

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ ВОЗ И ПОКАЗАТЕЛЬ ВАУ КАК КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ИНДИКАТОР НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ПРИ COVID-19.

Мельник А.А., к.б.н.

Первый случай коронавирусного заболевания COVID-19, вызванный вирусом SARS-CoV-2 был зарегистрирован в декабре 2019 г. (г.Ухань, Китай). В марте 2020 г. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) объявила о всемирной пандемии, которая продолжается до сих пор (1). С 31 декабря 2019 г. по 20 декабря 2021 года в 194 странах мира было зарегистрировано 275 298 531 подтвержденных случаев заболевания и 5 373 552 смертей, выздоровели 247 018 847 человек (2).

Анализ на антитела к SARS-CoV-2 был и остается важным в борьбе с пандемией COVID-19 (3-5). С самого начала пандемии FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) выдала разрешения на использование в чрезвычайных ситуациях (Emergency Use Authorizations, EUA) для сотен серологических наборов с целью лабораторного подтверждения диагноза COVID-19 (6). Данные FIND (Фонд инновационных новых диагностических средств) свидетельствуют о том, что по состоянию на апрель 2021 г. существует не менее 655 иммунологических наборов на антитела, которые либо коммерчески доступны, либо находятся в стадии разработки.

В настоящее время тестирование на антитела может предоставить ценные данные по эпиднадзору и эпидемиологической оценке для определения иммунизационного статуса населения (7,8), диагностике подозрительных случаев при отрицательном тесте на вирус РНК (9–11), подборе гипериммунной плазмы для конвалесцентной плазмотерапии (12,13), разработке терапевтических антител (14–15), определения иммунного ответа и стойкости вакцин против COVID-19 (16,17).

Первые системы тестирования на антитела к SARS-CoV-2 были разработаны для того, чтобы отличить людей с инфекцией COVID-19 от тех, кто все еще не был инфицирован новым вирусом (18). Поэтому эти иммуноанализы обычно разрабатывались как качественные, а не количественные тесты и производители ставили перед собой цель достижения максимально возможной специфичности и высокой чувствительности, для чего использовались различные антигены. По существу, можно выделить два типа анализов - на основе нуклеокапсида (NC) и шиповидного гликопротеина коронавируса (S-белок), который является основной мишенью для нейтрализации антителами, служит для связывания с рецептором и слияния с клеточной мембраной при проникновении вируса (19). У большинства инфицированных людей антитела, направленные против SARS-CoV-2 на специфические нуклеокапсидные антигены, индуцируются рано из-за типичной сильной иммуногенности вирусного нуклеокапсида. Кроме того, очень высокая специфичность достигается за счет целевой модификации антигена нуклеокапсида таким образом, чтобы не было перекрестной реактивности даже с близкородственными вирусами. Однако свойства таких нуклеокапсидов на основе этих антител остаются неясными и эти маркеры инфекции вряд ли будут функционально значимыми для обеспечения защиты или иммунитета. С другой стороны, антитела, которые реагируют с S-белком, действуют иначе. Было показано, что S-связывающие антитела выполняют функцию нейтрализующих антител. Таким образом, неудивительно, что многочисленные исследования обнаружили хорошую корреляцию между связыванием S-спайковых белков с нейтрализующими антителами (20-22). В контексте вакцин против SARS-CoV-2 именно эти нейтрализующие антитела имеют первостепенное значение.

Основная цель активной иммунизации – вызвать множество нейтрализующих антител, специфичных для SARS-CoV-2, которые идеально предотвращают проникновение вируса и способствуют остановке системного распространения для предотвращения заболевания.

Некоторые из методов для определения нейтрализующей активности имеют существенные ограничения. Так, анализы с живыми вирусами требуют 3-го уровня биобезопасности, а метод псевдотипирования очень трудоемкий и характеризуется низкой пропускной способностью (23–25). Классические тесты на антитела, которые измеряют реактивность антител в сыворотке/плазме с определенными антигенами могут выполняться очень быстро и с высокой производительностью. В связи с этим исследования антител против S-спайковых белков играют важную роль. Тем не менее, эти тест-системы должны быть в состоянии надежно определять количество антител, специфичных к SARS-CoV-2, уровни которых сопоставимыми друг с другом и иметь отличную корреляцию с наличием нейтрализующих антител.

В компании по вакцинации среди серологических тестов важную роль сыграли антитела против рецептор-связывающего домена (RBD), субъединицы S1 и full Spike (S). Однако, было отмечено, что результаты исследований сильно различаются в клинических ситуациях из-за отсутствия контрольного материала для стандартизации количественных тестов при определении нейтрализации SARS-CoV-2 (26). Поэтому возникла необходимость в разработке соответствующего количественного стандарта.

### **Первый Международный стандарт ВОЗ для иммуноглобулина G против SARS-CoV-2.**

Сейчас, в эпоху вакцинации против COVID-19, добавляется еще одна важная роль серологии SARS-CoV-2, а именно определение специфических антител после активной иммунизации. Для этого был разработан первый Международный стандарт ВОЗ для иммуноглобулина G против SARS-CoV-2 (код NIBSC 20/136) с целью гармонизации оценки иммунного ответа после естественной инфекции или вакцинации (27).

Наличие Международного стандарта для антител упростит стандартизацию серологических методов SARS-CoV-2, позволит сравнивать и согласовывать данные наборов между лабораториями. Это поможет определить уровни антител, которые необходимы для эффективности действия вакцин и терапевтических средств, а также улучшить наше понимание эпидемиологии вирусов в рамках эпидемиологических и иммунологических исследований.

Разработка Международного стандарта была организована Национальным институтом биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) в сотрудничестве с ВОЗ при содействии Коалиции за инновации в обеспечении готовности к эпидемиям (Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, CEPI).

Международные стандарты (IS) признаны эталонными материалами высшего уровня для биологических веществ и им присвоены значения в международных единицах (IU). Они используются для количественной оценки биологической активности, присутствующей в образце, позволяя сравнивать анализы из разных лабораторий и отображать сопоставимые результаты. Это дает возможность лучше определять как аналитический параметр - чувствительность тестов, так и клинический параметр - защитные уровни антител.

### **Разработка Международного стандарта ВОЗ на антитела против SARS-CoV-2.**

#### ***Образцы для исследования.***

Международным стандартом антител против SARS-CoV-2 (код NIBSC 20/136) является лиофилизированный препарат пула плазмы от 11 пациентов, выздоровевших от SARS-CoV-2 (Англия, Великобритания). Материал был собран через 28 дней после появления первых симптомов. Образцы каждого пациента обработаны с использованием детергента, чтобы минимизировать риск наличия вирусов (28). Кроме того, они были проверены на наличие вирусных маркеров (антитела к ВИЧ, HBsAg и HCV). Примерно 3500 стеклянных DIN-ампул объемом 2,5 мл, содержащих 0,25 мл объединенной плазмы были лиофилизированы 11 июня 2020 г. Первичную сушку проводили при  $-35^{\circ}\text{C}$  в течение 40 часов при вакууме 100 мкбар и последующей сушкой с постепенным увеличением температуры до

25° C в течение 10 часов, затем 30 часов вторичной сушки при 25° C и вакууме 30 мкбар. Флаконы были заполнены сухим азотом до атмосферного давления и герметизированы.

**Участники исследования**

Пятьдесят одна лаборатория согласилась участвовать в исследовании, однако трое участников из материкового Китая не смогли получить образцы для совместного исследования из-за времени, необходимого для оформления разрешения на ввоз. Четыре лаборатории не предоставили результаты вовремя для включения в отчет о совместном исследовании. Таким образом, 44 участника, представивших включенные результаты были из 15 стран, охватывающие 6 континентов: Австралия (4), Бразилия (1), Канада (1), Китай (1), Германия (3), Индия (1), Италия (1), Япония (1), Кения (1), Нидерланды (2), Саудовская Аравия (1), Сингапур (1), Южная Корея (3), Великобритания (11) и Соединенные Штаты Америки (12).

В исследовании использовано 125 методов, включая ELISA, анализы нейтрализации, проточную цитометрию, иммуноанализы латерального потока, ингибирующие анализы и один анализ двойного связывания антигена. Препарат-кандидат, образец G, код NIBSC 20/136, оценивался как часть слепой панели образцов, которая включала плазму и сыворотку от выздоровевших пациентов с SARS-CoV-2 для оценки коммутативности и согласованности результатов. Четыре пула плазмы выздоровевших были включены в исследование и разделены на образцы с высоким, средним и низким титром антител.

**Результаты исследования**

В ноябре 2020 г. итоги исследования были представлены в ВОЗ. Результаты показали, что межлабораторная вариация сократилась более чем 50 раз для анализов нейтрализации и в 2000 раз для ELISA тестов относительно Международного стандарта и была принята Комитетом экспертов ВОЗ по биологической стандартизации 10 декабря 2020 г. Международный Стандарт основан на объединенной человеческой плазме выздоровевших пациентов, который лиофилизирован в ампулах, с назначенной единицей, что составило 250 международных единиц (ME) на ампулу для нейтрализации.

Таким образом, пулированная плазма от 11 пациентов с SARS-CoV-2, образец G, код NIBSC 20/136, установлен в качестве Международного стандарта ВОЗ на антитела против SARS CoV-2. В первоначальном проекте, разрозненным участникам, была предложена общая произвольно назначенная единица 250 ME/ампула для количественного определения нейтрализующих антител против антигенов SARS-CoV-2. Инструкция по применению предлагаемого международного стандарта ВОЗ представлена на рис. 1.

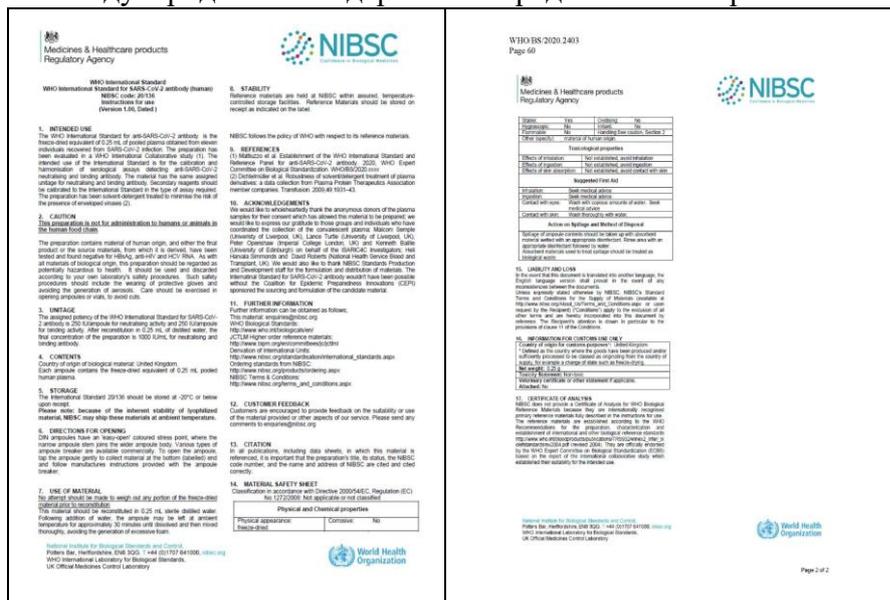


Рис.1. Предлагаемая инструкция для Международного стандарта ВОЗ на антитела против SARS CoV-2.

Результат анализа выражается в международных единицах стандарта ВОЗ - First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human), NIBSC code: 20/136 "BAU-binding antibody units (единицы связывающих антител)". Т.к. эти единицы измерения являются унифицированными для IgG к SARS-CoV-2, то они не требуют пересчета, в отличие от других единиц измерения (Ед/мл, АУ/мл и т.д.).

Чтобы привести свою систему к Международным единицам, компания-производитель должна приобрести такую ампулу. Далее ее необходимо развести в дистиллированной воде и провести тест на антитела. Исходя из соотношения BAU (которое известно) и результата анализа самой компании, можно получить коэффициент для пересчета (рис.2).

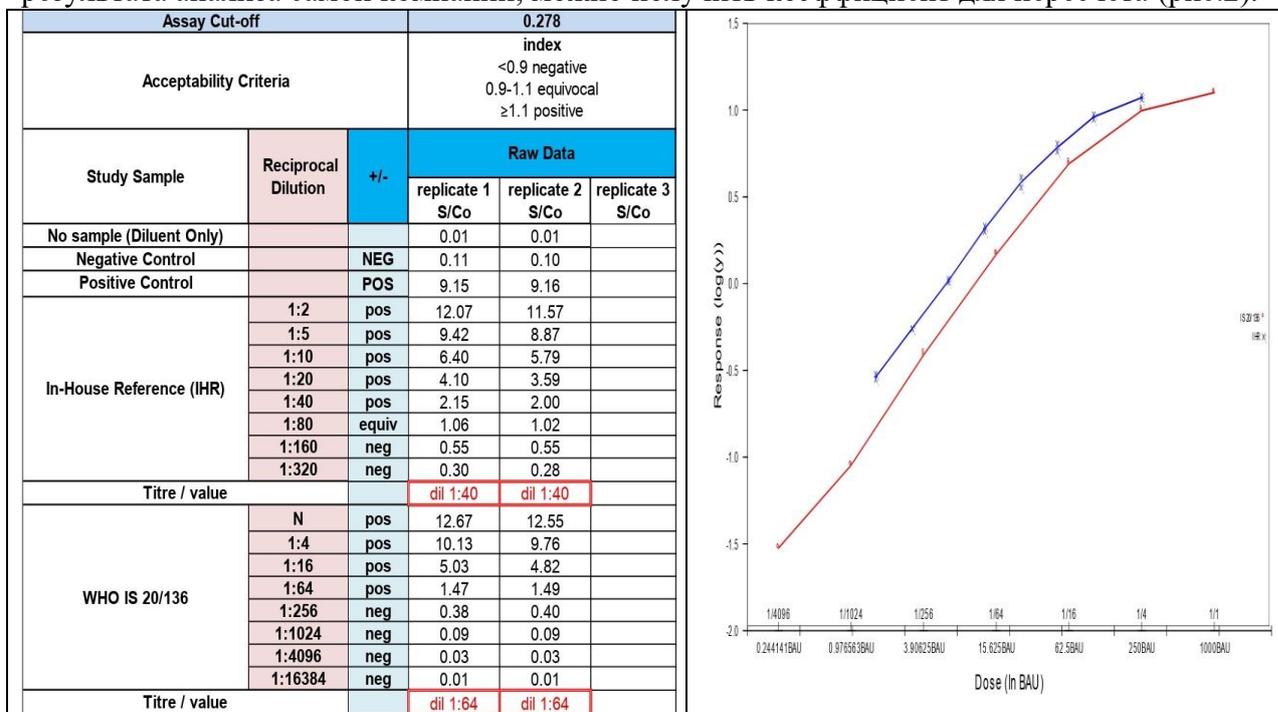


Рис.2. Пример проведения калибровки с использованием Международного стандарта WHO IS 20/136, разведенного до концентрации 1000 BAU/mL и референсного материала компании-производителя.

Летом 2021 года Всемирная организация здравоохранения утвердила **Международный стандарт измерения – First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)**, с единицей измерения BAU – «Binding Antibody Units» («единицы связывающих антител»).

Каждая фирма-производитель таких тест-систем в обязательном порядке должна перевести ее на эти новые единицы измерения. Приведение к единому стандарту помогает в унификации серологических методов SARS-CoV-2 и облегчает текущие исследования иммунного ответа на вирус, связанного с естественной инфекцией, вакцинацией и терапевтическим лечением. Таким образом, возможно регулярно проводить исследования на основании существующих штаммов вируса, отслеживать способность организма человека защищаться от новой инфекции в связи с мутацией и появлением новых штаммов, проводить коррекцию существующих данных.

Примером является работа, выполненная в лаборатории клинической химии университетской клиники «Гор Вергата» (Рим, Италия), где были протестированы шесть различных коммерческих наборов, используемых во всем мире для определения IgG к SARS-CoV-2 (29). Восемьдесят восемь последовательных образцов сыворотки (соотношение женщины:мужчины 1,4: 1, средний возраст = 57,0 ± 14,0 лет) прошли скрининг на антитела к S-белку. Когорта исследования состояла из смешанной популяции (вакцинированные пациенты, выздоровевшие от COVID-19 и здоровые пациенты). Все анализы

выполнялись в соответствии с требованиями производителя и инструкциями. Характеристики различных оцениваемых серологических тестов представлены в табл. 1.

Производитель	Набор	Целевой антиген	Метод	Определение иммуноглобулина	Cut-off (AU/мл)	Конверсионный фактор (BAU/мл)	Cut-off (BAU/мл)	Динамическая область (BAU/мл)
Mindray	SARS-CoV-2 IgG	S-RBD	CLIA	IgG	10	1,216	12,16	3,65-1216
Roche	Elecsys anti-SARS-CoV-2	S-RBD	ECLIA	IgA,IgM, IgG	0,80	1,288	0,823	0,40-243
Snibe	Maglumi SARS-CoV-2 S-RBD IgG	S-RBD	CLIA	IgG	1	4,33	4,33	0,78-433
DiaSorin	LIASON SARS-CoV-2 Trimetric S IgG	Trimetric S	CLIA	IgG	13	2,6	33,8	4,8-2080
Thermo Fisher	Elia SARS-CoV-2-sp1 IgG	S1	FEIA	IgG	7	4	28	2,8-816
Euroimmun	Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac Elisa IgG	S1	ELISA	IgG	8	3,2	25,6	3,2-384

Табл.1. Характеристика anti-SARS-CoV-2 серологических тестов: целевой антиген, метод, определение класса иммуноглобулинов, значение cut-off в единицах (AU/мл), конверсионный фактор BAU, значение Cut-off в BAU/мл и динамическая область.

**Примечание:** CLIA (хемилюминисцентный иммуноанализ), ECLIA (электрохемилюминисцентный анализ), FEIA (флуоресцентный ферментный иммуноанализ), ELISA (фермент-связанный иммуносорбентный анализ).

Таким образом, данные разных тест-систем, которые сейчас используются, необходимо привести к единому знаменателю – международным единицам BAU. Лаборатории должны выдавать заключения не только со своими цифрами, как было раньше, но и указывать количество BAU в одном миллилитре крови (BAU/мл). Теперь возможно самим пациентам пересчитать все свои тесты. Для этого необходимо взять предыдущий анализ и

посмотреть, тест какого производителя был сделан ранее (это указано бланке) и полученный результат умножить или разделить на коэффициент как указано в таблице 2.

Производитель	Единицы измерения, установленные производителем	Коэффициент пересчета $k$ [BAU/мл] = $k^*[\text{ед. производителя}]$
ДиаСорин, С.п.А., Италия	AU/мл	2,6 [BAU/мл] = 2,6*[ед. производителя]
"Рош Диагностике ГмбХ", Германия	Е/мл	$1 / 0,972$ [BAU/мл] = [ед. производителя] / 0,972
"Эбботт Ирландия, Диагностическое подразделение"	AU/мл	0,142 [BAU/мл] = 0,142*[ед. производителя]
"Шэньчжэнь Майндрэй Био-Медикал Электронике Ко., Лтд."	Ед/мл	$1 / 1,32$ [BAU/мл] = [ед. производителя] / 1,32
"ЕВРОИММУН Медицинише Лабордиагностика АГ"	Ед/мл	3,2 [BAU/мл] = 3,2*[ед. производителя]

Табл. 2. Данные некоторых тест-систем, которые сейчас используются.

У пациентов сейчас уже имеется возможность самостоятельно расшифровать свой анализ, если в лабораториях используют тест-системы разных фирм и цифры у них сильно отличаются. Используя данные из «Шкала иммунитета от COVID-19» (табл.3) с учетом содержания единиц BAU/мл, можно легко интерпретировать полученный результат.

Значения (BAU/мл)	Интерпретация результата
0-10	Антител нет, необходимо обязательно вакцинироваться
11-79	Эффект нейтрализации вируса низкий. Необходимо вакцинироваться.
80 – 149,9	Эффект нейтрализации вируса 50%, возможно инфицирование. Необходимо подумать о вакцинации.
150 - 499,9	Эффект нейтрализации вируса 100 %. Вакцинироваться не надо.
> 500	Выработан максимальный уровень антител, защита отличная. Вирус нейтрализующий эффект ярко выражен,. Вакцинироваться не надо.

Табл. 3. Шкала защиты от COVID-19.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) утвердила Международный стандарт измерения — First WHO International Stendart for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulinum (human) (NIBSC code: 20/136) с единицей измерения BAU — «binding antibody units» («единицы связывающих антител»). Такое приведение к единому стандарту поможет в расшифровке и облегчит текущие исследования иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2, связанного с естественной инфекцией, вакцинацией и терапевтическим лечением.

Для определения уровней иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 необходимо использовать наборы реагентов для количественного определения антител, а результаты исследований представлять с использованием условных единиц измерения BAU/мл (binding antibody units, «единицы связывающих анител»).

Стандартизация иммунного ответа на COVID-19 по международному стандарту ВОЗ на анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулин облегчает сравнение клинических исследований путем выражения результатов анализов нейтрализации из разных лабораторий относительно Международного Стандарта.

Использование данного стандарта используется в наборах для диагностики и мониторинга недавно перенесенной коронавирусной инфекции, в том числе бессимптомного течения заболевания, контроле напряженности поствакцинального иммунитета к S-белку SARS-CoV-2 при иммунизации вакцинами, для выявления переболевших коронавирусной инфекцией COVID-19 и оценке эффективности вакцинации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020, 579, 270–273.
2. Worldometer, S. COVID-19 Coronavirus Pandemic: Worldometer. 2020. Available online: <https://www.worldometers.info/coronavirus>.
3. F. Krammer, V. Simon, Serology assays to manage covid-19, *Science* 368 (2020) 1060–1061.
4. M. Infantino, A. Damiani, F.L. Gobbi, V. Grossi, B. Lari, D. Macchia, et al., Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives, *Isr Med Assoc J.* 22 (2020) 203–210.
5. M. Nuccetelli, M. Pieri, S. Grelli, M. Ciotti, R. Miano, M. Andreoni, et al., SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown? *Cell Death Discov.* 6 (2020) 38.
6. US Food and Drug Administration. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) emergency use authorizations for medical devices: in vitro diagnostics EUAs. 2020.
7. I. Eckerle, B. Meyer, SARS-CoV-2 seroprevalence in COVID-19 hotspots, *Lancet.* 396 (2020) 514–515.
8. M. Pollan, B. P´erez-Gomez, R. Pastor-Barriuso, J. Oteo, M.A. Hernan, M. P´erez-Olmeda, et al., ENE-COVID Study Group. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study, *Lancet.* 396 (2020) 535–544.
9. J. Zhao, Q. Yuan, H. Wang, W. Liu, X. Liao, Y. Su, et al., Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019, *Clin Infect Dis.* 71 (2020) 2027–2034.
10. L. Guo, L. Ren, S. Yang, M. Xiao, D. Chang, F. Yang, et al., Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19), *Clin Infect Dis.* 71 (2020) 778–785.
11. L.J. Carter, L.V. Garner, J.W. Smoot, Y. Li, Q. Zhou, C.J. Saveson, et al., Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis, *ACS Cent Sci.* 6 (2020) 591–605.
12. L. Ni, F. Ye, M.L. Cheng, Y. Feng, Y.Q. Deng, H. Zhao, et al., Detection of SARS CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals, *Immunity.* 52 (2020) 971–977.e3.
13. C. Shen, Z. Wang, F. Zhao, Y. Yang, J. Li, J. Yuan, et al., Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma, *JAMA.* 323 (2020) 1582–1589.
14. M. Marovich, J.R. Mascola, C.M.S. Monoclonal, Antibodies for Prevention and Treatment of COVID-19, *JAMA.* 324 (2020) 131–132.
15. B. Ju, Q. Zhang, J. Ge, R. Wang, J. Sun, X. Ge, et al., Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection, *Nature.* 584 (2020) 115–119.
16. M. Jeyanathan, S. Afkhami, F. Smaill, M.S. Miller, B.D. Lichty, Z. Xing, Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies, *Nat Rev Immunol.* 20 (2020) 615–632.
17. S.K. Samrat, A.M. Tharappel, Z. Li, H. Li, Prospect of SARS-CoV-2 spike protein: Potential role in vaccine and therapeutic development, *Virus Res.* 288 (2020), 198141.
18. Perkmann T, Perkmann-Nagele N, Breyer M-K, Breyer-Kohansal R, Burghuber OC, Hartl S, Aletaha D, Sieghart D, Quehenberger P, Marculescu R, Mucher P, Strassl R, Wagner OF, Binder

- CJ, Haslacher H. 2020. Side-by-side comparison of three fully automated SARS-CoV-2 antibody assays with a focus on specificity. *Clin Chem* 66:1405–1413.
19. Favresse J, Brauner J, Bodart N, Vigneron A, Roisin S, Melchionda S, Douxfils J, Ocmant A. 2020. An original multiplex method to assess five different SARS-CoV-2 antibodies. *Clin Chem Lab Med* 59:971–978.
20. Bal A, Pozzetto B, Traubad MA, et al. COVID SER Study Group. 2021. Evaluation of high-throughput SARS-CoV-2 serological assays in a longitudinal cohort of patients with mild COVID-19: clinical sensitivity, specificity and association with virus neutralization test. *Clin Chem* 67:742–752.
21. Bonelli F, Sarasini A, Zierold C, et al. 2020. Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2-neutralizing IgG in COVID-19 patients semiquantitatively. *J Clin Microbiol* 58:e01224-20.
22. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M, Bortolami A, Negrini D, Zuin S, Bozzato D, Cosma C, Sciacovelli L, Plebani M. 2020. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine* 62:103101.
23. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, et al. 2020. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect* 9:680–686.
24. Oguntuyo KY, Stevens CS, Hung CT, et al., COVIDAR Argentina Consortium. 2021. Quantifying absolute neutralization titers against SARS-CoV-2 by a standardized virus neutralization assay allows for cross-cohort comparisons of COVID-19 sera.
25. Vanderheiden A, Edara VV, Floyd K, et al. 2020. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Curr Protoc Immunol* 131:e116.
26. A.V. Gundlapalli, R.M. Salerno, J.T. Brooks, F. Averhoff, L.R. Petersen, L. C. McDonald, et al., SARS-CoV-2 Serologic Assay Needs for the Next Phase of the US COVID-19 Pandemic Response, *Open forum infectious diseases* 8 (1) (2021).
27. WHO. First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. 2021.
28. Dichtelmüller HO, Biesert L, Fabbrizzi F, Gajardo R, Gröner A, von Hoegen I, et al. Robustness of solvent/detergent treatment of plasma derivatives: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. *Transfusion*. 2009;49:1931–43.
29. Maria Infantino, Massimo Pieri, Marzia Nuccetelli et al. The WHO International Standard for COVID-19 serological tests: towards harmonization of anti-spike assays. *International Immunopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108095>.