

ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ «СПУТНИК V», ИЗМЕНЧИВОСТИ RBD-ДОМЕНА S-БЕЛКА SARS-COV-2 И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ

Л. В. Колобухина^{1,3}✉, О. А. Бургасова^{1,2,3}, И. С. Кружкова^{1,3}, В. В. Бакалин², Л. В. Генералова², А. В. Шагаев³, Д. А. Огаркова¹, М. А. Никифорова¹, Д. В. Васина¹, В. А. Гушчин^{1,4}, С. В. Сметанина³

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³ Инфекционная клиническая больница № 1, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Показатель смертности от COVID-19 сохраняется достаточно высоким. Актуально изучение особенностей течения COVID-19 у вакцинированных пациентов, заболевших в разные сроки после прививки, по сравнению с невакцинированными. Целью работы было оценить клинико-иммунологические особенности течения COVID-19, проанализировать данные гуморального иммунитета (вируснейтрализующей активности, ВНА) и изменчивости RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 в группах пациентов, ранее вакцинированных «Спутником V», и у невакцинированных. В исследование включили 251 пациента с верифицированным диагнозом COVID-19, из них 116 были ранее вакцинированы одним или двумя компонентами препарата «Спутник V» и 135 невакцинированных (группа сравнения). Преобладали лица старше 50 лет (82,8%). Пациенты, получившие оба компонента вакцины, перенесли COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме (92,1%). В группе невакцинированных пациентов 11 человек лечили в условиях ОРИТ, 10 из них умерли. Вирусная нагрузка была достоверно ниже у вакцинированных пациентов. Мутации SARS-CoV-2, включая S477N, S477N+A522S, E484K и E484K+S494P, были выявлены у пациентов как вакцинированных, так и невакцинированных. По результатам анализа нейтрализующей активности сывороток не обнаружена достоверная разница уровня ВНА против различных вариантов мутаций SARS-CoV-2. Полученные данные свидетельствуют, что отсутствие вакцинации является отягчающим фактором и увеличивает риск тяжелого течения и смерти пациентов с COVID-19.

Ключевые слова: вакцина, «Спутник V», вакцинация, COVID-19, пациенты

Благодарности: заместителю главного врача по медицинской части ИКБ № 1 Н. А. Антипят и заместителю главного врача по санитарно-эпидемиологическим вопросам ИКБ № 1 М. В. Базаровой — за организацию и поддержку процесса исследования.

Вклад авторов: Л. В. Колобухина — инициатор исследования, дизайн, подготовка рукописи, руководство клинической частью; О. А. Бургасова — анализ источников, подготовка и правка статьи, обработка результатов клинической части; И. С. Кружкова — клинические наблюдения, анализ источников, обработка результатов; В. В. Бакалин — клинические наблюдения, обработка клинических и лабораторных данных; Л. В. Генералова — обработка клинических данных; А. В. Шагаев — мониторинг заболевших лиц после вакцинации; Д. А. Огаркова — статистический анализ; М. А. Никифорова — координация вирусологических исследований, выделение вируса и ВНА; Д. В. Васина — обработка данных ИФА, координация иммунологической части исследования; В. А. Гушчин — концепция исследования, руководство молекулярно-биологическим и вирусологическим направлениями исследований; С. В. Сметанина — общее руководство клинической частью исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы (протокол № 11/А от 16 ноября 2020 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Васильевна Колобухина
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098, Россия; lkolobuchina@yandex.ru

Статья получена: 29.09.2021 **Статья принята к печати:** 13.10.2021 **Опубликована онлайн:** 17.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.046

ASSESSMENT OF COVID-19 CLINICAL COURSE IN PATIENTS VACCINATED WITH SPITNIK V, SARS-COV-2 S PROTEIN RBD DOMAIN VARIATION AND SERUM VIRUS NEUTRALIZING ACTIVITY

Kolobukhina LV^{1,3}✉, Burgasova OA^{1,2,3}, Kruzhkova IS^{1,3}, Bakalin VV², Generalova LV², Shagaev AV³, Ogarkova DA¹, Nikiforova MA¹, Vasina DV¹, Gushchin VA^{1,4}, Smetanina SV³

¹ Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³ Infectious Clinical Hospital № 1, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The COVID-19-associated mortality remains high. Studying the features of the COVID-19 course in vaccinated patients, who have got ill on different dates after vaccination, compared to unvaccinated individuals is relevant. The study was aimed to assess clinical and immunological features of the COVID-19 course, as well as to assess humoral immunity (virus neutralizing activity, VNA) and SARS-CoV-2 S protein RBD domain variation in the groups of patients, previously vaccinated with Sputnik V, and unvaccinated patients. A total of 251 patients with confirmed diagnosis of COVID-19 were enrolled, of them 116 individuals were previously vaccinated with one or two Sputnik V vaccine components, and 135 patients were not vaccinated (comparison group). Individuals over 50 years of age prevailed (82.8%). The patients, who received two vaccine components, had mild to moderate COVID-19 (92.1%). In the group of unvaccinated patients, 11 individuals received treatment in the ICU, 10 of them died. The viral load was significantly lower in vaccinated patients. Mutations of SARS-CoV-2, such as S477N, S477N+A522S, E484K and E484K+S494P, were identified both in vaccinated and unvaccinated patients. Assessment of the neutralizing activity of sera revealed no significant differences in VNA against different variants of SARS-CoV-2 mutations. The data obtained demonstrate that the lack of vaccination is an aggravating factor and is capable of increasing the risk of severe course and death in patients with COVID-19.

Keywords: vaccine, Sputnik V, vaccination, COVID-19, patients

Acknowledgments: we would like to thank Antipyat NA, Deputy Chief Physician for Medical Affairs, and Bazarova MV, PhD, Deputy Chief Physician for Sanitary and Epidemiological Issues, Infectious Clinical Hospital № 1, for the study management and support.

Author contributions: Kolobukhina LV — study proponent, design, manuscript writing, clinical research management; Burgasova OA — literature analysis, manuscript writing and editing, clinical research data processing; Kruzhkova IS — clinical observation, literature analysis, processing of the results; Bakalin VV — clinical observation, clinical and laboratory data processing; Generalova LV — clinical data processing; Shagaev AV — monitoring of infected individuals after vaccination; Ogarkova DA — statistical analysis; Nikiforova MA — coordination of virological studies, virus isolation and VNA; Vasina DV — ELISA data processing, coordination of immunological studies; Gushchin VA — study concept, molecular biological and virological research management; Smetanina SV — clinical research general management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Moscow Infectious Clinical Hospital (protocol № 11/A dated November 16, 2020). The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ludmila V. Kolobukhina
Gamaleya St. 18, Moscow, 123098, Russia; lkolobuchina@yandex.ru

Received: 29.09.2021 **Accepted:** 13.10.2021 **Published online:** 17.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.046

Пандемия COVID-19, объявленная Всемирной организацией здравоохранения в 2020 г., охватила все страны мира. В большинстве случаев (80%) COVID-19 протекает субклинически и не требует госпитализации. Многие факторы, ассоциированные с тяжелым течением заболевания, хорошо изучены, однако сохраняется достаточно высокий показатель смертности от COVID-19, особенно у невакцинированных лиц старших возрастных групп [1].

История медицины свидетельствует о том, что остановить пандемию возможно при успешном проведении вакцинации и создании иммунной прослойки населения не менее 70–80%. Кроме того, вакцинация позволяет снизить риск тяжелого течения и смертности [2].

В настоящее время для всех основных вакцинных препаратов от COVID-19 достигнут убедительный уровень защиты от заболевания (более 90%) и тяжелого течения [3]. В странах, лидирующих в программе всеобщей иммунизации, отмечается тенденция к снижению заболеваемости и смертности [4]. Официальная статистика свидетельствует о снижении уровня заболеваемости и смертности от COVID-19 в странах, лидирующих в охвате населения прививками (50 доз вакцины на 100 человек), таких как Израиль, Объединенные Арабские Эмираты, США и Соединенное Королевство [5].

Результаты эффективности вакцин в рамках пострегистрационных исследований подтверждают данные, полученные в ходе клинических исследований по безопасности и эффективности вакцинных препаратов [6, 7].

В Российской Федерации (РФ) разработана, испытана и внедрена в практику вакцина «Спутник V», формирующая высокие титры нейтрализующих антител и комплексный клеточный иммунный ответ [8]. Принцип действия вакцины основан на использовании двух аденовирусных векторов серотипов Ad26 и Ad5, неспособных к репликации в организме человека, но способных доставлять ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. Как показали результаты третьей фазы клинических испытаний, проводимых в России, защитная эффективность вакцины «Спутник V» составила 91,6% [3]. Однако клиническая практика во многих странах мира подтверждает возможность риска развития заболевания COVID-19 после вакцинации даже двумя компонентами вакцин [9]. Важность этой проблемы и необходимости мониторинга случаев заболевания COVID-19 в популяции вакцинированных лиц подчеркивают наличие мутаций вируса SARS-CoV-2, их возможную клиническую значимость, а также риск появления новых штаммов, потенциально способных уходить от иммунной защиты.

Целью настоящего исследования было изучить особенности клинического течения COVID-19 в группах пациентов, ранее вакцинированных «Спутником V», по сравнению с невакцинированными.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включили 251 пациента с подтвержденной новой коронавирусной инфекцией. Критерий включения: детекция РНК SARS-CoV-2 в ПЦР. Критерий исключения: отсутствие РНК SARS-CoV-2 в биоматериале.

С целью оценки особенностей течения COVID-19 у пациентов, ранее вакцинированных препаратом «Спутник V», на первом этапе работы были сформированы

случайным способом две группы пациентов ($n = 251$) находящихся в ИКБ № 1 г. Москвы в период с декабря 2020 по апрель 2021 г. Из них 116 пациентов были госпитализированы в различные сроки после вакцинации «Спутником V»; группу сравнения составили 135 больных, ранее не вакцинированных. Степень тяжести течения болезни оценивали согласно шкале NEWS [10] в день госпитализации и в день включения пациента в исследование (госпитальные дни).

Группу вакцинированных пациентов разделили на три подгруппы в зависимости от сроков введения компонентов вакцины и даты заболевания. В первую подгруппу включили 46 человек, заболевших после введения первого компонента вакцины с первого по седьмой день, во вторую — 32 пациента, заболевших после введения первого компонента вакцины с восьмого по 14-й день включительно. В третью подгруппу включили 38 пациентов, заболевших в период с первого по 132-й день, после введения обоих компонентов вакцины «Спутник V». Мужчины — 121 человек (48,3%), женщины — 130 (51,7%) (табл. 1). Преобладали лица старше 50 лет (82,8%; $n = 208$), от 30 до 50 лет было 17,1% ($n = 43$) пациентов.

Алгоритм этиологического подтверждения COVID-19 включал исследование назального смыва на наличие РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР, сыворотки крови для определения антител против SARS-CoV-2 методом ИФА и протективных антител методом РН.

Методика определения вирусной нагрузки

Образцы носоглоточных мазков исследовали с помощью набора реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» («НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи»; Россия). Лабораторную дифференциальную диагностику COVID-19 с другими респираторными инфекциями проводили с помощью метода ОТ-ПЦР.

Относительное количество РНК SARS-CoV-2 определяли с помощью калибровочной прямой, для построения которой при каждой постановке анализа тестировали калибровочные стандарты. Последние представляли собой рекомбинантные конструкции, содержащие амплифицируемый фрагмент генома SARS-CoV-2 с известной концентрацией. Так как сравнение количества фрагментов было относительным, то РНК-фрагменты не использовали. Стадию обратной транскрипции контролировали прохождением ПЦР по внутреннему РНК-контролю, предусмотренному системой.

Выявление РНК/ДНК вирусов гриппа и ОРВИ проводили с помощью набора реагентов АмплиСенс «Influenza viruses A/B», АмплиСенс «Influenza virus A/H1-swine-FL», АмплиСенс «Influenza virus A-тип-FL», АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» («ЦНИИЭ Роспотребнадзора»; Россия), согласно рекомендациям производителя, на приборах для ПЦР в режиме реального времени Rotor Gene 6000 (Corbett Research; Австралия) и ДТ-96 («ДНК-Технология»; Россия).

Оценка количества антител IgG к RBD SARS-CoV-2

Для определения IgG-антител к рецепторсвязывающему домену (RBD) белка шипа S1 SARS-CoV-2 использовали рекомбинантный антиген RBD № 8COV1 (HyTest; Россия). В лунки 96-луночных ИФА-планшетов Costar High Binding (Corning; США) вносили по 100 мкл раствора RBD в фосфатно-солевом буфере PBS (Amresco; США) в

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

Параметры	Всего пациентов n = 251				
	Невакцинированные n = 135	Вакцинированные			
		1 подгруппа n = 46	2 подгруппа n = 32	3 подгруппа n = 38	
		Сроки заболевания после вакцинации			
	1–7 дней от V1	8–14 дней от V1	1–132 дней от V1+V2		
Мужчины	61 (45,20%)	29 (63,0%)	10 (31,3%)	21 (55,3%)	0,039* (χ^2 -критерий Пирсона)
Женщины	74 (54,80%)	17 (37,0%)	22 (68,8%)	17 (44,7%)	
Соотношение мужчины : женщины	01 : 01,0	01 : 01,0	01 : 02,0	01 : 01,0	
Средний возраст (лет) M \pm SE (min-max)	64,9 \pm 1,2 (30–89)	64,5 \pm 2,1 (31–84)	68,9 \pm 2,1 (46–89)	67,7 \pm 1,9 (37–90)	0,335 (F-критерий Пирсона)
Возраст, лет 30–50	28 (20,7%)	8 (17,4%)	3 (9,4%)	4 (10,5%)	0,656 (χ^2 -критерий Пирсона)
51–70	54 (40,00%)	20 (43,5%)	16 (50,0%)	19 (50,0%)	
71–90	53 (39,30%)	18 (39,1%)	13 (40,6%)	15 (39,5%)	
Сроки госпитализации, дни M \pm SE (min-max), Me [Q ₁ –Q ₃]	6,22 \pm 0,20 (1–13)	7,5 \pm 0,5 (2–19)	6,5 \pm 0,4 (2–13)	8,3 \pm 0,8 (1–28) 7 [6–10]	0,014* (Критерий Манна– Уитни)
	6 [5–8]	7,5 [4–9]	6,5 [5–8]		
		7,5 \pm 0,4 (1–28) 7 [5–9]			
Оценка степени тяжести состояния пациентов при госпитализации					
Легкая	52 (38,50%)	17 (36,90%)	13 (40,60%)	19 (50,0%)	0,498 (χ^2 -критерий Пирсона)
		49 (42,2%)			
Среднетяжелая	35 (30,00%)	16 (34,8%)	9 (28,10%)	9 (23,70%)	
		34 (29,3%)			
Тяжелая	48 (35,50%)	13 (28,3%)	10 (31,30%)	10 (26,3%)	
		33 (28,4%)			
Из них переведены в ОРИТ	11	2	2	0	
Летальные исходы в ОРИТ	10	2	0	0	
Продолжительность пребывания в больнице (дни) в зависимости от тяжести: M \pm SE (min-max), Me [Q ₁ –Q ₃]	11,12 \pm 0,6 (4–52) 10 [7–13]	10,35 \pm 0,8 (4–36)	9,0 \pm 1,5 (2–53)	8,03 \pm 0,4 (4–14)	< 0,001* (критерий Манна–Уитни)
		8 [7–12]	8 [6,5–9]	8 [7–9]	
		9,22 \pm 0,5 (2–53) 8[7–9,5]			

Примечание: * — различия между группами статистически значимы ($p < 0,05$).

концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшеты сутки при +4 °С. На следующий день раствор антигена удаляли и блокировали планшеты в течение ночи при +4 °С, инкубируя их с блокирующим буфером S002X (Хема; Россия), содержащим 0,5% казеина.

Исследуемые сыворотки разводили в соотношении 1 : 100 в ИФА-буфере S011 (Хема; Россия), вносили по 100 мкл в лунку и инкубировали 1 ч в термощейкере при температуре +37 °С и перемешивании в режиме 600 об./мин. Затем планшеты трижды отмывали раствором PBS с добавлением 0,1% Твин-20 и вносили в лунки по 100 мкл поликлональных антител козы к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (Novex; США) в разведении 1 : 40 000. После инкубации в течение 1 ч при температуре +37 °С и перемешивании в режиме 600 об./мин планшеты отмывали 6 раз, вносили в лунки по

100 мкл однокомпонентного субстратного буфера R055, содержащего ТМБ («Хема»; Россия), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию, внося в лунки по 100 мкл 10% HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм. При учете результатов определяли граничное значение (ГЗ) оптической плотности (сумма среднего значения оптической плотности отрицательных контролей и экспериментально подобранного коэффициента), а затем для каждого образца рассчитывали коэффициент позитивности (КП), равный отношению оптической плотности образца к ГЗ.

Интерпретацию результатов проводили по следующим критериям: результат анализа на определение антител класса G считали положительным, если для исследуемого образца КП \geq 1,1, отрицательным, если КП < 0,9. Результат определения антител класса G считали неопределенным,

Таблица 2. Динамика оценки тяжести течения COVID-19 у вакцинированных и невакцинированных пациентов

Точки оценки тяжести (госпитальные дни)	Пациенты (n = 57)						p
	Вакцинированные n = 22			Невакцинированные n = 35			
	Оценка степени тяжести состояния (NEWS)						
	Легкая	Средняя	Тяжелая	Легкая	Средняя	Тяжелая	
При госпитализации (1 точка)	10 (45,5%)	7 -31,80%	5 -22,70%	13 (37,1%)	10 (28,6%)	12 (34,3%)	0,699 (точный тест Фишера)
Средний госпитальный день 3,5 ± 1,2 (1–7 дней) (2 точка)	15 (68,2%)	5 -22,70%	2 -9,10%	15 (42,8%)	14 (40,0%)	6 -17,20%	0,184 (точный тест Фишера)
Средний госпитальный день 9,2 ± 1,4 (8–12 дней) (3 точка)	22 (100%)	0	0	22 (62,8%)	5 (14,3%)	8 -22,90%	0,002* (точный тест Фишера)
	К 12-му госпитальному дню все пациенты выписаны						

если $0,9 \leq \text{КП} < 1,1$. Для этих значений лабораторную систему валидировали с использованием контрольных сывороток. В качестве положительного контроля использовали ранее охарактеризованные сыворотки реконвалесцентов с подтвержденным диагнозом, в качестве отрицательного — архивные образцы сывороток, собранные в первой половине 2019 г. из коллекции заведомо отрицательных сывороток.

Клетки и вирусы

Клетки VERO E6 (ATCC, CRL-1586) культивировали в полной среде DMEM («ПанЭко»; Россия), дополненной 10% FBS (HyClone; США), 1 × GlutaMAX (Gibco; США) и пенициллин/стрептомицином (100 ME/мл; 100 мкг/мл) («ПанЭко»; Россия). Штаммы SARS-CoV-2 PMVL-4 (GISAID EPI_ISL_470898), PMVL-38 (GISAID EPI_ISL_1710856),

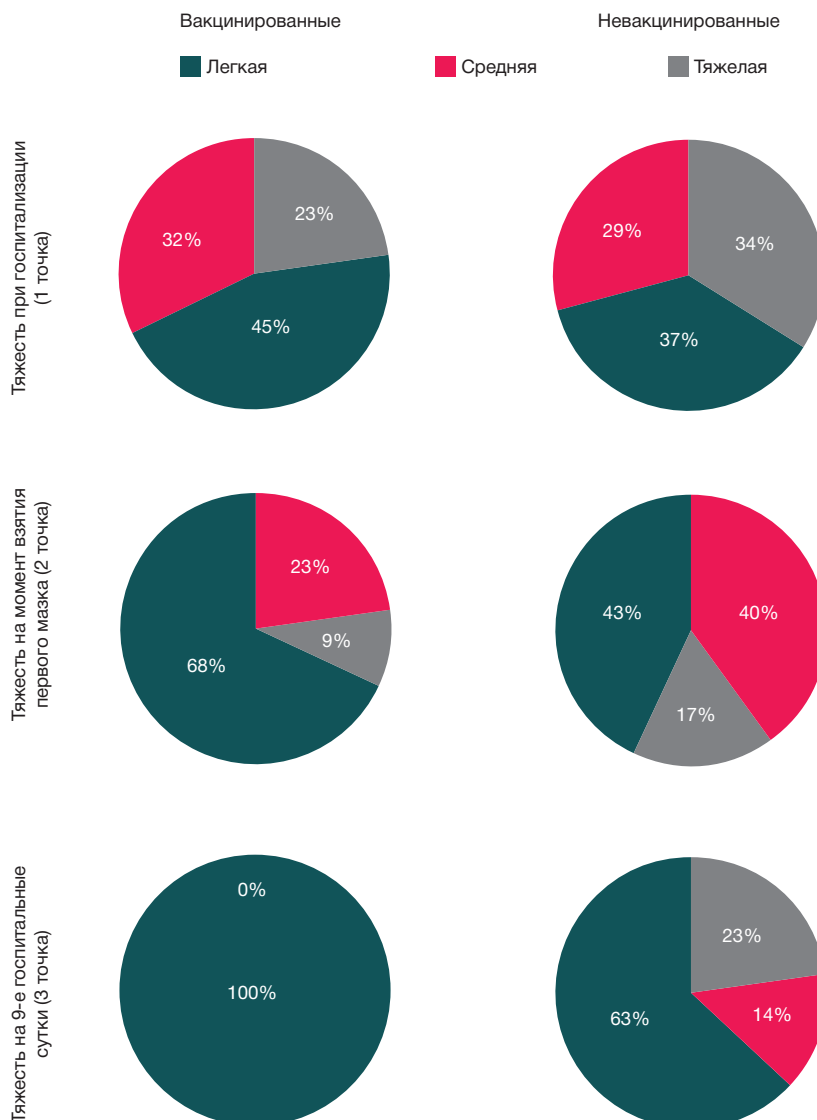


Рис. 1. Распределение пациентов по тяжести состояния в анализируемых точках (госпитальные дни)

Таблица 3. Вирусная нагрузка у вакцинированных и невакцинированных пациентов

Вирусная нагрузка, Ct			
Группы пациентов	N	Me [Q ₁ –Q ₃]	<i>p</i>
Невакцинированные	34	31,45 [27,20–33,72]	0,026* (U-критерий Манна–Уитни)
Полностью вакцинированные	8	34,78 [31,41–36,48]	

Примечание: * — различия показателей статистически значимы из выборки (вакцинированные $n = 22$, невакцинированные $n = 35$) ($p < 0,05$).

PMVL-47 (GISAID EPI_ISL_1710865) были выделены из назофарингеальных смывов. PMVL-38 и PMVL-47 содержат мутации в RBD-домене (S477N и E484K соответственно).

Оценка вирус-нейтрализующих свойств сыворотки пациентов

Клетки VERO E6 высевали в 96-луночные планшеты в количестве $0,2 \times 10^5$ кл./луночку за день до эксперимента. На следующий день 100 TCID₅₀ соответствующего варианта SARS-CoV-2 инкубировали с серийными разведениями сывороток в течение 1 ч при + 37 °C, а затем добавляли в 96-луночные планшеты с клетками Vero E6. Через 72 ч вирус-индуцированный цитопатический эффект (CPE) оценивали с помощью МТТ-теста [11]. Процент ингибирования CPE нормализовали и переводили в процент нейтрализации. NT₅₀ рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software; США).

Исследование изменчивости вируса в области RBD-домена

Тотальную РНК экстрагировали из мазков пациентов и/или изолятов SARS-CoV-2 с использованием набора РИБО-ПРЕП («ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию проводили с помощью метода одноэтапной ОТ-ПЦР, для проведения которой использовали реакционную смесь, содержащую (для одной реакции) 10 пмоль каждого праймера, 0,025 мМ каждого dNTP («Евроген»; Россия), 5 мкл 5X буфера (100 мМ Трис-НСl (рН 8,3 при 25 °C), 150 мМ КCl, 10 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ), 0,25 мкл ревертазы M-MLV обратный (200 ед.), 0,25 мкл собственной полимеразы Taq (10 ед.) и 10 мкл РНК (около 0,5 мкг). Общий объем одной реакционной смеси составлял 25 мкл. Для амплификации фрагмента RBD SARS-CoV-2 нами были выбраны олигонуклеотиды следующей структуры: прямой праймер 5'-AACTTTAGAGTCCAACCAACAGAA-3' и обратный праймер 5'-TGAAGTTGAAATTGACACATTTG-3'. Олигонуклеотиды позволяют получить фрагмент с 334 по 538 аминокислоты спайк-гликопротеина. Амплификацию проводили на приборе T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad; США). Условия одностадийной реакции ОТ-ПЦР были следующими: 50 °C в течение 60 мин, 95 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 95 °C в течение 15 с, 55 °C в течение 10 с и 72 °C в течение 30 с, далее 72 °C в течение 5 мин. После амплификации часть продукта наносили на агарозный

гель и методом электрофореза оценивали присутствие целевого фрагмента. Далее продукты амплификации очищали от праймеров и нуклеотидов с помощью ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific; США) и измеряли концентрацию с помощью Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific; США) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование полученных фрагментов проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific; США). Для анализа структуры полученных последовательностей использовали программу Unipro UGENE v37.0.

Методы статистики

Для статистической обработки и построения графиков использовали программу IBM SPSS Statistics version 26. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка (при $n < 50$) или критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса (при $n > 50$). Уровень значимости определяли как $p = 0,05$. Для сравнения групп при распределении переменных, отличном от нормального, использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующим post hoc анализом с помощью U-критерия Манна–Уитни с поправкой на множественность Бонферрони или с помощью критерия Манна–Уитни (при количестве групп $n = 2$). При анализе таблиц сопряженности использовали χ^2 -критерий или точный тест Фишера. При анализе многопольных таблиц проводили апостериорные попарные сравнения с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга. Для определения влияния факта вакцинации и наличия мутаций на вирусную нагрузку был проведен многофакторный ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ возрастной структуры вакцинированной и невакцинированной групп не выявил статистически значимых различий по возрасту ($p = 0,656$). Средний возраст в группах также не имел статистически значимых различий ($p = 0,335$ (F-критерий Пирсона)).

Достоверной разницы в частоте встречаемости коморбидных состояний у невакцинированных и вакцинированных пациентов с COVID-19 не выявлено: артериальная гипертония — 79,0 и 72,4%, сердечно-сосудистые заболевания — 43,0 и 26,7%, сахарный диабет — 27,0 и 16,4%, ожирение — 47,4 и 39,6% соответственно.

Все включенные в исследование пациенты ($n = 251$) были госпитализированы с 1 по 28 день от появления первых

Таблица 4. Сравнение уровня антител к RBD-белку у пациентов вакцинированных и невакцинированных

Группы пациентов	<i>n</i>	КП RBD	<i>p</i>
		Me [Q ₁ –Q ₃]	
Невакцинированные	17	0,34 [0,22–0,48]	< 0,001* (U-критерий Манна–Уитни)
Полностью вакцинированные	22	7,75 [2,30–10,80]	

Примечание: * — различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$) из выборки (вакцинированные $n = 22$, невакцинированные $n = 35$).

Таблица 5. Частота обнаружения мутаций в RBD-домене в сравниваемых группах

Группы пациентов	Мутации в RBD-домене отсутствуют ($n = 9$)	Наличие мутаций в RBD-домене ($n = 10$)
Невакцинированные ($n = 11$)	8 (72,7%)	3 (27,3%)
Вакцинированные ($n = 8$)	1 (12,5%)	7 (87,5%)

Примечание: * — $p = 0,020$ (точный тест Фишера)

симптомов заболевания. По срокам госпитализации от момента появления первых симптомов у вакцинированных и невакцинированных пациентов имели место статистически значимые различия: пациенты, получившие хотя бы одну дозу вакцины были госпитализированы значительно позже ($p = 0,014$). Медиана суток от начала заболевания до момента госпитализации составила 7,5 дней у вакцинированных и 6 дней — у невакцинированных.

С целью клинической характеристики COVID-19 все пациенты ($n = 251$), согласно оценке тяжести течения болезни на день госпитализации, были разделены следующим образом: в группе вакцинированных ($n = 116$) у 49 (42,2 %) пациентов отмечено легкое течение, у 34 (29,3%) — среднетяжелое и 33 (26,5%) — тяжелое; в группе невакцинированных ($n = 135$) у 52 (38,5%) пациентов — легкое, у 35 (30,0%) — среднетяжелое, у 48 (35,5%) — тяжелое. Следует подчеркнуть, что число пациентов с разной степенью тяжести внутри каждой группы было статистически неразличимо как в группе невакцинированных, так и среди тех, кто получил хотя бы один компонент вакцины ($p = 0,498$).

В процессе лечения у 2 (4,5%) вакцинированных была отмечена тенденция к ухудшению: оба пациента из 1-й подгруппы были переведены в ОРИТ, оба умерли на 17-й и 36-й госпитальные сутки. Важно, что оба пациента заболели в первую неделю (первый и седьмой дни) с момента введения первого компонента вакцины и не могли иметь защитных антител. Два пациента (6,3%) из 2-й подгруппы также нуждались в лечении в условиях ОРИТ, им была проведена неинвазивная респираторная поддержка. Один из них страдал лимфогранулематозом и был переведен в другой стационар на 10-й госпитальный день с обширной гематомой правой ягодицы с затеком в паховую область и забрюшинное пространство малого таза, постгеморрагической анемией. Вторым пациентом страдал гипертонической болезнью в сочетании с ожирением и находился в ОРИТ в течение 32 дней, выписан из больницы на 56-й день. Обоим пациентам не вводили

второй компонент вакцины. Летальных исходов во 2-й и 3-й подгруппах вакцинированных пациентов не было, в то время как в группе невакцинированных пациентов 11 человек нуждались в лечении в условиях ОРИТ, 10 из них умерли.

Медиана времени, проведенного в стационаре, составила 8 дней у вакцинированных пациентов, включая тех, кому введен один компонент вакцины, у невакцинированных — 10 дней ($p < 0,001$).

Дополнительно, с целью оценки динамики клинического течения болезни, была проведена оценка тяжести пациентов в периоды с первого по седьмой и с восьмого по 12-й госпитальные дни, получивших оба компонента вакцины ($n = 22$) и заболевших спустя 14 дней по сравнению с группой невакцинированных ($n = 35$), заболевших в те же сроки (табл. 2; рис. 1).

Таким образом, показано, что в группах вакцинированных и невакцинированных при госпитализации (первая точка) число пациентов с различной тяжестью не имели статистически значимых различий согласно точному критерию Фишера ($p = 0,699$). В течение первой недели пребывания в стационаре (вторая точка, 1–7 госпитальные дни) также не обнаружены статистически значимые различия ($p = 0,184$). Однако оценка в третьей точке (8–12 госпитальные дни) показала, что 100% вакцинированных имели легкую степень тяжести болезни, в то время как доля легких пациентов в группе невакцинированных была статистически достоверно меньше — 63% ($p = 0,002$) (см. рис. 1). Сравнительный анализ точек по тяжести в анализируемых группах (с помощью критерия Фридмана для связанных выборок) показал, что статистически значимое ($p < 0,001$) снижение тяжести отмечено в группе вакцинированных, в то время как в группе невакцинированных эта тенденция имела пограничную значимость ($p = 0,058$).

Тактику дальнейших исследований определяли поиском критериев оценки тяжести течения болезни с учетом мутаций в RBD-домене, уровня вирусной нагрузки и гуморального ответа у пациентов.

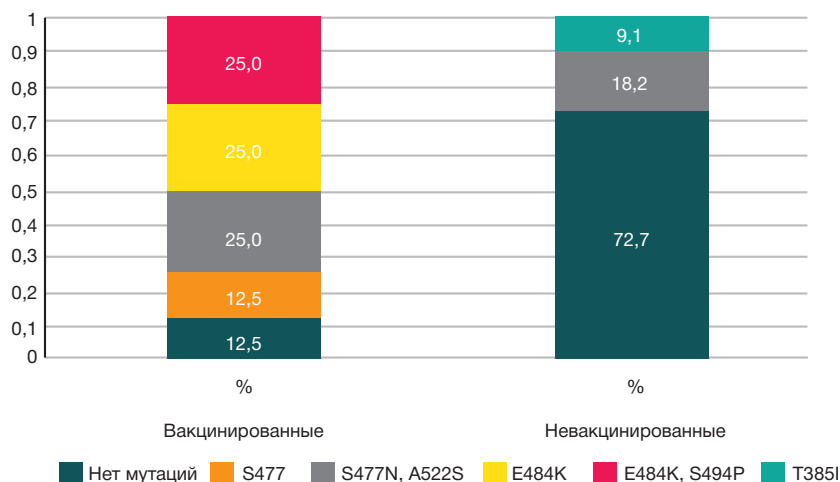


Рис. 2. Соотношение мутаций в RBD-домене вирусов SARS-CoV-2

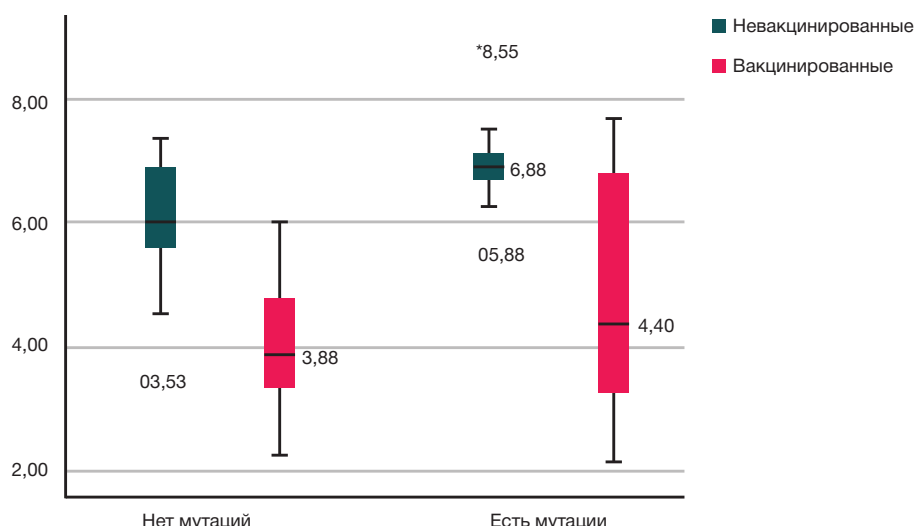


Рис. 3. Сравнительная оценка вирусной нагрузки в биопробах вакцинированных и невакцинированных пациентов, имеющих мутации в RBD-домене

Вирусная нагрузка в группе вакцинированных и невакцинированных была невысокая, но статистически значимая вирусная нагрузка была меньше в группе вакцинированных ($p < 0,05$) (табл. 3).

Оценка гуморального ответа в анализируемых группах показала, что уровень антител IgG был статистически значимо ($p < 0,001$) выше в группе полностью вакцинированных по сравнению с невакцинированными (табл. 4). Необходимы дальнейшие исследования для оценки продолжительности протективного иммунного ответа.

Процесс распространения вируса сопровождается его внедрением в человеческую популяцию, высокой смертностью его хозяев, а также способностью вируса мутировать, выживая в биологической среде.

При выявлении мутаций в RBD-домене SARS-CoV-2 в биопробах пациентов ($n = 19$) показано, что в области RBD-домена вирус мутировал в группе как вакцинированных, так и невакцинированных, но чаще мутации встречались в группе вакцинированных (табл. 5; рис. 2). Наличие мутаций свидетельствует о необходимости мониторинга клинической картины заболевания у вакцинированных и секвенирования вируса с целью быстрой своевременной модернизации средств специфической профилактики.

Анализ вирусной нагрузки в образцах показал, что вакцинация снижает вирусную нагрузку у заболевших. Выявлено, что в случае развития заболевания тенденция к уменьшению вирусной нагрузки в образцах, содержащих вирус с мутациями в RBD-домене, отмечается как у вакцинированных, так и невакцинированных пациентов. С помощью многофакторного ANOVA установлена статистически значимая зависимость вирусной нагрузки

от наличия или отсутствия вакцинации ($p < 0,001$), вклад в дисперсию составил 39,0%. Зависимость от наличия мутаций так же оказалась значимой ($p = 0,038$), вклад в дисперсию составил 8,0%. Взаимосвязь вакцинации и наличия мутаций оказалась незначимой ($p = 0,650$) (рис. 3).

Для изучения возможного механизма ухода новых вариантов вируса от защиты антител у вакцинированных нами была проведена дифференциальная оценка вируснейтрализующей активности (ВНА) сывороток пациентов, вакцинированных двумя дозами, но заболевших COVID-19. Так как в большинстве образцов были обнаружены мутации в RBD-домене ($n = 6$), включая S477N, S477N+A522S, E484K и E484K+S494P, нами была проведена оценка ВНА для всех данных образцов в отношении исходного варианта вируса с заменой D614G и двух вариантов с мутацией S477N и E484K, имеющих в нашей коллекции вирусных изолятов.

В табл. 6 представлены уровни ВНА к различным вариантам мутаций вируса SARS-CoV-2 в пробах от пациентов ($n = 6$). Процент уровней титра нейтрализации (NT50) рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.

В дальнейшем была проведена сравнительная оценка уровня ВНА против различных вариантов мутаций SARS-CoV-2. На рис. 4 (верхний ряд) показаны значения p при 95% доверительном интервале (тест Уилкоксона).

Статистически достоверной разницы ВНА сывороток с различными вариантами SARS-CoV-2 обнаружено не было ни при оценке всех сывороток, ни для отдельных сывороток, полученных от пациентов с характерной мутацией.

Таблица 6. Уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) к вариантам мутаций SARS-CoV-2

№	Наименование образца	NT ₅₀		
		PMVL-4_D614G	PMVL-38_S477N	PMVL-47_E484K
1	3222_S477N	373,8	452,6	451,9
2	4003_S477N, A522S	186,7	293,5	153,2
3	4310_E484K,S494P	452,3	452,6	451,6
4	573_E484K,S494P	256,2	202,5	452,6
5	4267_E484K	226,5	> 640	> 640
6	4160_E484K	65,52	29,26	320

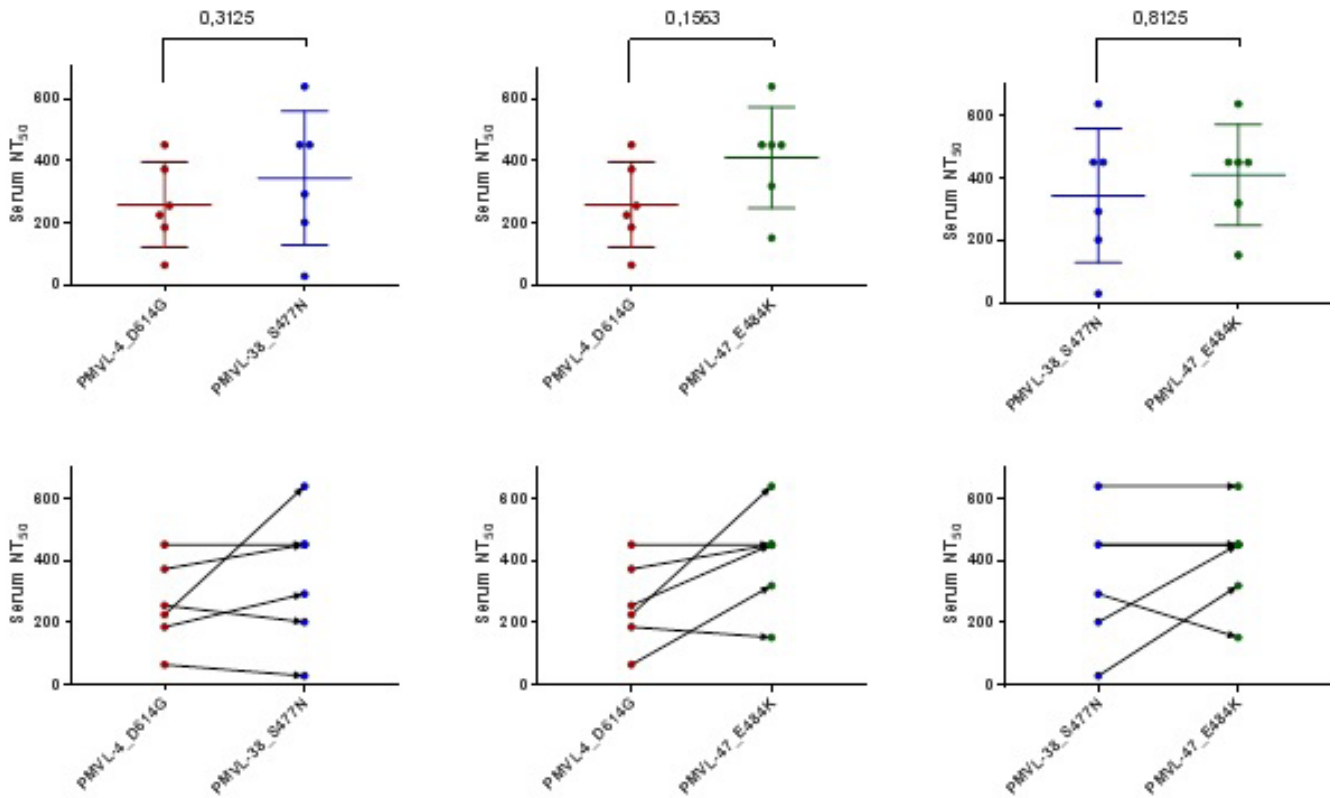


Рис. 4. Сравнительная оценка титров нейтрализующих антител против различных вариантов SARS-CoV-2. * — в верхнем ряду показаны значения p при 95%-м доверительном интервале (тест Уилкоксона)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что вакцина «Спутник V», так же как и любой иммунобиологический препарат, разработанная и успешно применяемая в практике здравоохранения в качестве профилактического средства, не обладает 100%-й эффективностью, особенно в период продолжающейся пандемии. Однако применение вакцинных препаратов в столь нестандартной ситуации позволит сократить число как тяжелых пациентов, так и летальных исходов.

В настоящий момент «Спутник V» успешно применяют более чем в 67 странах мира [12]. На 11.09.2021 в Российской Федерации полностью вакцинировано 39 589 464 человек (27,11%) [13].

В этой связи исследование факторов, приводящих к заболеванию COVID-19 у вакцинированных, а также мониторинг клинического течения заболевания позволят дать практическому здравоохранению и обществу в целом дополнительную информацию по вакцинации.

В настоящем исследовании предпринята попытка анализа клинических и лабораторных показателей у пациентов, вакцинированных «Спутник V» с различным сроком, прошедшим с момента получения первой и второй доз вакцины, по сравнению с группой невакцинированных.

Динамика оценки тяжести течения COVID-19 у полностью вакцинированных и заболевших спустя 14 дней после введения второго компонента и невакцинированных пациентов, заболевших в те же сроки показала, что на 8–12 госпитальные дни 100% вакцинированных пациентов имели легкую степень тяжести болезни. В группе полностью вакцинированных и имеющих протективный иммунитет против SARS-COV-2 не было пациентов переведенных в ОПИТ и летальных исходов.

Кроме оценки клинической тяжести проводили анализ ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ, секвенирование вирусной РНК в области RBD-домена, дифференциальный контроль титров нейтрализующих антител, а также уровень антительного ответа IgG к RBD-домену S-белка.

Показатели вирусной нагрузки в группах наблюдения были различны. Как и следовало ожидать, у полностью вакцинированных пациентов (заболевших спустя 14 дней после второй дозы вакцины) уровень вирусной нагрузки был достоверно ($p = 0,026$) меньше, чем в группе невакцинированных. С высокой вероятностью снижение вирусной нагрузки в группе вакцинированных «Спутником V» делает эту группу менее контагиозной.

Статистически значимый уровень антител IgG к RBD в группе полностью вакцинированных превышал аналогичные значения в группе невакцинированных ($p < 0,001$). Полученные результаты показали, что в течение двух недель после получения бустерной дозы вакцины «Спутника V» сформировался полноценный специфичный иммунный ответ.

Уровень антител IgG (КП 4,72 [1,47–9,88]) в подгруппах не полностью вакцинированных был довольно низким, что может частично объяснять заболевание COVID-19 среди вакцинированных пациентов, включенных в исследование. Кроме того, ряд исследователей указывают, что значительная часть людей не имеют достаточного уровня специфичного ответа на инфекцию, что по всей вероятности обусловлено недостатком созревания В-лимфоцитов [14].

Анализ мутаций вируса в области RBD-домена, проведенный на ограниченном количестве биопроб, показал, что мутации в RBD-домене отмечаются как у вакцинированных, так и невакцинированных пациентов. Чаще мутации были зарегистрированы в группе вакцинированных, но нельзя забывать, что

сама вакцинация не оказывает влияние на мутации или их частоту, что лежит в основе вакцинопрофилактики.

Дизайн эксперимента не позволил выявить различия в ВНА антител у наблюдаемых пациентов. Статистически достоверной разницы ВНА сывороток с различными вариантами SARS-CoV-2 обнаружено не было ни при оценке всех сывороток, ни для отдельных сывороток, полученных от пациентов с характерной мутацией. Стоит отметить, что средний уровень ВНА к вирусам с мутациями был немного выше по сравнению с уровнем ВНА к вирусу дикого типа. Однако показано существенное снижение нейтрализующей способности антител и сывороток в отношении химерных штаммов SARS-CoV-2 или изогенных вариантов, содержащих мутации [15].

Результаты исследования свидетельствуют о протективных свойствах «Спутника V». Лица, прошедшие вакцинацию в полном объеме, имеют значительно меньшие риски заболевания COVID-19 по сравнению с невакцинированными, особенно в условиях продолжающейся пандемии. Данные, полученные зарубежными исследователями, по оценке вакцинных препаратов согласуются с нашими [2].

Основным ограничением настоящего исследования является небольшая выборка полностью вакцинированных пациентов, не позволяющая в полной мере оценивать влияние редких мутаций вируса на клиническое течение

болезни. Нет полного понимания, в какой степени новые варианты мутаций вируса могут дифференциально приводить к заражению вакцинированных по сравнению с невакцинированными в составе одной и той же популяции. Наше исследование имеет конкретный временной период наблюдения в Московском регионе, для которого характерны и свои региональные мутации штаммов.

ВЫВОДЫ

У пациентов, прошедших вакцинацию обоими компонентами «Спутник V» и заболевших, болезнь протекала в легкой форме (100%), и на 8–12 госпитальные дни они были выписаны из стационара. В группе полностью вакцинированных пациентов не было летальных исходов. Уровень вирусной нагрузки у полностью вакцинированных пациентов был достоверно меньше, чем в группе невакцинированных. Мутации в RBD-домене отмечены в группах как вакцинированных, так и невакцинированных пациентов. Статистически значимо уровень антител IgG к RBD был выше в группе вакцинированных по сравнению с невакцинированными. Продолжительность пандемии, мутации вируса, изменения структуры циркулирующих штаммов, изучение клинической картины вакцинированных и заболевших требуют проведения более детального и объективного анализа.

Литература

1. Колобухина Л. В., Бургасова О. А., Краева Л. А., Гущин 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.
2. Rzymiski P, Pazgan-Simon M, Krzysztof Simon T, Zarębska-Michaluk D, Szczepańska B, et al. Clinical Characteristics of Hospitalized COVID-19 Patients Who Received at Least One Dose of COVID-19 Vaccine. 2021; 9 (7): 78. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/7/781>.
3. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an RAD26 and RAD5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*. 2021; 397 (10275): 671.
4. Statistics and Research Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Available from: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
5. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (5): 533–4. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020 Sep; 20 (9): e215.
6. Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021; 397 (10287): 1819–829. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00947-8.
7. Hodick G, Tene L, Rotem RS, Patalon T, Gazit S, Ben-Tov A, et al. The effectiveness of the TWO-DOSE BNT162b2 vaccine: analysis of real-world data. *Clin Infect Dis*. 2021; ciab438. DOI: 10.1093/cid/ciab438. Epub ahead of print. PMID: 33999127.
8. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *The Lancet*. 2020; 396 (10255): 887–97.
9. Keehner J, et al. SARS-CoV-2 Infection after Vaccination in Health Care Workers in California. *N Engl J Med*. 2021; 384: 1774–5. DOI: 10.1056/NEJMc2101927.
10. NEWS (or NEWS2) score when assessing possible COVID-19 patients in primary care. Available from: <https://www.cebm.net/covid-19/should-we-use-the-news-or-news2-score-when-assessing-patients-with-possible-covid-19-in-primary-care/>.
11. Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier S, McMahon M, Meade P, et al. An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 58 (1): e108. DOI: 10.1002/cpmc.108.
12. В каких странах вакцина "Спутник V" одобрена к применению. Доступно по ссылке: <https://sputnik-meedia.ee/infographics/20210607/573214/V-kakikh-stranakh-vaktsina-Sputnik-V-odobrena-k-primeneniyu.html>.
13. Статистика вакцинации от коронавируса (COVID-19) в России. Доступно по ссылке: <https://index.minfin.com.ua/reference/coronavirus/vaccination/russia/>.
14. Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med*. 2020; 217 (11): e20201181–e20201181.
15. Diamond M, Chen R, Xie X, Case J, Zhang X, VanBlargan L, et al. SARS-CoV-2 variants show resistance to neutralization by many monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Res Sq*. 2021; 3: 228079. DOI: 10.21203/rs.3.rs-228079/v1. Preprint.

References

- Kolobukhina LV, Burgasova OA, Kraeva LA, Gushchin VA, Burtseva EI, Kruzhkova IS, et al. Clinical and laboratory profile of patients with COVID-19 hospitalized in an infectious hospital in Moscow in the period from May to July 2020. *Infectious diseases*. 2021; 19 (2): 5–15. Russian.
- Rzymiski P, Pazgan-Simon M, Krzysztof Simon T, Zarebska-Michaluk D, Szczepańska B, et al. Clinical Characteristics of Hospitalized COVID-19 Patients Who Received at Least One Dose of COVID-19 Vaccine. 2021; 9 (7): 78. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/7/781>.
- Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*. 2021; 397 (10275): 671.
- Statistics and Research Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Available from: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
- Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (5): 533–4. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020 Sep; 20 (9): e215.
- Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021; 397 (10287): 1819–829. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00947-8.
- Hodick G, Tene L, Rotem RS, Patalon T, Gazit S, Ben-Tov A, et al. The effectiveness of the TWO-DOSE BNT162b2 vaccine: analysis of real-world data. *Clin Infect Dis*. 2021; ciab438. DOI: 10.1093/cid/ciab438. Epub ahead of print. PMID: 33999127.
- Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *The Lancet*. 2020; 396 (10255): 887–97.
- Keehner J, et al. SARS-CoV-2 Infection after Vaccination in Health Care Workers in California. *N Engl J Med*. 2021; 384: 1774–5. DOI: 10.1056/NEJMc2101927.
- NEWS (or NEWS2) score when assessing possible COVID-19 patients in primary care. Available from: <https://www.cebm.net/covid-19/should-we-use-the-news-or-news2-score-when-assessing-patients-with-possible-covid-19-in-primary-care/>.
- Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier S, McMahon M, Meade P, et al. An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 58 (1): e108. DOI: 10.1002/cpmc.108.
- V kakih stranah vakcina "Sputnik V" odobrena k primeneniju. Dostupno po ssylke: <https://sputnik-meedia.ee/infographics/20210607/573214/V-kakikh-stranakh-vaktsina-Sputnik-V-odobrena-k-primeneniju.html>. Russian.
- Statistika vakcinacii ot koronavirusa (COVID-19) v Rossii. Dostupno po ssylke: <https://index.minfin.com.ua/reference/coronavirus/vaccination/russia/>. Russian.
- Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med*. 2020; 217 (11): e20201181–e20201181.
- Diamond M, Chen R, Xie X, Case J, Zhang X, VanBlargan L, et al. SARS-CoV-2 variants show resistance to neutralization by many monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Res Sq*. 2021; 3: 228079. DOI: 10.21203/rs.3.rs-228079/v1. Preprint.