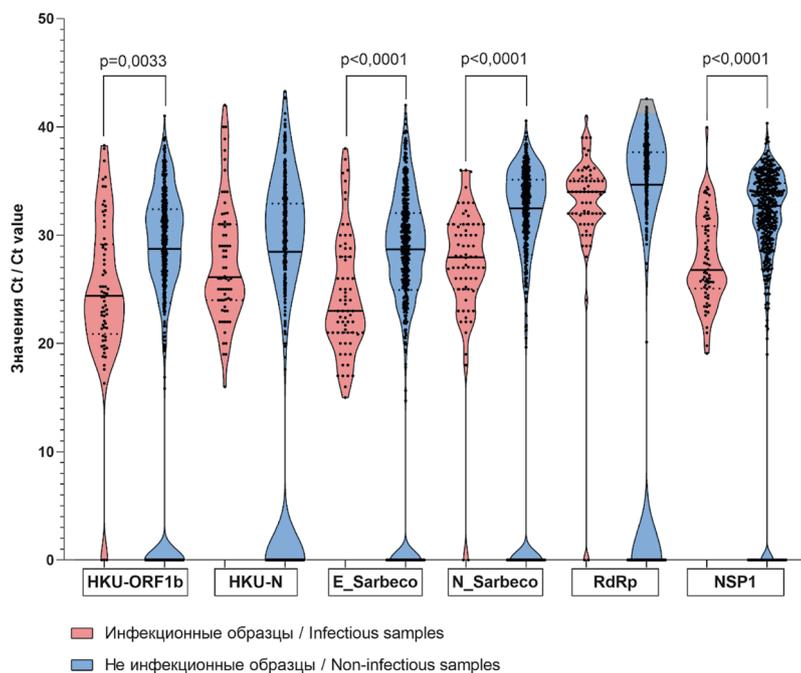


Рис. 4. Сравнение показателя Ct, полученного с использованием разных протоколов идентификации вирусной РНК, для образцов с инфекционным вирусом и отсутствием инфекционного вируса.

Fig. 4. Comparison of the Ct values for different protocols of the viral RNA identification in samples with an infectious and non-infectious virus.

па тестов, статистически неразличимых между собой: HKU-ORF1b, HKU-N и NSP1 ($p < 0,05$ при попарных сравнениях) (табл. 4). Медианное время положительного результата для этих тестов составило 11 дней. Система RdRp показывала отрицательный результат в более ранний срок, медиана составила 9 дней. Системы E_Sarbeco и N_Sarbeco демонстрировали положительные результаты, наиболее длительное время – медианное время – составило 13 и 12 дней соответственно. Основные статистические характеристики тестов, полученные с помощью анализа выживаемости Каплана–Майера, приведены в табл. П5. При этом любой из исследуемых анализов оказывался положительным больше, чем определялась инфекционность вируса ($p < 0,001$ при сравнении длительности положительного результата любой системы с длительностью определения инфекционного вируса).

Сравнение Ct-образцов с инфекционным вирусом и его отсутствием, определенных с использованием упомянутых выше протоколов, показало достоверную разницу для следующих мишеней: HKU-ORF1b ($p = 0,0033$), E_Sarbeco ($p < 0,0001$), N_Sarbeco ($p < 0,0001$), и NSP1 ($p < 0,0001$). Для мишеней HKU-N и RdRp статистически значимой разницы Ct для образцов с инфекционным вирусом и без него выявлено не было. Значение p рассчитано с помощью критерия Манна–Уитни (рис. 4, табл. П6).

ROC-анализ был проведён для показателя Ct для различных тест-систем. Для показателя Ct (nsp1) под кривой AUC составила 0,772 (95% ДИ 0,718–0,826), $p < 0,001$. Точка cut off выбиралась на уровне пересечения специфичности и чувствительности (рис. П1). При признании вируса инфекционным в образцах с Ct выше 29,51 чувствительность составила 73,00%

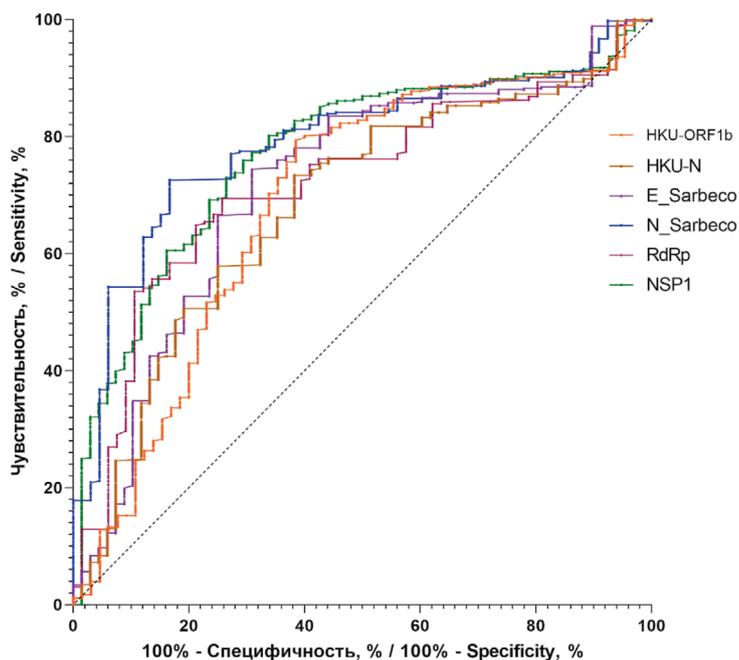


Рис. 5. Кривые ROC-анализа для разных протоколов выявления РНК относительно выявления инфекционного вируса.

Fig. 5. ROC-analysis curves for different RNA detection protocols relative to identification of the infectious virus.

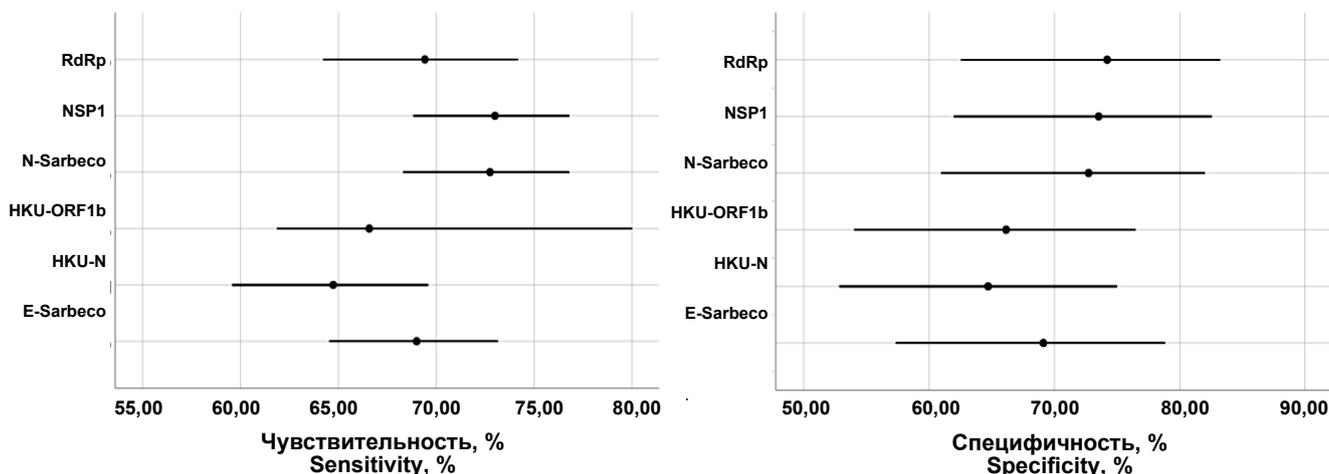


Рис. 6. Сравнение специфичности и чувствительности различных протоколов выявления РНК относительно выявления инфекционного вируса.

Fig. 6. Comparison of the specificity and sensitivity of different RNA detection protocols in relation to the identification of an infectious virus.

(68,83–76,80%), а специфичность – 73,53% (61,99–82,55%). Для сравнения тест-системы с другими были проведены ROC-анализы для каждой из тест-систем, основные характеристики приведены в табл. 4 и на рис. 5. Различия между получившимися кривыми статистически незначимы, так как доверительные интервалы AUC перекрываются во всех случаях: AUC составило 0,682–0,789. Различия между специфичностью и чувствительностью при оптимальном выборе точки cut off (табл. П7) также статистически незначимы (рис. 6), однако системы NSP1 и N-Sarbeco, по-видимому, обладают более высокими показателями точности. Специфичность для всех исследуемых тест-систем составляла 64,71–74,21%, а чувствительность – 64,74–73,00%.

Обсуждение

В условиях стационара риск передачи пациентам и персоналу возбудителей инфекций повышен по причинам скученности, нахождения в закрытых помещениях и т.п. и не исключает присоединения госпитальных инфекций. Известно, что для SARS-CoV-2 внутрибольничное распространение является характерным признаком [18, 19]. В ходе пандемии COVID-19, когда больничные ресурсы используются на пределе возможностей, понимание, как долго больные COVID-19 являются источниками инфекции, является чрезвычайно важным. От этого могут зависеть сроки пребывания пациентов в стационаре, а также масштаб противоэпидемических мероприятий как в лечебном учреждении, так и в амбулаторных условиях.

В нашем исследовании представлены данные о частоте и сроках выявления инфекционного SARS-CoV-2 в когорте пациентов, госпитализированных с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19. Полученные данные показывают, что 97% образцов, полученных от пациентов, не содержат инфекционного вируса после 15-го дня с момента появления симптомов, при этом медиана обнаружения инфекционного вируса составила 8 дней. Эти результаты коррелируют с рекомендациями ЦКЗ по изоляции таких пациентов до 10 дней и до 20 в тяжёлых случаях, требующих интенсивной терапии или искусственной вентиляции лёгких [20].

По результатам нашего исследования у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19 выявление инфекционного вируса в мазках составило 9,8 и 6,8% от всех ПЦР-положительных мазков соответственно. У пациентов с тяжёлым и среднетяжёлым течением заболевания удалось выделить вирус в культуре из образцов, полученных в первую неделю заболевания в 22,8%, во вторую и третью неделю – в 10 и 4,6% случаев заболевания соответственно. У некоторых пациентов с тяжёлым течением инфекционный вирус сохранялся вплоть до 46-го дня. Было показано, что вирусная нагрузка в назофарингеальных мазках, измеренная ОТ-ПЦР, и инфекционность вируса взаимосвязаны. Ранее аналогичный результат, но на существенно меньшей выборке, был получен нами в контексте использования антигенных тестов для выявления носителей инфекционного вируса [21]. Показано, что в мазках с инфекционным вирусом количество РНК вируса SARS-CoV-2 достоверно выше, хотя вирус и выделяется из мазков в широком диапазоне вирусной нагрузки. При стратификации пациентов в зависимости от обнаружения инфекционного вируса без учёта тяжести течения COVID-19 мы отмечали статистически достоверную разницу по уровню вирусной нагрузки в образцах с инфекционным и неинфекционным вирусом Ct 32,25 (29,68–34,74) и 26,14 (23,81–28,86), или $1,71 \times 10^4$ ($2,97 \times 10^3$ – $9,76 \times 10^4$) и $1,09 \times 10^6$ ($2,34 \times 10^5$ – $5,50 \times 10^6$) ГЭ/мл ($p < 0,001^*$, критерий Манна–Уитни). Полученные результаты демонстрируют наибольшую опасность пациентов с эпидемиологической точки зрения в первую неделю после появления симптомов. Эти данные коррелируют с рекомендациями ЦКЗ об использовании масок всеми членами семьи, включая инфицированных, состояние которых не требует госпитализации, в течение двух недель [20].

Мы провели сравнительную оценку эффективности протоколов выявления РНК вируса SARS-CoV-2, предложенных ВОЗ, ЦКЗ, и протокола, описанного нами ранее при обнаружении инфекционного вируса в полученных от пациентов образцах. По результатам анализа того, как долго образцы остаются положительными в ОТ-ПЦР, протоколы HKU-ORF1b, HKU-N и NSP1 статистически не отличались, медианное время положительного результата для этих тестов составило 11 дней. Для RdRp, E_Sarbeco и N_Sarbeco медиана составила 9, 13 и 12 дней соответственно.

Сравнение Ct-образцов с инфекционным вирусом и его отсутствием показало достоверную разницу для следующих мишеней: HKU-ORF1b ($p = 0,0033$), E_Sarbeco ($p < 0,0001$), N_Sarbeco ($p < 0,0001$), и NSP1 ($p < 0,0001$). Для мишеней HKU-N и RdRp статистически значимой разницы выявлено не было. По результатам ROC-анализа различия между получившимися кривыми статистически незначимы. Различия между специфичностью и чувствительностью разных тестов также статистически незначимы, однако системы NSP1 и N-Sarbeco, по-видимому, обладают более высокими показателями точности при выявлении пациентов с инфекционным вирусом на слизистых оболочках носоглотки.

Заключение

Проведённые нами исследования показывают отсутствие достоверной разницы в сроках обнаружения инфекционного вируса SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках, полученных от пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19 в изучаемый период (ноябрь 2020 г. – март 2021 г.). В 97% по прошествии 15 дней с момента появления симптомов госпитализированные пациенты демонстрируют отсутствие инфекционного вируса даже при наличии положительного результата ПЦР-теста. Медиана обнаружения инфекционного вируса составила 8 дней с момента появления симптомов. Нами показана корреляция данных выявления инфекционного вируса и вирусной нагрузки. Для выявления носителей инфекционного вируса подходит любой из исследованных нами протоколов ПЦР-анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
2. Колобухина Л.В., Бурасова О.А., Краева Л.А., Гушин В.А., Бурцева Е.И., Кружкова И.С. и др. Клинико-лабораторный профиль пациентов с COVID-19, госпитализированных в инфекционный стационар г. Москвы в период с мая по июль 2020 года. *Инфекционные болезни*. 2021; 19(2): 5–15. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-2-5-15>
3. Killingley B., Mann A.J., Kalinova M., Boyers A., Goonawardane N., Zhou J., et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* 2022; 28(5): 1031–41. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01780-9>
4. Salahshoori I., Mobaraki-Asl N., Seyfaee A., Mirzaei Nasirabad N., Dehghan Z., Faraji M., et al. Overview of COVID-19 disease: virology, epidemiology, prevention diagnosis, treatment, and vaccines. *Biologics*. 2021; 1(1): 2–40. <https://doi.org/10.3390/biologics1010002>
5. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669–77. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30243-7)
6. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(5): 672–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
7. Meyerowitz E.A., Richterman A., Gandhi R.T., Sax P.E. Transmission of SARS-CoV-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Ann. Intern. Med.* 2021; 174(1): 69–79. <https://doi.org/10.7326/m20-5008>
8. WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Available at: <https://www.who.int/news->

- room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions
9. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(11): 726–34. <https://doi.org/10.7326/m20-1301>
 10. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
 11. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
 12. Zhang Y., Cen M., Hu M., Du L., Hu W., Kim J.J., et al. Prevalence and persistent shedding of fecal SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2021; 12(4): e00343. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000343>
 13. Fontana L.M., Villamagna A.H., Sikka M.K., McGregor J.C. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2021; 42(6): 659–68. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1273>
 14. WHO. Living guidance for clinical management of COVID-19. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
 15. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera. *Viruses.* 2021; 13(6): 1133. <https://doi.org/10.3390/v13061133>
 16. HKU Med. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4
 17. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>
 18. Read J.M., Green C.A., Harrison E.M., Docherty A.B., Funk S., Harrison J., et al. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection in the UK's first COVID-19 pandemic wave. *Lancet.* 2021; 398(10305): 1037–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01786-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01786-4)
 19. Richterman A., Meyerowitz E.A., Cevik M. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection: lessons for public health. *JAMA.* 2020; 324(21): 2155–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.21399>
 20. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Ending Isolation and Precautions for People with COVID-19: Interim Guidance; 2023 Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
 21. Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Divisenko E.V., Nikiforova M.A., Siniavin A.E., Ogarkova D.A., et al. The value of rapid antigen tests for identifying carriers of viable SARS-CoV-2. *Viruses.* 2021; 13(10): 2012. <https://doi.org/10.3390/v13102012>
 2. WHO. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
 3. Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kraeva L.A., Gushchin V.A., Burtseva E.I., Kruzhkova I.S., et al. Clinical and laboratory profile of patients with COVID-19 admitted to hospital in Moscow between May and July 2020. *Infektsionnye bolezni.* 2021; 19(2): 5–15. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-2-5-15> (in Russian)
 4. Killingley B., Mann A.J., Kalinova M., Boyers A., Goonawardane N., Zhou J., et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* 2022; 28(5): 1031–41. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01780-9>
 5. Salahshoori L., Mobaraki-Asl N., Seyfaee A., Mirzaei Nasirabad N., Dehghan Z., Faraji M., et al. Overview of COVID-19 disease: virology, epidemiology, prevention diagnosis, treatment, and vaccines. *Biologics.* 2021; 1(1): 2–40. <https://doi.org/10.3390/biologics1010002>
 6. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669–77. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30243-7)
 7. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(5): 672–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
 8. Meyerowitz E.A., Richterman A., Gandhi R.T., Sax P.E. Transmission of SARS-CoV-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Ann. Intern. Med.* 2021; 174(1): 69–79. <https://doi.org/10.7326/m20-5008>
 9. WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Available at: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>
 10. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(11): 726–34. <https://doi.org/10.7326/m20-1301>
 11. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
 12. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
 13. Zhang Y., Cen M., Hu M., Du L., Hu W., Kim J.J., et al. Prevalence and persistent shedding of fecal SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2021; 12(4): e00343. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000343>
 14. Fontana L.M., Villamagna A.H., Sikka M.K., McGregor J.C. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2021; 42(6): 659–68. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1273>
 15. WHO. Living guidance for clinical management of COVID-19. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
 16. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera. *Viruses.* 2021; 13(6): 1133. <https://doi.org/10.3390/v13061133>
 17. HKU Med. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4
 18. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>
 19. Read J.M., Green C.A., Harrison E.M., Docherty A.B., Funk S., Harrison J., et al. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection in the UK's first COVID-19 pandemic wave. *Lancet.* 2021; 398(10305): 1037–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01786-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01786-4)
 20. Richterman A., Meyerowitz E.A., Cevik M. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection: lessons for public health. *JAMA.* 2020; 324(21): 2155–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.21399>
 21. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Ending Isolation and Precautions for People with COVID-19: Interim Guidance; 2023 Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
 22. Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Divisenko E.V., Nikiforova M.A., Siniavin A.E., Ogarkova D.A., et al. The value of rapid antigen tests for identifying carriers of viable SARS-CoV-2. *Viruses.* 2021; 13(10): 2012. <https://doi.org/10.3390/v13102012>

REFERENCES

1. WHO. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
2. Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kraeva L.A., Gushchin V.A., Burtseva E.I., Kruzhkova I.S., et al. Clinical and laboratory profile of patients with COVID-19 admitted to hospital in Moscow between May and July 2020. *Infektsionnye bolezni.* 2021; 19(2): 5–15. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-2-5-15> (in Russian)
3. Killingley B., Mann A.J., Kalinova M., Boyers A., Goonawardane N., Zhou J., et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* 2022; 28(5): 1031–41. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01780-9>
4. Salahshoori L., Mobaraki-Asl N., Seyfaee A., Mirzaei Nasirabad N., Dehghan Z., Faraji M., et al. Overview of COVID-19 disease: virology, epidemiology, prevention diagnosis, treatment, and vaccines. *Biologics.* 2021; 1(1): 2–40. <https://doi.org/10.3390/biologics1010002>
5. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669–77. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30243-7)
6. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(5): 672–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
7. Meyerowitz E.A., Richterman A., Gandhi R.T., Sax P.E. Transmission of SARS-CoV-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Ann. Intern. Med.* 2021; 174(1): 69–79. <https://doi.org/10.7326/m20-5008>
8. WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Available at: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>
9. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(11): 726–34. <https://doi.org/10.7326/m20-1301>
10. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
11. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
12. Zhang Y., Cen M., Hu M., Du L., Hu W., Kim J.J., et al. Prevalence and persistent shedding of fecal SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2021; 12(4): e00343. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000343>
13. Fontana L.M., Villamagna A.H., Sikka M.K., McGregor J.C. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2021; 42(6): 659–68. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1273>
14. WHO. Living guidance for clinical management of COVID-19. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
15. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera. *Viruses.* 2021; 13(6): 1133. <https://doi.org/10.3390/v13061133>
16. HKU Med. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4
17. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>
18. Read J.M., Green C.A., Harrison E.M., Docherty A.B., Funk S., Harrison J., et al. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection in the UK's first COVID-19 pandemic wave. *Lancet.* 2021; 398(10305): 1037–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01786-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01786-4)
19. Richterman A., Meyerowitz E.A., Cevik M. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection: lessons for public health. *JAMA.* 2020; 324(21): 2155–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.21399>
20. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Ending Isolation and Precautions for People with COVID-19: Interim Guidance; 2023 Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
21. Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Divisenko E.V., Nikiforova M.A., Siniavin A.E., Ogarkova D.A., et al. The value of rapid antigen tests for identifying carriers of viable SARS-CoV-2. *Viruses.* 2021; 13(10): 2012. <https://doi.org/10.3390/v13102012>