

Приложение
Supplement

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

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

Таблица III. Олигонуклеотиды, использованные для оценки эффективности различных локусов генома вируса SARS-CoV-2 для выявления инфекционности вируса

Table S1. Oligonucleotides used to assess the effectiveness of various loci of the SARS-CoV-2 virus genome to detect the virus infectivity

Название, мишень Target	Источник Reference
ORF1b-nsp14 HKU-ORF1b-nsp14F TGGGGYTTTACRGGTAACCT HKU-ORF1b-nsp14R AACRCGCTTAACAAAGCACTC HKU-ORF1b-nsp14IP Cy5-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-BHQ2 N gene (Nucleoprotein) HKU-NF TAATCAGACAAGGAAGTATTA HKU-NR CGAAGGTGTGACTTCCATG HKU-NP Cy5-GCAAATTGTGCAATTTGCCG-BHQ2	WHO [16]
Envelope protein E_Sarbeco_F ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT E_Sarbeco_R ATATTGCAGCAGTACGCACACA E_Sarbeco_P1 Cy5-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ2 N gene (Nucleoprotein) N_Sarbeco_F CACATTGGCACCCGCAATC N_Sarbeco_R GAGGAACGAGAAGAGGCTTG N_Sarbeco_P Cy5-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ2 RdRP gene RdRp_SARSr-F GTGARATGGTCATGTGTGGCGG RdRp_SARSr-R CARATGTTAAASACACTATTAGCATA RdRp_SARSr-P2 Cy5-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ2	CDC [17]
NSP1	Набор 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» Kit for SARS-CoV-2 RNA detection by RT-PCR “SARS-CoV-2 FRT”, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya

Таблица П2. Основные характеристики ПЦР-положительных пациентов в зависимости от тяжести при поступлении
Table S2. Characteristics of PCR-positive patients according to disease severity on admission to hospital

Показатель Index	Тяжесть течения Disease severity			p (критерий) p (test)
	лёгкая (n = 3) mild (n = 3)	среднетяжёлая (n = 347) Moderate (n = 347)	тяжёлая (n = 234) Severe (n = 234)	
Женщины / мужчины, n (%) Female / male, n (%)	2 (66,7) / 1 (33,3)	202 (58,2) / 142 (41,8)	137 (58,5) / 97 (41,5)	1,000 (χ^2)
Возраст, полных лет, Me (IQR) Age, years, Me (IQR)	68 (58–69,5)	66 (55,5–76)	70 (62–80)	< 0,001* (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
День госпитализации после проявления симптомов, Me (IQR) Day of hospitalization after symptom onset, Me (IQR)	7 (6–7)	7 (5–8)	7 (5–9)	0,775 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Дни госпитализации, Me (IQR) Days of hospitalization, Me (IQR)	Известно / Known 3 (100%) 10 (7–10,5)	Известно / Known 222 (64,0%) 9 (7–13)	Известно / Known 153 (65,4%) 10(7–14)	0,142 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Летальных случаев, n (%) Fatal outcome, n (%)	Известно / Known 3 0 (0,0)	Известно / Known 240 9 (3,8)	Известно / Known 172 19 (11,0)	0,021* (точный критерий Фишера) (Fisher’s exact test)
Первая точка (сутки от начала симптомов), Me (IQR) The first timepoint (days from the onset of symptoms), Me (IQR)	8 (7,5–8)	8 (6–9)	8 (6–10)	0,782 (Краскелла–Уоллиса) (Kruskell–Wallis)
Ct, Me (IQR)	31,01 (28,92–32,62)	31,50 (28,50–34,01)	31,75 (27,81–34,45)	0,821 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Вирусная нагрузка, ГЭ/мл, Me (IQR) Viral load, copies/ml, Me (IQR)	$5,67 \times 10^4$ ($2,99 \times 10^4 - 4,29 \times 10^5$)	$3,26 \times 10^4$ ($4,59 \times 10^3 - 2,79 \times 10^5$)	$2,93 \times 10^4$ ($3,53 \times 10^3 - 4,04 \times 10^5$)	0,764 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Инфекционность вируса, n (%) Virus infectivity, n (%)	0 (0,0)	57 (16,4)	40 (17,1)	0,948 (точный критерий Фишера) (Fisher’s exact test)
Вторая точка (сутки от нача- ла симптомов), Me (IQR) Second timepoint (days from onset of symptoms), Me (IQR)	n = 3 11 (10,5–11,50)	n = 331 11 (9–13)	n = 216 11 (9–13)	0,583 (Краскелла–Уоллиса) (Kruskell–Wallis)
ПЦР+, n (%) PCR+, n (%)	1 (33,3)	181 (54,7)	125 (57,9)	0,537 (точный тест Фишера) (Fisher’s exact test)
Ct, Me (IQR)	–	32,02 (29,01–34,28)	32,42 (29,96–34,48)	0,316 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Вирусная нагрузка, ГЭ/мл, Me (IQR) Viral load, copies/ml, Me (IQR)	–	$2,04 \times 10^4$ ($2,76 \times 10^3 - 1,38 \times 10^5$)	$1,40 \times 10^4$ ($1,99 \times 10^3 - 8,58 \times 10^4$)	0,361 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Инфекционность вируса, n (%) Virus infectivity, n (%)	Известно / Known 1 0 (0,0)	Известно / Known 181 19 (10,5)	Известно / Known 125 8 (6,4)	0,228 (точный критерий Фишера) (Fisher’s exact test)
Третья точка (сутки от начала симптомов), Me (IQR) Third timepoint (days from onset of symptoms), Me (IQR)	n = 1	n = 134 13 (11–15)	n = 91 14 (12–16)	0,057 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)

Показатель Index	Тяжесть течения Disease severity			<i>p</i> (критерий) <i>p</i> (test)
	лёгкая (<i>n</i> = 3) mild (<i>n</i> = 3)	среднетяжёлая (<i>n</i> = 347) Moderate (<i>n</i> = 347)	тяжёлая (<i>n</i> = 234) Severe (<i>n</i> = 234)	
ПЦР+, <i>n</i> (%) PCR+, <i>n</i> (%)	0 (0,0)	75 (56,0)	55 (60,4)	0,441 (точный тест Фишера) (Fisher's exact test)
Ct, Me (IQR)	–	32,64 (29,67–34,81)	31,33 (28,71–34,29)	0,254 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Вирусная нагрузка, ГЭ/мл, Me (IQR) Viral load, copies/ml, Me (IQR)	–	$1,42 \times 10^4$ ($1,61 \times 10^3 - 8,44 \times 10^4$)	$2,11 \times 10^4$ ($2,93 \times 10^3 - 2,92 \times 10^5$)	0,178 (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)

Примечание. При сравнении когорт по тяжести не учитывались лёгкие пациенты. ПЦР+/- – положительный/отрицательный тест полимеразной цепной реакции. **p* < 0,001 при расчёте с использованием критерия Манна–Уитни.

Note. Comparison of severity cohorts did not include patients with mild disease. PCR+/- indicates positive/negative polymerase chain reaction test. **p* < 0.001 when calculated using the Mann–Whitney test.

Таблица П3. Связь инфекционности вируса с различными характеристиками ПЦР-положительных пациентов COVID-19 (*n* = 312)

Table S3. Correlation of virus infectivity with different characteristics of PCR-positive COVID-19 patients (*n* = 312)

Показатель Index	Цитопатический эффект Cytopathic effect		<i>p</i> (критерий) <i>p</i> (test)
	отрицательный negative (<i>n</i> = 487 (80,82%))	положительный positive (<i>n</i> = 97 (19,18%))	
Женщины / мужчины, <i>n</i> (%) Female / male, <i>n</i> (%)	281 (57,7) / 206 (42,3)	60 (61,9) / 37 (38,1)	0,499 (χ^2)
Возраст, полных лет, Me (IQR) Age, years, Me (IQR)	67 (57–79)	67,5 (61,5–78)	0,478 (Манна–Уитни) 0,478 (Mann–Whitney)
Тяжесть, <i>n</i> (%) лёгкая/среднетяжёлая/тяжёлая Disease severity, <i>n</i> (%) mild/moderate/severe	3 (0,6) / 290 (59,5) / 194 (39,8)	0 (0,0) / 57 (58,8) / 40 (41,2)	0,948 (точный критерий Фишера) (Fisher's exact test)
Сутки от начала симптомов до анализа, Me (IQR) Days from the onset of symptoms to analysis, Me (IQR)	8 (6–10)	7 (5–9)	< 0,001* (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Ct, Me (IQR)	32,25 (29,68–34,74)	26,14 (23,81–28,86)	< 0,001* (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Вирусная нагрузка, ГЭ/мл, Me (IQR) Viral load, copies/ml, Me (IQR)	$1,71 \times 10^4$ ($2,97 \times 10^3 - 9,76 \times 10^4$)	$1,09 \times 10^6$ ($2,34 \times 10^5 - 5,50 \times 10^6$)	< 0,001* (Манна–Уитни) (Mann–Whitney)
Смертельный исход, <i>n</i> (%) Fatal outcome, <i>n</i> (%)	Известно / Known 348 18 (5,2)	Известно / Known 67 10 (14,9)	0,007* (точный тест Фишера) (Fisher's exact test)

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

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

Таблица П4. Оценка инфекционности вируса в группах наблюдения в зависимости от сроков госпитализации и тяжести
Table S4. Evaluation of the of the virus infectivity in the observation groups depending on the duration of hospitalization and disease severity

Показатель Index	Инфекционность вируса при госпитализации Virus infectivity during hospitalization	Группа среднетяжёлых Moderate	Группа тяжёлых Severe	<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)
<i>n</i>	Нет / no	290	194	–
	Да / yes	57	40	–
Возраст, лет, Ме (IQR) Age, years, Me (IQR)	Нет / no	65,5 (55–76)	70 (61–81)	0,001*
	Да / yes	66 (60–76)	71,5 (64–80)	0,103
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)	–	0,505	0,600	–
Сутки от начала симптомов, Ме (IQR) Days from onset of symptoms, Me (IQR)	Нет / no	8 (6–10)	8 (6–10)	0,843
	Да / yes	7 (5–9)	7,5 (6–9)	0,241
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)	–	0,010*	0,571	–
Женщины / мужчины, <i>n</i> (%) Female / male, <i>n</i> (%)	Нет / no	68 (58,1) / 49 (41,9)	85 (61,2) / 54 (38,8)	0,633 (χ^2)
	Да / yes	13 (59,1) / 9 (40,9)	13 (54,2) / 11 (45,8)	0,791 (χ^2)
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)	–	0,932	0,519	–
Ст, Ме(IQR)	Нет / no	32,05 (29,69–34,64)	32,56 (29,67–34,93)	0,389
	Да / yes	26,55 (23,54–29,28)	25,95 (24,31–28,27)	0,491
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)	–	< 0,001*	< 0,001*	–
Вирусная нагрузка, ГЭ/мл, Ме (IQR) Viral load, copies/ml, Me (IQR)	Нет / no	$1,85 \times 10^4$ ($3,33 \times 10^3 - 7,98 \times 10^4$)	$1,49 \times 10^4$ ($1,96 \times 10^3 - 1,41 \times 10^5$)	0,547
	Да / yes	$1,20 \times 10^6$ ($2,34 \times 10^5 - 5,55 \times 10^6$)	$9,68 \times 10^5$ ($2,11 \times 10^5 - 5,79 \times 10^6$)	0,792
<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)	–	< 0,001*	< 0,001*	–

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

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

Таблица П5. Основные статистические характеристики тестов, полученные с помощью анализа выживаемости Каплана–Майера
Table S5. Main statistical characteristics of tests obtained using Kaplan–Meier survival analysis

Характеристика Characteristics	Позитивность теста, Ме, дней (95% ДИ) Test positivity, Me, days (95% CI)	Q ₁ , день (75% образцов были положительны (или инфекционны) дольше, чем...) Q ₁ , day (75% of samples were positive (or infectious) for longer than...)	Q ₃ , день (25% образцов были положительны (или инфекционны) дольше, чем...) Q ₃ , day (25% of samples were positive (or infectious) for longer than...)	% дожития, 0-й день % survival, 0 th day	% дожития, 7-й день % survival, 7 th day	% дожития, 14-й день % survival, 14 th day
Жизнеспособность Viral viability	8 (7,77–8,24)	6	10	71,00	11,60	2,27
HKU-ORF1b	11 (10,30–11,70)	8	16	85,65	36,71	15,84
HKU-N	11 (10,42–11,58)	8	15	87,09	33,24	9,84
E_Sarbeco	13 (12,25–13,75)	9	19	90,42	49,61	23,68
N_Sarbeco	12 (11,29–12,72)	8	17	90,03	42,28	19,09
RdRp	9 (8,59–9,41)	7	13	82,91	23,33	2,66
NSP1	11 (10,41–11,59)	8	14	86,31	30,02	8,21

Примечание. 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

Note. CI – confidence interval.

Таблица П6. Сравнение Ct, полученной с использованием разных протоколов идентификации вирусной РНК для образцов с инфекционным и неинфекционным вирусом

Table S6. Comparison of Ct obtained using different viral RNA identification protocols for samples with infectious and non-infectious virus

Протокол выявления РНК RNA detection protocol	ПЦР+, <i>n</i> PCR+, <i>n</i>	ПЦР–, <i>n</i> PCR–, <i>n</i>	Ct, Ме (IQR)	Ct, М (SD)	<i>p</i> (критерий Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney test)
HKU-ORF1b инфекционный HKU-ORF1b infectious	65	3	24,40 (20,87–29,15)	24,59 (7,6)	0,0033
HKU-ORF1b неинфекционный HKU-ORF1b non-infectious	407	96	28,74 (23,75–32,39)	24,32 (12,4)	
HKU-N инфекционный HKU-N infectious	68	–	26,13 (24,00–31,00)	27,64 (5,5)	0,7069
HKU-N неинфекционный HKU-N non-infectious	346	157	28,46 (0,00–32,92)	21,46 (14,9)	
E_Sarbeco инфекционный E_Sarbeco infectious	68	–	23,00 (21,00–28,00)	24,45 (5,4)	< 0,0001
E_Sarbeco неинфекционный E_Sarbeco non-infectious	442	61	28,69 (24,94–32,04)	25,96 (10,6)	
N_Sarbeco инфекционный N_Sarbeco infectious	66	2	27,96 (25,00–31,00)	27,11 (6,2)	< 0,0001
N_Sarbeco неинфекционный N_Sarbeco non-infectious	422	81	32,47 (28,19–35,12)	27,52 (12,5)	
RdRp инфекционный RdRp infectious	66	2	34,00 (32,00–35,23)	32,66 (6,4)	0,7138
RdRp неинфекционный RdRp non-infectious	327	176	34,66 (0,00–37,66)	23,73 (17,6)	
NSP1 инфекционный NSP1 infectious	68	–	26,79 (25,08–30,84)	27,68 (4,1)	< 0,0001
NSP1 неинфекционный NSP1 non-infectious	474	29	32,72 (29,59–34,81)	30,49 (8,2)	

Примечание. ПЦР+/- – положительный/отрицательный тест полимеразной цепной реакции.

Note. PCR+/- indicates positive/negative polymerase chain reaction test.

Таблица П7. Основные характеристики ROC-кривых для определения инфекционности вируса на основе результатов ОТ-ПЦР, поставленных на различные фрагменты SARS-CoV-2**Table S7. The main characteristics of ROC-curves for determining the infectivity of the virus based on the results of RT-PCR tests targeting different fragments of SARS-CoV-2 genome**

Показатель Index	HKU-ORF1b	HKU-N	E_Sarbeco	N_Sarbeco	RdRp	NSP1
Площадь под кривой AUC	0,690	0,682	0,718	0,789	0,720	0,772
Стандартная ошибка Std. Error	0,038	0,035	0,034	0,026	0,032	0,028
95% доверительный интервал 95% confidence interval	0,616–0,764	0,615–0,750	0,651–0,784	0,738–0,840	0,658–0,781	0,718–0,826
<i>p</i> -значение <i>p</i> -value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Cut off	27,31	33,61	25,76	30,46	35,05	29,51
Чувствительность, % Sensitivity, %	66,58 (61,87–70,99)	64,74 (59,57–69,59)	69,00 (64,54%–73,14)	72,75 (68,31–76,78)	69,42 (64,22–74,16)	73,00 (68,83–76,80)
Специфичность, % Specificity, %	66,15 (54,04–76,47)	64,71 (52,84–75,00)	69,12 (57,36–78,83)	72,73 (60,96–82,00)	74,21 (62,57–83,25)	73,53 (61,99–82,55)

Примечание. ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Note. RT-PCR – polymerase chain reaction with reverse transcription.

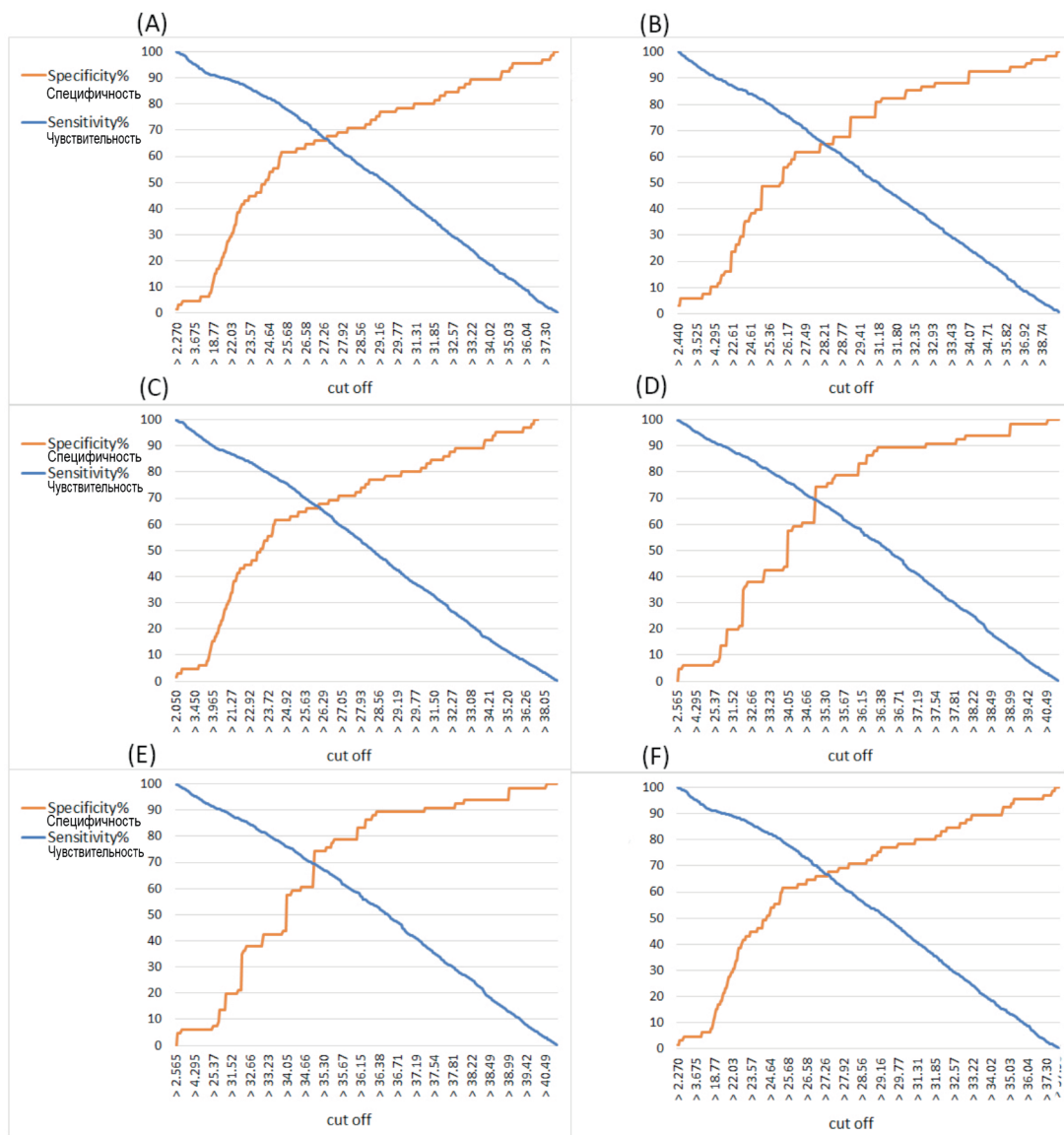


Рис. П1. Чувствительность и специфичность для различных значений cut off: А – HKU-ORF1; В – HKU-N; С – E_Sarbeco; D – N_Sarbeco; Е – RdRp; F – NSP1.

Fig. S1. Sensitivity and specificity for various cut-off values: А – HKU-ORF1; В – HKU-N; С – E_Sarbeco; D – N_Sarbeco; Е – RdRp; F – NSP1.