

ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunogenicity) ของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบมาตรฐานและแบบยืดขยายช่วงระยะห่างออกไปสำหรับ วัคซีนชนิด BNT162b2 mRNA

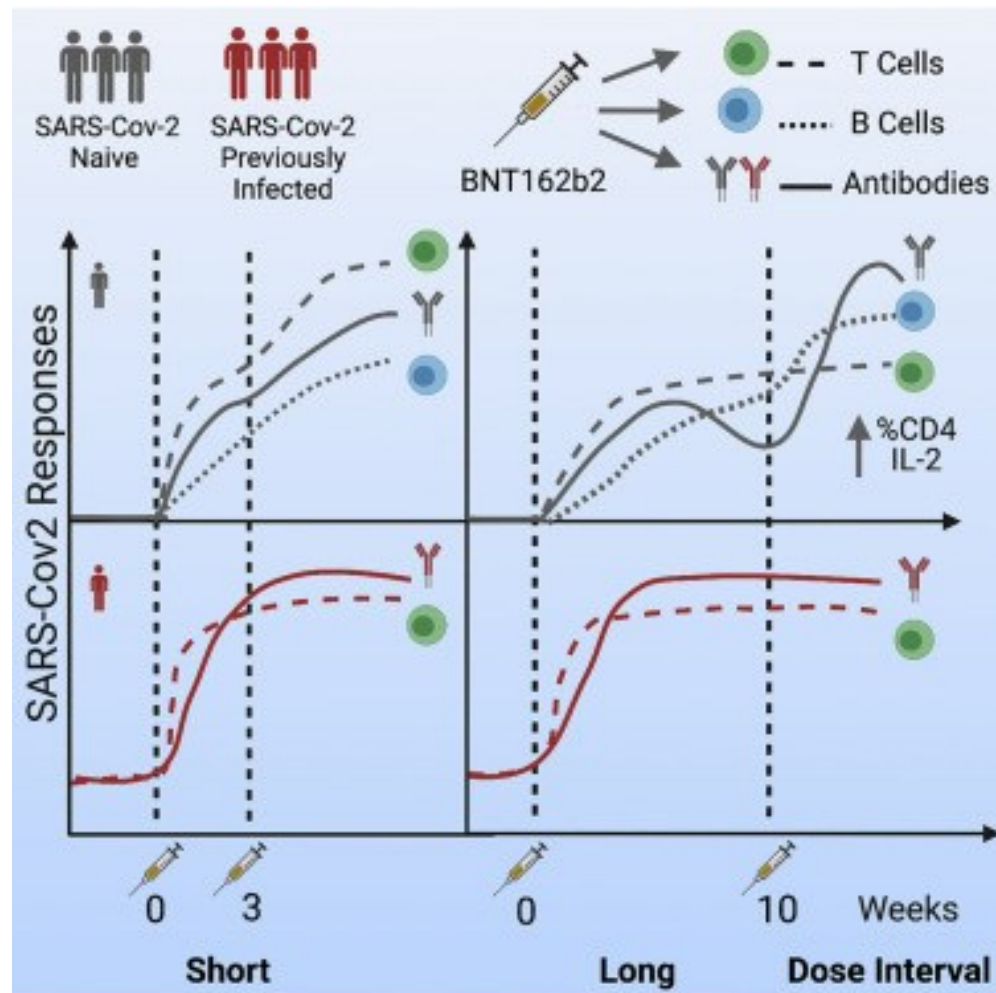
จุดเด่นที่น่าสนใจ (Highlights)

- วัคซีนชนิด BNT162b2 ที่ฉีดโดยมีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปสามารถปกป้องได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง
- ระดับของแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นหลังจากใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป เมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ
- การฉีดวัคซีนโดยใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปทำให้ CD4⁺ T cells ที่จำเพาะต่อไวรัสซึ่งมีการแสดงออกของ IL-2 มีการเพิ่มมากขึ้น
- ระดับของแอนติบอดีมีการลดลงหลังจากได้รับวัคซีนแต่ละเข็ม แต่ปริมาณรวม (pools) ของ B cell และ T cell ยังคงได้รับการดำรงรักษาไว้

สรุปผล (Summary)

การยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปสำหรับวัคซีนชนิด BNT162b2 mRNA ได้รับการริเริ่มขึ้นในสหราชอาณาจักร เพื่อเร่งให้มีการครอบคลุมของการฉีดวัคซีนเข็มแรกในประชากร ในขณะนั้นยังขาดแคลนข้อมูลจากการวิจัย และเรากล่าวถึงเรื่องนี้ในการศึกษาวิจัยในเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ของสหราชอาณาจักร วัคซีนเข็มแรกกระตุ้นให้เกิดการป้องกันจากการติดเชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาที่กำลังแพร่ระบาดอยู่ (B.1.1.7) ในช่วงเวลาหลายสัปดาห์ ในการศึกษาย่อย ๆ (substudy) กับอาสาสมัครจำนวน 589 คน เราได้แสดงให้เห็นว่าวัคซีนเข็มแรกนี้กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (neutralizing antibody [Nab]) ต่อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS-CoV-2) และการตอบสนองของ B cell และ T cell ที่คงอยู่ต่อเนื่องต่อไปต้นหนาม ระดับของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์มีการเพิ่มสูงขึ้นหลังจากมีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป (6 – 14 สัปดาห์) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาฉีดวัคซีนโดยใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนตามปกติคือ 3 – 4 สัปดาห์ รวมทั้งมีการเพิ่มสูงขึ้นของ CD4⁺ T cells ที่มีการแสดงออกของ interleukin-2 (IL-2) การติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อนหน้าทำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองที่วุ่นเพิ่มมากขึ้นและรวดเร็วขึ้น ข้อมูลเหล่านี้ซึ่งเกี่ยวกับปฏิกิริยาการตอบสนองที่มีพลวัตรในระดับเซลล์และปฏิกิริยาการตอบสนองที่อาศัยสารน้ำบ่งชี้ว่าการยืดขยายช่วงระยะห่างของการฉีดวัคซีนเป็นวิธีการในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ

Graphical abstract



บทนำ (Introduction)

ในวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2563 ประธานเจ้าหน้าที่การแพทย์ของสหราชอาณาจักร (United Kingdom Chief Medical Officers) ได้ประกาศเปลี่ยนแปลงข้อกำหนดในการฉีดวัคซีนสำหรับวัคซีนเข็มที่ 2 ที่เป็นวัคซีนชนิด BNT162b2 ของบริษัท Pfizer/BioNTech และวัคซีน SARS-CoV-2 ของบริษัท Oxford/AstraZeneca โดยให้มีการเว้นช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนเข็มแรกและเข็มที่ 2 จากปกติ 3 – 4 สัปดาห์ ให้ยืดขยายออกไปเป็นนานถึง 12 สัปดาห์ นโยบายนี้ถูกนำไปสู่การปฏิบัติ ในความพยายามที่จะหลีกเลี่ยงการเสียชีวิต และป้องกันการที่จะต้องเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเนื่องจากการเจ็บป่วยขั้นรุนแรงของโรคโควิด 19 รวมทั้งเพื่อเป็นการเอื้ออำนวยความสะดวกในการรณรงค์เริ่มฉีดวัคซีนโควิดเข็มแรกอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้เกิดการป้องกันโรคในระดับหนึ่งได้อย่างรวดเร็วเท่าที่เป็นไปได้ในประชากรกลุ่มเสี่ยง ([กระทรวงสุขภาพและสังคมสหราชอาณาจักร, พ.ศ. 2564](#))

กลยุทธ์วิธีการในการเปลี่ยนแปลงข้อกำหนดนี้อ้างอิงยึดถือตามค่าประมาณการ (estimates) ของประสิทธิภาพ (efficacy) หลังจากที่ได้รับวัคซีนเข็มแรก ซึ่งได้มาจากการวิจัยทางคลินิก จากแบบจำลอง ตลอดจนข้อมูลจากวัคซีนอื่น ๆ ถึงแม้ว่าการวิจัยทางคลินิกของบริษัท Pfizer ได้อ้างว่าประสิทธิภาพ (efficacy) ในการป้องกันการติดเชื้อที่มีอาการ (symptomatic infection) จะอยู่ที่ 52% หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ([Polack และคณะ, 2020](#)) แต่ทางคณะกรรมการร่วมว่าด้วยการฉีดวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกัน (Joint Committee on Vaccination and Immunisation หรือ JCVI) ของสหราชอาณาจักรก็ได้ประมาณการว่าประสิทธิภาพ (efficacy) ในการป้องกันการติดเชื้อที่มีอาการอยู่ที่ 89% หลังจากที่ได้ลบข้อมูลการติดเชื้อจากภายใน 14 วันแรกหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกออกไป ([คณะกรรมการร่วมว่าด้วยการฉีดวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกัน \[JCVI\], พ.ศ. 2563](#)) อย่างไรก็ตามวัคซีนนี้ก็ตั้งอยู่บนพื้นฐานของเทคโนโลยี mRNA ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ยังใหม่อยู่ และเรายังไม่ทราบมากนักเกี่ยวกับความคงทนยั่งยืน (durability) ของปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังจากที่ได้รับวัคซีนเข็มแรก หรือผลที่ได้จากการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป

ความสำเร็จของกลยุทธ์วิธีการนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิผลในสถานการณ์จริง (real-world effectiveness) ของวัคซีนเข็มแรก และขึ้นอยู่กับผลที่ได้จากการเว้นช่วงระยะห่างสำหรับวัคซีนเข็มกระตุ้น (boost) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ ของไวรัส เช่น เดลต้า (B.1.167.2) ก็อาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันของปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้น ([Reuters, พ.ศ. 2564](#)) ในขณะนี้เรายังขาดความเข้าใจเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ที่ชัดเจนที่เชื่อมโยงสัมพันธ์ในการป้องกันไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ถึงแม้ว่าความพยายามในขณะนี้ในการเปรียบเทียบวัคซีนชนิดต่าง ๆ ได้ให้ข้อบ่งชี้ของระดับความสามารถในการยึดจับ (binding) และลบล้างฤทธิ์ (neutralizing) ของแอนติบอดีที่มาพร้อมกับประสิทธิภาพ (efficacy) ([Earle และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Feng และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Khoury และคณะ, พ.ศ.](#)

2564) ที่สำคัญก็คือว่าข้อมูลจากการวิจัยทางคลินิกขนาดใหญ่ ๆ (large-scale) ซึ่งการประมาณค่าเหล่านี้ใช้อย่างไรก็ไม่ได้มีการรวมเอาระดับความสามารถของ T cells เข้าไว้ด้วย เนื่องจากว่า T cells ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นสำหรับการทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อ (Rydyznski Moderbacher และคณะ, พ.ศ. 2563 ; Tan และคณะ, พ.ศ. 2564) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในมนุษย์ในการสนับสนุนบทบาทเช่นนั้นสำหรับภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์จึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก

โครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ของสหราชอาณาจักร (The United Kingdom SARS-CoV-2 Immunity & Reinfection Evaluation [SIREN] study) เป็นการศึกษาวิจัยแบบ cohort study ชนิดก้าวไปข้างหน้า (prospective) ที่เป็นแบบพหุสถาบัน (multicenter) ในอาสาสมัครผู้ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลในสังกัดหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (National Health Service หรือ NHS) ที่สืบเนื่องมาจากการริเริ่มโครงการฉีดวัคซีนให้แก่เจ้าหน้าที่บุคลากรของหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (NHS) อย่างรวดเร็วในเดือนธันวาคมปี พ.ศ. 2563 และจากภาวะของการติดเชื้ออย่างมากจากสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาในระหว่างการแพร่ระบาดระลอกสองในสหราชอาณาจักร โครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) นับเป็นการศึกษาวิจัยที่สำคัญที่ศึกษาประสิทธิผล (effectiveness) ของวัคซีนสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในสถานการณ์จริง (Hall และคณะ, พ.ศ. 2564) โครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (The PITCH [Protective Immunity from T cells in Healthcare Workers] study) เป็นการศึกษาวิจัยแบบพหุสถาบัน (multicenter) ที่ซ้อน (nested) อยู่ภายในโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ที่มุ่งเน้นไปที่การศึกษากลไกต่าง ๆ ซึ่งรวมทั้งปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell และภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564) ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากโครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) ได้มีส่วนช่วยในการอธิบายให้เห็นถึงลักษณะต่าง ๆ มากมายของปฏิกิริยาการตอบสนองทางเซรัม (serologic response) ต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ หลังจากที่มีการติดเชื้อโดยธรรมชาติและหลังจากได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ต่างกัน (Dejnirattisai et al. และคณะ, พ.ศ. 2564; Liu และคณะ, พ.ศ. 2564; Skelly และคณะ, พ.ศ. 2564; Supasa และคณะ, พ.ศ. 2564; Zhou และคณะ, พ.ศ. 2564) และช่วยยืนยันว่ามีปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่แข็งแกร่ง หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกในผู้ป่วยที่เป็นผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อมาก่อนหน้า (Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564) ภายหลังจากเริ่มโครงการฉีดวัคซีนได้ไม่นานนักทางรัฐบาลของสหราชอาณาจักรได้ออกประกาศให้มีการเปลี่ยนแปลงโปรโตคอลสำหรับวัคซีนชนิด BNT162b2 โดยกำหนดให้มีการเว้นช่วงระยะห่างของการฉีดวัคซีนออกไปเป็น 12 สัปดาห์ มีเจ้าหน้าที่เพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดปกติ (เว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนไม่มาก) ในขณะที่ส่วนใหญ่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป

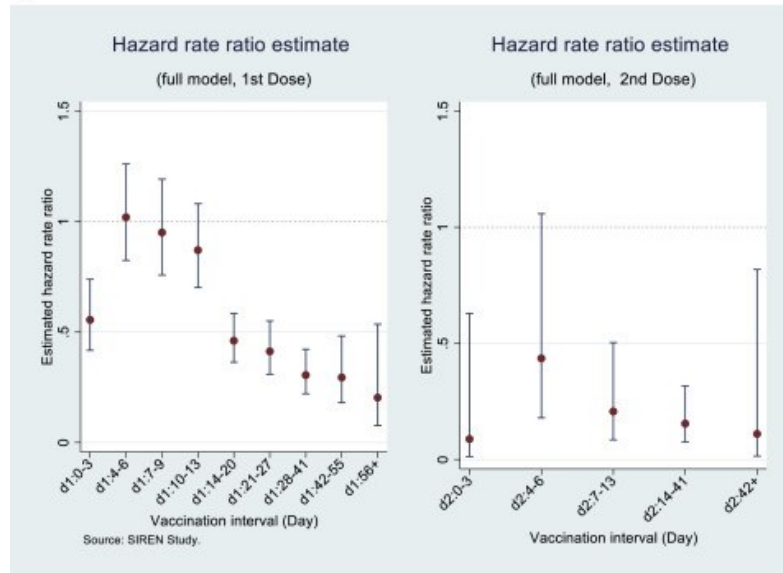
เรามีเป้าหมายต้องการที่จะติดตามปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดี (Ab) และของ T cell หลังจากที่ได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 mRNA เข็มแรก และเปรียบเทียบขนาดปริมาณของปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดี (Ab) และของ T cell ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ระหว่างการฉีดวัคซีนตามข้อกำหนดปกติกับการฉีดวัคซีนตามข้อกำหนดที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป ควบคู่ไปกับข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการป้องกัน เราสังเกตพบว่าการป้องกันทาง

คลินิกอย่างเป็นรูปธรรมต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟา และมีการกระตุ้นอย่างรวดเร็วของปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์และที่อาศัยสารน้ำ รวมทั้งแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (neutralizing Abs [NAbs]) ซึ่งส่วนมากพบในผู้ที่มีประวัติเคยติดเชื้อมาก่อน การยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไปได้นำไปสู่ระดับของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) ที่เพิ่มสูงมากขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่สอง ข้อมูลเหล่านี้อธิบายถึงผลที่ได้จากการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป และให้การสนับสนุนทางภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับการตัดสินใจเกี่ยวกับการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน

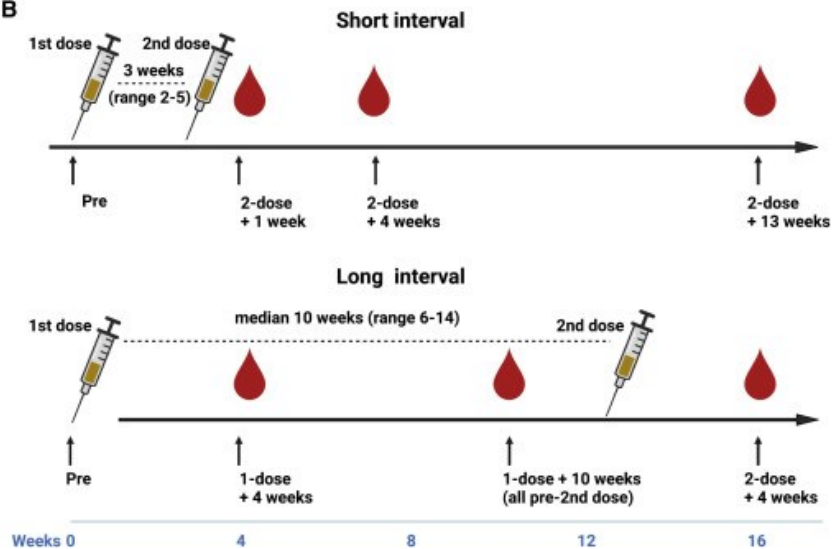
ผลที่ได้จากการศึกษา (Results)

การป้องกันที่ได้รับการกระตุ้นจากวัคซีนชนิด BNT162b2 โดยการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป เพื่อที่จะแสดงให้เห็นถึงผลของการฉีดวัคซีนแบบยืดขยายช่วงการเว้นระยะห่างของวัคซีน ที่มีต่อประสิทธิผลของวัคซีนต่อการติดเชื้อ เราจึงได้วิเคราะห์ข้อมูลจากกลุ่มอาสาสมัคร (cohort) ในโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ทั้งหมด การศึกษาวิจัยนี้ทำการติดตามทางคลินิก (clinical follow-up) เจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ (HCWs) จำนวน 25,066 คนในช่วงระหว่างวันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2563 ถึงวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2564 โดยการตรวจคัดกรองผู้ที่ไม่มีอาการ (asymptomatic screening) ด้วยวิธี PCR สำหรับช่วงระยะเวลา 95 วัน (13.6 สัปดาห์) หลังจากได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 เข็มแรก ในช่วงเวลานั้นสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟา (B.1.1.7) กำลังเป็นไวรัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญในสหราชอาณาจักร ข้อมูลเหล่านี้ได้มาจากการติดตามแบบไปข้างหน้า (prospective follow-up) ในกลุ่ม (cohort) อาสาสมัคร (Hall และคณะ, พ.ศ. 2564) ข้อมูลที่เป็นชนิด time-resolved เหล่านี้ได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นที่ละเล็กละน้อยของระดับการป้องกันต่อการติดเชื้อทั้งหมด (ทั้งที่ไม่มีอาการและที่มีอาการ) ที่เป็นผลจากวัคซีนหลังจากที่ได้รับวัคซีนเข็มแรกในอาสาสมัครผู้ที่เป็น seronegative ก่อนหน้าที่จะได้รับการฉีดวัคซีน (ภาพประกอบ 1A) อัตราความเสี่ยงในการติดเชื้อต่ำกว่า 50% สามารถมีได้หลังจากผ่านไปประมาณ 14 วัน โดยที่ระดับการป้องกันยังคงอยู่ในระดับสูงจนจนกระทั่งได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 และต่อจากนั้นจนกระทั่งสิ้นสุดระยะการติดตาม (ถึงแม้ว่ามีช่วงความเชื่อมั่นที่กว้างเนื่องจากจำนวนที่ลดลง) อัตราความเสี่ยงได้รับการปรับ (รวมทั้งสำหรับอายุ ชาติพันธุ์ โรคประจำตัว และภูมิภาค) และอัตราความเสี่ยงที่ลดต่ำลงที่พบในวันที่ 0 - 3 (days 0-3) ได้รับการอธิบายว่าเกิดจากการเลื่อน (deferral) การฉีดวัคซีนออกไปในผู้ป่วยที่มีอาการ โดยรวมแล้วข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการป้องกันที่แข็งแกร่งต่อการติดเชื้อหลังจากได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 เข็มแรก และมีประสิทธิผล (effectiveness) ของวัคซีนสูงถึง 72% ภายในช่วงเวลา 3 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก และยังคงดำรงรักษาระดับไว้ได้หลังจากได้รับวัคซีนกระตุ้นคือวัคซีนเข็มที่ 2

A



B



ภาพประกอบที่ 1. ประสิทธิภาพของวัคซีน (vaccine efficacy) และรูปแบบการศึกษาวินิจฉัย (study design)

(A) อัตราความเสี่ยง (hazard ratios) ที่ปรับแล้วซึ่งมีช่วงความเชื่อมั่น (confidence intervals) 95% สำหรับผู้ที่ได้รับการยืนยันจากการตรวจวิธี PCR ภายในช่วงเวลาหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกและเข็มที่ 2 (ที่มา: โครงการการศึกษาวินิจฉัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 [SIREN] study). เจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ได้รับการตรวจคัดกรองเป็นปกติโดยวิธี PCR สำหรับผู้ที่ไม่มีอาการ (n = 25,066; negative cohort, 16,423; positive cohort, 8,643) และติดตามอาการเป็นเวลา 95 วันหลังจากได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 เข็มแรก. อัตราความเสี่ยงได้รับการปรับ (สำหรับอายุ ชาติพันธุ์ โรคประจำตัว และภูมิภาค) โดยวิธีการทั้งหมดที่ได้รับการอธิบาย ([Hall และคณะ, พ.ศ. 2564](#)).

(B) แผนภูมิแสดงถึงการฉีดวัคซีนแบบเว้นช่วงระหว่างพัก และการฉีดวัคซีนแบบยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป และจุดเวลาในการเจาะเลือด (phlebotomy time points).

อาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการการศึกษาวินิจฉัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (the PITCH study)

อาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการการศึกษาวินิจฉัยจำนวน 589 คนได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 ของบริษัท Pfizer/BioNTech จำนวน 2 เข็ม ในช่วงระหว่างวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2564 ถึงวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2564 ในศูนย์ต่าง ๆ ของโรงพยาบาลในสังกัดหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (National Health Service หรือ NHS) ของสหราชอาณาจักร จำนวน 5 ศูนย์ด้วยกัน โดยที่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมส่วนใหญ่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป ค่ากลางมัธยฐานของอายุคือ 43 ปี (interquartile range [IQR], 32–52; range, 21–71) โดยที่ 74% (จำนวน 431 คนจากทั้งหมด 582 คนที่ได้รับการรายงาน) เป็นเพศหญิง ซึ่งแสดงถึงข้อมูลด้านประชากรศาสตร์ของโครงการการศึกษาวินิจฉัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ซึ่งเป็นโครงการแม่ ([Hall และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) และ 15% (จำนวน 72 คนจากทั้งหมด 482 คนที่ได้รับการรายงาน) มาจากกลุ่มชาติพันธุ์กลุ่มน้อยต่าง ๆ ([Table 1](#)) อาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการจำแนกออกเป็นผู้ที่ไม่เคยมีการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อน (จำนวน 334 คน หรือ 57%) หรือเป็นผู้ที่เคยติดเชื้อมาก่อน (จำนวน 255 คน หรือ 43%) โดยอ้างอิงตามผลการตรวจวิธี PCR และ/หรือผลการตรวจทางซีรั่มวิทยา (serology) ที่รายงานผลเป็นลายลักษณ์อักษรจากหน่วยงานที่ได้รับความไว้วางใจจากหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (NHS) ในพื้นที่ หรือจากผลการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนาม (spike) และ nucleocapsid (N) ของไวรัสด้วยวิธีการตรวจระดับปานกลาง (mesoscale discovery [MSD] assay) สำหรับในผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน 59% (จำนวน 150 คนจากทั้งหมด 255 คน) มีผลการตรวจไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 โดยวิธี PCR เป็นบวก ในช่วงระยะเวลาเฉลี่ย (ค่ากลางมัธยฐาน) อยู่ที่ 8.7 เดือน (IQR, 7.5–9.3) ก่อนหน้าการได้รับวัคซีน

ตารางที่ 1. ลักษณะเฉพาะของเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ (HCWs) ที่เข้าร่วมในการศึกษาวิจัยนี้ และการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีน

	ทั้งหมด	การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบสั้น ปกติ (2-5 สัปดาห์)	การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลา ออกไป (6-14 สัปดาห์)
การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีน (Dosing interval)			
ค่ากลางมัธยฐาน (เป็นวัน)	70	23.5	71
ค่ากลางมัธยฐาน (เป็นสัปดาห์)	10.00	3.36	10.14
ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (IQR) (วัน)	63-77	21-27	64-77
พิสัย (Range) (วัน)	14-105	14-35	45-105
จำนวน (N)	589	86	503
จำนวนอาสาสมัครที่เป็นเพศหญิง และ %	431 (74%)	45 (56%)	386 (77%)
จำนวนอาสาสมัครที่เป็นเพศชาย และ %	151 (26%)	36 (44%)	115 (23%)

	ทั้งหมด	การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้น ปกติ (2-5 สัปดาห์)	การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลา ออกไป (6-14 สัปดาห์)
จำนวนอาสาสมัครที่ไม่ระบุเพศ	7	5	2
อายุเฉลี่ย (Mean age)	42.30	44.96	41.87
ค่ากลางมัธยฐานของอายุ (ปี) ค่าพิสัย ระหว่างควอไทล์ (IQR)	43 (32-52)	45 (37-54)	43 (31-51)
ค่าพิสัยของอายุ (Age range)	21-71	22-64	21-71
สถานะของการติดเชื้อ (Infection status)			
จำนวนผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อน (Naïve) และ %	334 (57%)	57 (66%)	277 (55%)
จำนวนผู้ที่เคยมีการติดเชื้อ SARS-CoV-2 มาก่อน และ %	255 (43%)	29 (34%)	226 (45%)

	ทั้งหมด	การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้น ปกติ (2–5 สัปดาห์)	การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลา ออกไป (6–14 สัปดาห์s)
ชาติพันธุ์ (อาสาสมัครรายงานเอง)			
คนขาว, จำนวนและ %	410 (85.1%)	58 (84%)	352 (85%)
ชาวเอเชีย, จำนวนและ %	45 (9.3%)	7 (10%)	38 (9%)
คนดำ, จำนวนและ %	7 (1.5%)	0 (0%)	7 (2%)
อื่น ๆ, จำนวนและ %	20 (4.1%)	4 (6%)	16 (4%)
ไม่ระบุ, จำนวน	107	17	90

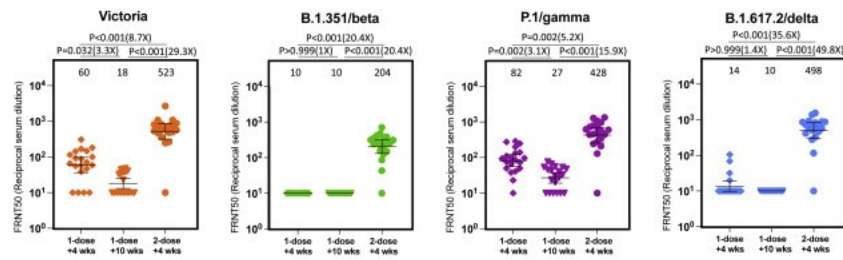
IQR = interquartile range (ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์).

การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ใช้คือ แบบ"สั้น" ปกติ คือ 2 – 5 สัปดาห์ (จำนวน [n] = 86; ค่ากลางมัธยฐาน [median] 24 วัน; ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ [IQR] 21–27; พิสัย [range] 14–35) หรือแบบยืดขยายช่วงระยะห่าง "ยาว" ออกไปคือ 6 – 14 สัปดาห์ (จำนวน [n] = 503; ค่ากลางมัธยฐาน [median] 71 วัน; ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ [IQR] 64–77; พิสัย [range] 45–105) (ภาพประกอบ 1B; ตารางที่ 1). ภาพรวมทั้งหมดของการตรวจวินิจฉัย (assays) แสดงใน ตาราง S1.

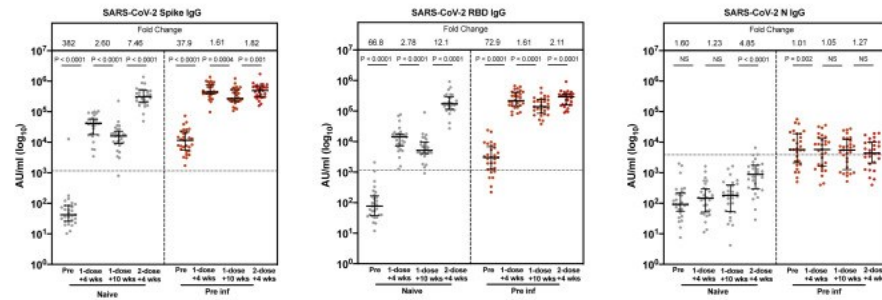
การฉีดวัคซีนเข็มแรก (priming) และการกระตุ้น (boosting) ด้วยวัคซีนเข็มที่ 2 ปฏิบัติการตอบสนองทางเซรั่มวิทยา (serologic responses) ต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 โดยใช้เวลาเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไป

ต่อจากนั้นเราได้ทำการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ที่มาพร้อมกับการป้องกันในช่วงระหว่างการได้รับวัคซีนแต่ละเข็ม (inter-dose interval) อันดับแรกโดยการใช้อาสาสมัครที่ไม่เคยมีการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อน (SARS-CoV-2-naïve) ในกลุ่มอาสาสมัครของโครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) ซึ่งเล็กกว่า ระดับของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (Nab) ได้รับการตรวจวัดโดยใช้วิธี microneutralization assay กับไวรัสเชื้อเป็น (live virus) ตามที่รายงานก่อนหน้านี้ ([Dejnirattisai และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Liu และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Supasa และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Zhou และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) เราสังเกตพบไตเตอร์ของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (Nab) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ไวรัสในช่วงแรก ๆ ของการแพร่ระบาด (สายพันธุ์วิคตอเรีย) ในระดับที่สามารถตรวจวัดได้ในอาสาสมัครส่วนใหญ่ที่ได้รับการตรวจ ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (ทั้งหมดไม่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน) ซึ่งมีค่ากลางมัธยฐานของ 50% focus reduction neutralization titer (FRNT₅₀) อยู่ที่ประมาณ 10^2 ที่จุดเวลาจุดนี้ ([Figure 2A](#)) สำหรับไวรัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้รับการตรวจคือเบต้า (B.1.351) แกมมา (P.1) และเดลต้า (B.1.167.2) มีการตรวจพบที่จำกัดมาก ๆ ของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (Nab) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์เบต้าและเดลต้าหลังการได้รับวัคซีนหนึ่งเข็ม แต่ก็มีการลดลงน้อยมากของไตเตอร์ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์แกมมาเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตระกูลวิคตอเรีย ถึงแม้ว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาไม่ได้รับการตรวจในชุดของการทดลองนี้ แต่การเปรียบเทียบที่กว้างขวางก่อนหน้านี้ก็ได้ระบุชี้ว่ามีการลดลงอย่างสม่ำเสมอของไตเตอร์ราว ๆ 3 เท่า ([Supasa และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) ไตเตอร์เหล่านี้ลดลงถึง 3 เท่าตัวหลังจากขึ้นถึงจุดสูงสุด และได้รับการกระตุ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจากที่ได้รับวัคซีนเข็มที่ 2

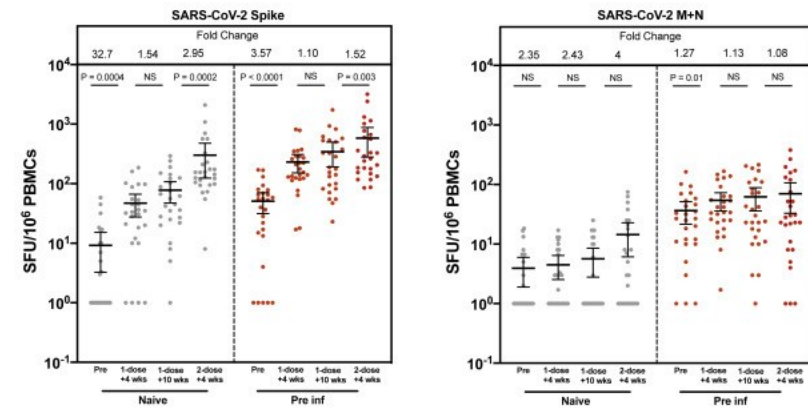
A Neutralizing antibody titers – Long interval; Naïve participants



B Antibody responses : IgG – Long interval



C T-cell responses : IFN-γ – Long interval



ภาพประกอบที่ 2. การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไปกับวัคซีนชนิด BNT162b2 (ของบริษัท Pfizer-BioNTech) กระตุ้นให้เกิดโพรไฟล์ของไคเตอร์แอนติบอดีชนิดลงล่างฤทธิ์ต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่น่ากังวลได้อย่างเด่นชัด และดำรงรักษาปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ไว้ได้

A) แอนติบอดีชนิดลงล่างฤทธิ์ (Nabs) ที่จำเพาะต่อ Victoria isolate, B.1.351 (เบต้า), P.1 (แกมมา), และ B.1.617.2 (เดลต้า) จากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่ติดเชื้อ (naïve) ที่ 4 สัปดาห์ (n = 20) และที่ 10 สัปดาห์ (n = 20) หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก และที่ 4 สัปดาห์ (n = 20) หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในกลุ่ม (cohort) ที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไป. แกน x, ระยะเวลา (เป็นสัปดาห์) หลังจากได้รับวัคซีน. ไคเตอร์ลงล่างฤทธิ์ที่เป็นค่าเฉลี่ยเรขาคณิตที่แสดงเหนือแต่ละคอลัมน์ และทำเครื่องหมายเป็นเส้นในแนวนอนบนแต่ละคอลัมน์ซึ่งมีช่วงความเชื่อมั่น (confidence intervals) 95%. การตรวจโดยวิธี FRNT, focus reduction neutralization assay; FRNT₅₀, การเจือจางในอัตราส่วนเท่า ๆ กันไปเรื่อย ๆ (reciprocal dilution) ของความเข้มข้นของเซรัมที่ต้องการเพื่อให้เกิดการลดลง 50% ของ infectious focus-forming units ของไวรัสใน Vero cells (ATCC, CCL-81).

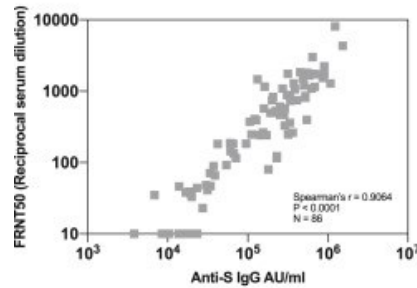
(B) Time course ของ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนาม (S) ต่อ receptor binding domain (RBD) และต่อ nucleocapsid (N) ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 โดยการตรวจวิธี multiplexed MSD immunoassays ในผู้ที่ไม่ติดเชื้อ (naïve) จำนวน 29 คน และผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อน (pre-infected) จำนวน 29 คน ที่ได้รับวัคซีนโดยที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายเวลาออกไป. ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย arbitrary units (AU)/mL. เส้นประในแนวนอนหมายถึงค่า cutoff ของแต่ละการตรวจที่อ้างอิงยึดถือตามเซรัมในช่วงก่อนหน้าที่จะมีการแพร่ระบาดของโรค.

(C) การเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN γ ELISpot ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (วิคตอเรีย) จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) จากผู้ที่ไม่ติดเชื้อ (naïve) จำนวน 26 คน และผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน 26 คน ที่ได้รับวัคซีนโดยที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายเวลาออกไป. ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย spot-forming units ต่อล้านเซลล์ของ PBMCs (SFU/10⁶).

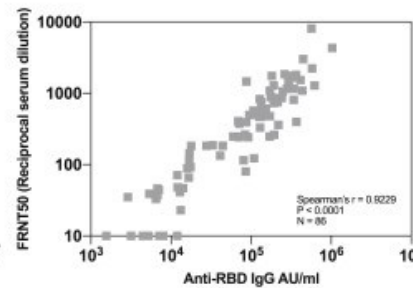
วงกลมสีเทาหมายถึงผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve); วงกลมสีแดงหมายถึงผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน. Pre หมายถึงก่อนหน้าได้รับวัคซีน; 1-dose + 4 weeks หมายถึงที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก; 1-dose + 10 weeks หมายถึงที่ 8–12 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก; 2-dose + 4 weeks หมายถึงที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. แท่ง (B) และ (C) หมายถึงค่ากลางมัธยฐาน (median) ที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range). จุดเวลา (time points) สำหรับ (A) ได้รับการเปรียบเทียบโดยใช้ Kruskal-Wallis nonparametric test และ Dunn's multiple comparisons tests และค่า p values แสดงเหนือเส้นเชื่อมและ fold changes ในวงเล็บ. การเปรียบเทียบแบบจับคู่ (paired comparisons) สำหรับ (B) และ (C) โดยใช้ Wilcoxon matched pairs signed rank test โดยมีค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change values) ที่อ้างอิงถึงการเปรียบเทียบของ p value ที่อยู่ถัดไปข้างล่าง. ข้อมูลใน (B) จากปฏิกิริยาการตอบสนองในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมจำนวน 51 คนก่อนหน้าการได้รับวัคซีน และในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมจำนวน 51 คน ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ตลอดจนข้อมูลจาก (C) จากปฏิกิริยาการตอบสนองในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมจำนวน 51 คนก่อนหน้าได้รับวัคซีน และจำนวน 51 คน ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ไปแล้วก่อนหน้านี้ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)).

จากการใช้การตรวจวิธี multiplex ELISA (MSD) ในการวัดระดับของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส เราพบว่ารูปแบบ (pattern) ของการลดลงที่คล้ายคลึงกันหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกและการกระตุ้นหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) ([ภาพประกอบ 2B](#)) ปฏิกิริยาการแผ่กระจายของแอนติบอดีในกลุ่มที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน และระดับของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสก่อนหน้าที่จะได้รับวัคซีนเข็มแรกมีอยู่ในระดับที่เข้าใกล้ระดับที่พบหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) และได้รับการกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากจากวัคซีนเข็มแรก โดยรวมแล้วระดับการลงล่างฤทธิ์ (neutralization levels) มีสหสัมพันธ์กับไคเตอร์ที่จับกับโปรตีนส่วนหนามของไวรัสและ receptor binding domain (RBD) ([ภาพประกอบ S1A–S1D](#)) เราได้ใช้โมเดลการถดถอยผลกระทบผสมเชิงเส้น (linear mixed-effects regression model) ในการยืนยันสิ่งที่พบเหล่านี้หลังจากมีการปรับสำหรับอายุและเพศแล้ว ([ตารางที่ 2](#))

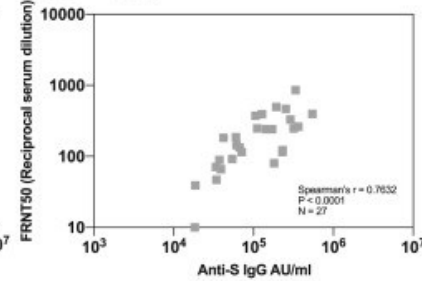
A Spike IgG responses versus nAb titres



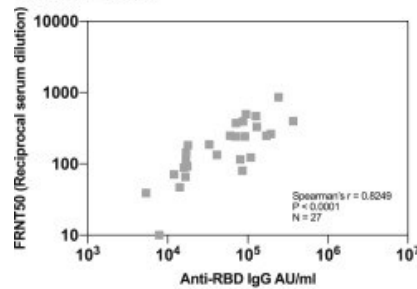
B RBD IgG responses versus nAb titres



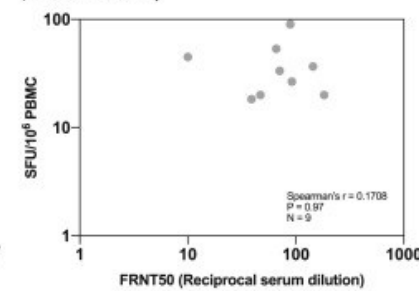
C Spike IgG responses versus nAb titres (2dose + 4wks)



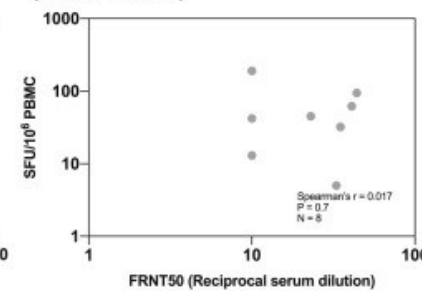
D RBD IgG responses versus nAb titres (2dose + 4wks)



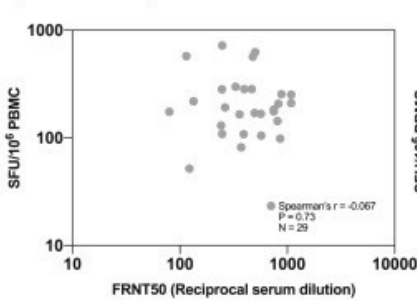
E nAb titres vs. Spike T cell responses (1dose + 4wks)



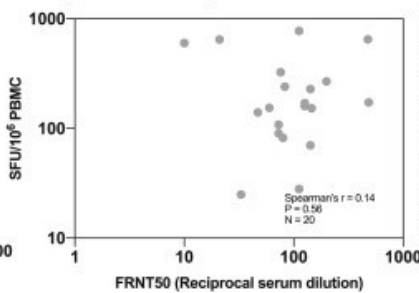
F nAb titres vs. Spike T cell responses (1dose + 10wks)



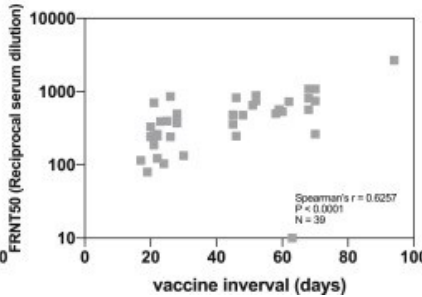
G nAb titres vs. Spike T cell responses (2dose + 4wks)



H nAb titres vs. Spike T cell responses (2dose + 13wks)



I Vaccine interval vs. nAb titres (2dose + 4wks)



ภาพประกอบ S1. สหสัมพันธ์ของไตเตอร์แอนติบอดีชนิดลงฤทธิ์ (NAb titers) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell และ IgG และการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนซึ่งสัมพันธ์กับภาพประกอบ 2 และ 3A

A. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (MSD) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรียจากทุกจุดเวลา (all time points) และการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน. B. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อ Receptor binding domain (MSD) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรียจากทุกจุดเวลา (all time points) และการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน. C. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อหนามไวรัส (MSD) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรีย ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (3 สัปดาห์) และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป (10 สัปดาห์). D. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (MSD) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรีย ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (3 สัปดาห์) และการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป (10 สัปดาห์). E. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรียกับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก. F. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรียกับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ที่ 10 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก. G. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรีย กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (3 สัปดาห์) และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป (10 สัปดาห์). H. ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ต่อไวรัสใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ B ตรวจจับวัดต่อเรีย กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ที่ 13 สัปดาห์ หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (3 สัปดาห์) และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป (10 สัปดาห์). I. สหสัมพันธ์ระหว่างการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนกับแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ (nAB) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. ใช้สหสัมพันธ์แบบSpearman's correlation. สัญลักษณ์สีเทาแสดงถึงอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve).

ตารางที่ 2. โมเดลการถดถอยผลกระทบผสมเชิงเส้น (linear mixed-effects regression models) ของปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ T cell (IFN γ) หรือแอนติบอดี (IgG)

Coefficient	S T cell responses in naive participants			S T cell responses in pre inf participants			S Ab responses in naive participants			S Ab responses in pre inf participants		
	Estimates	CI (95%)	p Value	Estimates	CI (95%)	p Value	Estimates	CI (95%)	p Value	Estimates	CI (95%)	p Value
Intercept	1.47	0.95-1.98	<0.001 ^a	1.92	1.26-2.59	<0.001 ^a	4.84	4.42-5.26	<0.001 ^a	5.77	5.41-6.12	<0.001 ^a
Age	0.00	0.02 to 0.01	0.705	0.01	0.01 to 0.02	0.480	0.01	0.02 to 0.00	0.090	0.00	0.01 to 0.01	0.640
Sex (M)	0.15	0.54 to 0.23	0.435	0.42	0.01-0.84	0.046 ^a	0.09	0.26 to 0.45	0.608	0.04	0.29 to 0.21	0.757
Time point (pre vaccine)	0.79	1.08 to 0.50	<0.001 ^a	0.88	1.09 to 0.67	<0.001 ^a	2.79	2.95 to 2.63	<0.001 ^a	1.65	1.77 to 1.54	<0.001 ^a
Time point (dose 1 +10 weeks)	0.28	0.01 to 0.57	0.060	0.08	0.13 to 0.28	0.466	0.38	0.53 to 0.22	< 0.001 ^a	0.18	0.29 to 0.07	0.002 ^a
Time point (dose 2 +4 weeks)	0.85	0.56-1.13	<0.001 ^a	0.31	0.10-0.51	0.003 ^a	0.97	0.81-1.12	<0.001 ^a	0.02	0.13 to 0.10	0.793

Random effects				
σ^2	0.28	0.14	0.09	0.05
τ_{00}	0.06 ^{PubID}	0.12 ^{PubID}	0.09 ^{PubID}	0.04 ^{PubID}
ICC	0.18	0.46	0.49	0.43
N	26 ^{PubID}	26 ^{PubID}	29 ^{PubID}	29 ^{PubID}
Observations	103	104	116	116
Marginal R ² /conditional R ²	0.506/0.593	0.462/0.710	0.914/0.956	0.848/0.913

Shown are four linear mixed-effect regression models (LMERs) of T cell or Ab responses in naive or pre-inf individuals across vaccine time points in the long vaccine dose regimen. Variables include age, sex, and time point. Variable references are sex (F [female] versus M [male]), time point (dose 1 + 4 weeks versus pre-vaccine/dose 1 + 10 weeks/dose 2 + 4 weeks).
^aIndicates statistical significance.

ที่แสดงในภาพประกอบเป็นโมเดลการถดถอยผลกระทบทผสมเชิงเส้น (linear mixed-effect regression models [LMERs]) จำนวน 4 โมเดลของปฏิริยาการตอบสนองของ T cell หรือของแอนติบอดีในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) หรือที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อนหน้าตลอดจุดเวลาต่าง ๆ ของการได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายระยะห่างระหว่างแต่ละเข็มออกไป. ตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ อายุ เพศ และจุดเวลา. Variable references ได้แก่ เพศ (F [เพศหญิง] หรือ M [เพศชาย]), จุดเวลา (ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก หรือก่อนได้รับวัคซีน/ที่ 10 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก/ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2).

a ป่งชี้สำคัญทางสถิติ.

โดยสรุปแล้ว ปฏิริยาการตอบสนองที่ชัดเจนที่อาศัยสารน้ำต่อไวรัสสายพันธุ์ในวัคซีนได้รับการกระตุ้นจากวัคซีนเข็มแรกตลอดทั่วทั้งกลุ่ม ถึงแม้ว่ามีแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) จะอยู่ในระดับต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์เบต้าและเดลต้าก็ตาม ปฏิริยาการตอบสนองสูงสุดของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) ที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (priming) มีการลดลงต่อนั้นในช่วงระหว่างการยืดขยายระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป ซึ่งส่วนใหญ่เห็นได้ชัดในผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) และจะเพิ่มสูงขึ้นหลังจากที่ได้รับวัคซีนเข็มที่ 2

การกระตุ้นและการดำรงรักษาไว้ซึ่งปฏิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโดยใช้การยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป

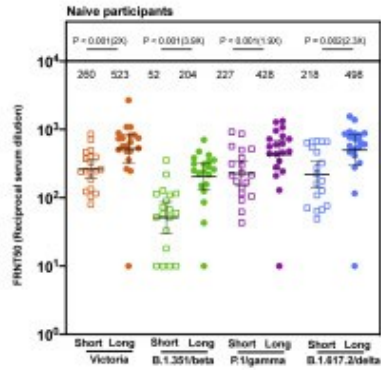
ต่อจากนั้นเราได้ศึกษาปฏิริยาการตอบสนองของ T cell โดยใช้วิธี interferon-gamma (IFN γ) enzyme-linked immune absorbent spot (ELISpot) assay ซึ่งเป็นที่ยอมรับ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Ogbe และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) ปฏิริยาการตอบสนองของ T cell ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสที่มีการดำรงรักษาไว้ดีในช่วงระหว่าง 10 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (primary vaccine) โดยที่ไม่มีหลักฐานของการลดลง (contraction) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบเห็นเท่ากันในกลุ่มที่มีการติดเชื้อมาก่อนและในกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) ([ภาพประกอบ 2C](#)) T cells ได้รับการกระตุ้นจากวัคซีนเข็มที่ 2 ในทั้ง 2 กลุ่ม โดยที่เกิดมากที่สุดในกลุ่มที่ไม่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) ในทางตรงกันข้ามปฏิริยาการตอบสนองต่อเป้าหมายของ T cell ที่ไม่ใช่นามไวรัส (membrane [M] and N) แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงแค่เพียงน้อยมากในช่วงเวลานี้ทั้งใน 2 กลุ่ม ([ภาพประกอบ 2C](#)) เราได้ใช้โมเดลการถดถอยผลกระทบทผสมเชิงเส้น (linear mixed-effects regression models) เพื่อยืนยันผลที่ได้เหล่านี้ ภายหลังจากที่มีการปรับสำหรับอายุและเพศ ([ตารางที่ 2](#)) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการดำรงรักษาไว้ซึ่งปฏิริยาการตอบสนองระดับเซลล์ จากการที่ใช้วิธีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป เราไม่พบเห็นความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) กับปฏิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ([ภาพประกอบ S1E–S1H](#))

การยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปนำไปสู่การเพิ่มขึ้นสูงสุดของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) และ B cells แต่ไม่ใช่กับ T cells

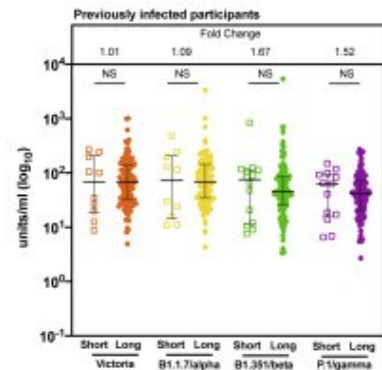
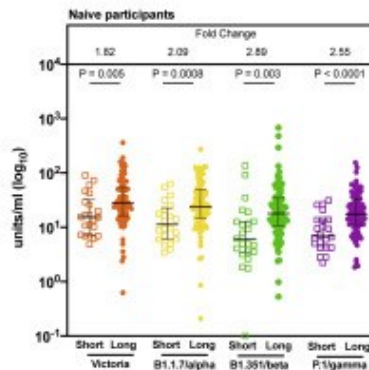
ต่อจากนั้นเราได้เปรียบเทียบปฏิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกลุ่มอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อน ที่ได้รับการฉีดวัคซีนโดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย “ยาว” ออกไป กับกลุ่มที่ได้รับ

การฉีดวัคซีนโดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ (สั้น) ปกติคือ 3 – 4 สัปดาห์ เราสังเกตพบว่าในผู้ที่ได้รับวัคซีนโดยมีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย “ยาว” ออกไปนี้ มีไคเตอร์ของแอนติบอดีชนิดบล็อกล้างฤทธิ์ (NAb) ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า (4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในทั้ง 2 กลุ่มซึ่งมีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนต่างกัน สำหรับอาสาสมัครทั้งหมดที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน) โดยมีการเพิ่มขึ้นของไคเตอร์สูงถึง 2 - 4 เท่า ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ทดสอบ ([ภาพประกอบ 3A](#)) และมีสหสัมพันธ์ตลอดช่วงเวลา ([ภาพประกอบ S1I](#)) ในแต่ละกรณีไคเตอร์ต่อไวรัสให้วัดใหญ่สายพันธุ์ B ตระกูลวิคตอเรียมีมากกว่าต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์เบต้า แกมมา และเดลต้าที่เราทดสอบ โดยที่สังเกตพบการลดลงมากที่สุดของไคเตอร์ต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์เบต้า ซึ่งประโยชน์จากการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายก็มีมากที่สุดในสายพันธุ์กลายพันธุ์นี้ด้วยเช่นกัน ข้อมูลเหล่านี้ได้รับการยืนยันโดยใช้การตรวจครั้งที่ 2 (secondary assay) ที่อยู่บนพื้นฐานของการยับยั้งขัดขวางการยึดจับของ receptor binding domain (RBD) กับ ACE2 (MSD) ([ภาพประกอบ 3B](#)) เหมือนเดิมเราพบว่าการเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไปกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เราทดสอบ (รวมทั้งสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาซึ่งกำลังแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในระหว่างช่วงเวลาของการศึกษาวิจัยนี้) และปรากฏการณ์นี้มีความชัดเจนมากที่สุดในกลุ่มอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (infection-naive cohort)

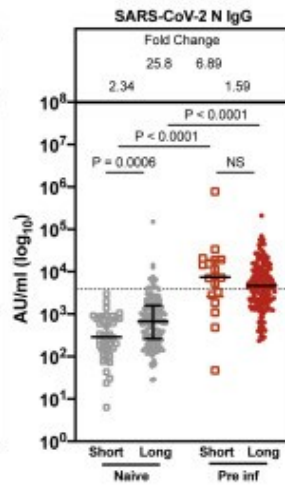
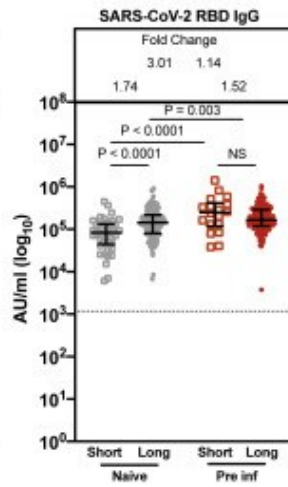
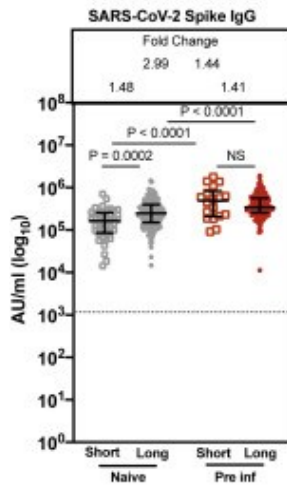
A Neutralizing antibody titers Short versus Long interval



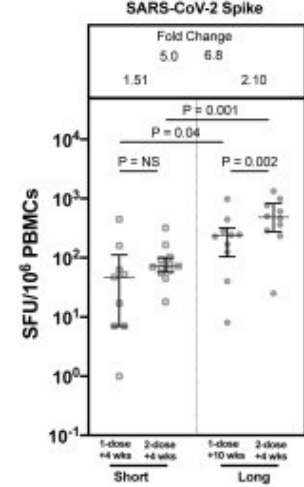
B Antibody responses : ACE2 inhibition Short versus Long interval



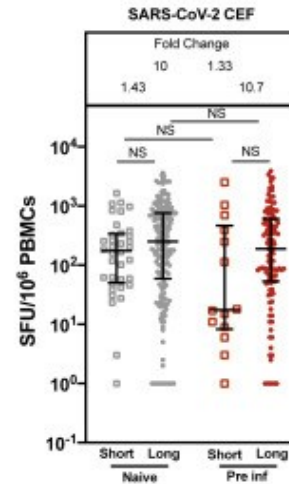
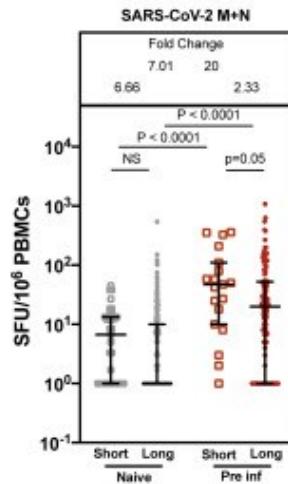
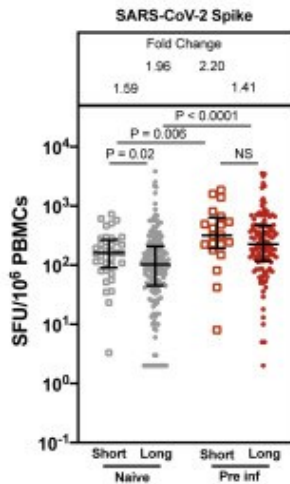
C Antibody responses : IgG - Short versus Long interval



D B cell responses Short versus Long



E T-cell responses : IFN-γ – Short versus Long interval



ภาพประกอบที่ 3. การเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2

(A) การเปรียบเทียบแอนติบอดีชนิดคลอแลงทูทรี (Nabs) ต่อ Victoria isolate, B.1.351 (เบต้า), P.1 (แกมมา), และ B.1.617.2 (เดลต้า) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (n = 19) และการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป (n = 20) ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน. ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 3.3 สัปดาห์ (พิสัยเท่ากับ 2.4 – 4.3) ระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มในกลุ่มที่ใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" และค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 8.4 สัปดาห์ (พิสัยเท่ากับ 6.4-10) ในกลุ่มที่ใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป. แสดงโดเตอร์บลอต (neutralizing titers) ที่เป็นค่าเฉลี่ยเรขาคณิตที่มีช่วงความเชื่อมั่น (confidence intervals) 95%. การตรวจโดยวิธี FRNT, focus reduction neutralization assay; FRNT₅₀, การเจือจางในอัตราส่วนเท่า ๆ กันไปเรื่อย ๆ (reciprocal dilution) ของความเข้มข้นของเซรัมที่ต้องการเพื่อให้เกิดการลดลง 50% ของ infectious focus-forming units ของไวรัสใน Vero cells (ATCC, CCL-81).

(B) ผลของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" และแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป ต่อความสามารถของเซรัมในการต่อต้านขัดขวางการยึดจับของ ACE2 กับโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (วัดโดย, B.1.1.7 [อัลฟา], B.1.351 [เบต้า], หรือ P.1 [แกมมา]) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. การต่อต้านขัดขวางของ ACE2 ได้รับการตรวจวัดโดยใช้การตรวจวิธี multiplexed MSD assay. ข้อมูลแสดงเป็น units/mL. แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงค่ากลางมัธยฐานที่มีช่วงความเชื่อมั่น (confidence intervals) 95%. อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น": n = 23; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" : n = 94; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้านี้และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" : n = 14; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้านี้และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" : n = 119.

(C) ผลของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" และแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไปต่อปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนาม ต่อ RBD และต่อโปรตีน N ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (วงกลมสีเทา) และในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อก่อนหน้านี้ (วงกลมสีแดง). ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ได้รับการตรวจวัดในเซรัม ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การตรวจแบบ multiplexed MSD immunoassays และแสดงเป็น arbitrary units (AU)/mL. อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" n = 41; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" n = 151; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อก่อนหน้านี้ และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" n = 19; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อก่อนหน้านี้ และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" n = 169. เส้นประในแนวนอนหมายถึงค่า cutoff ของแต่ละการตรวจซึ่งอ้างอิงยึดถือตามเซรัมช่วงก่อนหน้าที่จะมีการแพร่ระบาดของโรค.

(D) ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG B ELISpot จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (n = 9), ที่ 2 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (n = 12), ที่ 10 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" (n = 10), และที่ 2 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" (n = 10). ค่าตัวเลขต่าง ๆ แสดงเป็น spot-forming units ต่อล้านเซลล์ของ PBMCs (SFU/10⁶) ที่เป็นตัวแทนของเซลล์ที่หลั่ง IgG ยังขัดขวางโปรตีนส่วนหนามของไวรัส.

(E) ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN γ ELISpot จาก PBMCs ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (n = 37), ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" (n = 188), อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อก่อนหน้านี้และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" (n = 20), และในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อก่อนหน้านี้ และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" (n = 124). ค่าตัวเลขต่าง ๆ แสดงเป็น SFU/10⁶. ที่แสดงไว้เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ peptide pools ที่แสดงหน่วยย่อย (subunits) S1 และ S2 ของโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (วัดโดย), peptide pools แสดง membrane (M) และโปรตีน N และแอนติเจนของไวรัส cytomegalovirus, ไวรัส Epstein-Barr, ไวรัสไข้หวัดใหญ่, และแอนติเจนของโรคบาดทะยัก (CEF). แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range) สำหรับ (B), (C), (D), และ (E). จุดเวลา (time points) ได้รับการเปรียบเทียบโดยใช้การทดสอบแบบ two-tailed Mann-Whitney tests และค่า p values แสดงเหนือเส้นเชื่อมและการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold changes) ในวงเล็บสำหรับ (A) และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change values) ซึ่งแสดงถึงการเปรียบเทียบค่า p value ได้ (B)–(E).

เราได้ทำการตรวจสอบผลของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนต่อแอนติบอดีชนิดที่ยึดจับกับโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ (binding Abs) โดยใช้โปรตีนหนามไวรัส RBD และโปรตีน N เป็นเป้าหมาย และแบ่งกลุ่มอาสาสมัครผู้เข้าร่วมออกเป็น 2 กลุ่มตามเกณฑ์การ

ติดเชื้อมาก่อนหน้านี้ เป็นอีกครั้งหนึ่งที่เราได้เห็นถึงข้อดีอย่างชัดเจนของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยาย “ยาว” ออกไป ถึงแม้ว่าแค่เพียงในกลุ่มอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนก็ตาม (ภาพประกอบ 3C) กลุ่มอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้ามีการจับกับโปรตีนส่วนหนามของไวรัสและ RBD ในระดับที่สูงเท่ากันไม่ว่าจะใช้ข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนเป็นแบบใดก็ตาม (ภาพประกอบ 3C) เราได้ใช้โมเดลการถดถอยเชิงเส้นทั่วไป (generalized linear regression models) เพื่อยืนยันสิ่งที่เราพบเหล่านี้หลังจากมีการปรับสำหรับอายุ เพศ และสถานะของการติดเชื้อมาก่อนหน้านั้น โดยที่มีโมเดลแยกออกไปต่างหากสำหรับผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า (ตารางที่ 3) เราไม่พบผลกระทบจากชาติพันธุ์ ใน ชุด ข้อมูล (dataset) ที่ มี ก า ร ล ด ง (n = 143) ที่ ชี ง มี ขั อ มู ล นี อ ยู่ (ต า ร า ง S2)

ตารางที่ 3. โมเดลการถดถอยเชิงเส้นทั่วไป (generalized linear regression models) ของปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ T cell (IFN γ) หรือของแอนติบอดี (IgG)

ปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (S) ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) และอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2				ปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (S) ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2			ปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส(S) ในอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อนที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2		
ค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient)	ค่าประมาณ (Estimates)	CI (95%)	p Value	ค่าประมาณ (Estimates)	CI (95%)	p Value	ค่าประมาณ (Estimates)	CI (95%)	p Value
Intercept	2.21	1.90–2.51	<0.001 ^a	5.40	5.18–5.63	<0.001 ^a	5.50	5.26–5.73	<0.001 ^a
Age	−0.00	−0.01 to 0.00	0.522	−0.01	−0.01 to −0.00	0.020 ^a	0.00	−0.00 to 0.00	0.554
Sex (M)	−0.06	−0.21 to 0.08	0.404	−0.10	−0.20 to 0.00	0.060	0.02	−0.09 to 0.13	0.690
มีการติดเชื้อมาก่อนหรือไม่ (ใช่)	0.38	0.24–0.51	<0.001 ^a						

	<p>ปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (S) ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) และอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2</p>			<p>ปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (S) ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2</p>			<p>ปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (S) ในอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อนที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2</p>		
มีการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป	-0.19	-0.37 to -0.01	0.041 ^a	0.20	0.08-0.32	0.001 ^a	0.01	-0.14 to 0.17	0.886
ค่าที่ได้จากการสังเกต (R ²)	374 (0.086)				189 (0.131)			184 (0.003)	

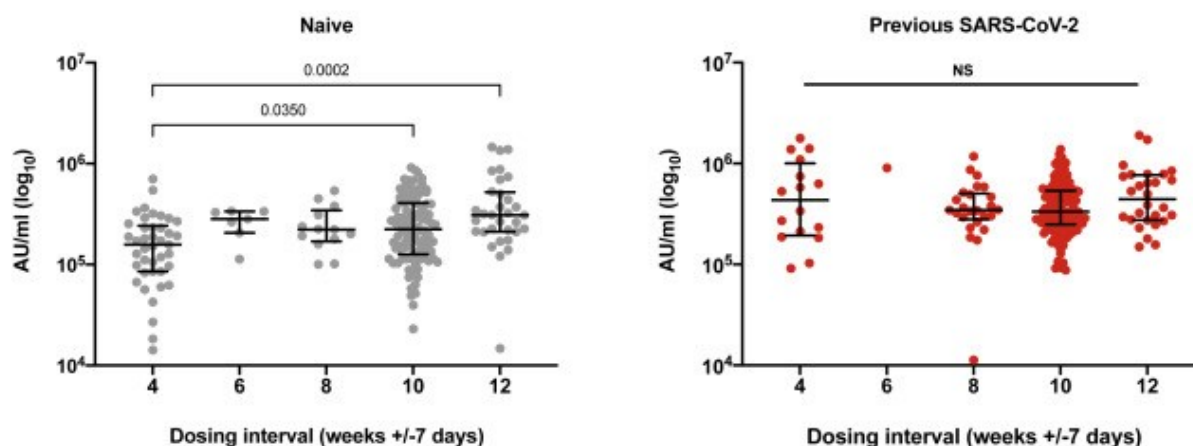
ที่แสดงไว้คือโมเดลเชิงเส้นทั่วไป (generalized linear models [GLMs]) จำนวน 3 โมเดลของปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell (ผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อนและผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อน) ปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดี (ผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อน) และปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดี (ผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อน) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. ตัวแปรต่างๆ ได้แก่ อายุ เพศ การติดเชื้อมาก่อนหน้า และการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีน. Variable references ได้แก่ เพศ (F [เพศหญิง] หรือ M [เพศชาย]) มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า (ใช่หรือไม่ใช่) และการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีน (แบบ "สั้น" ปกติหรือแบบยืดขยาย "ยาว" ออกไป. CI, confidence interval (ช่วงความเชื่อมั่น).

a บ่งชี้สำคัญทางสถิติ.

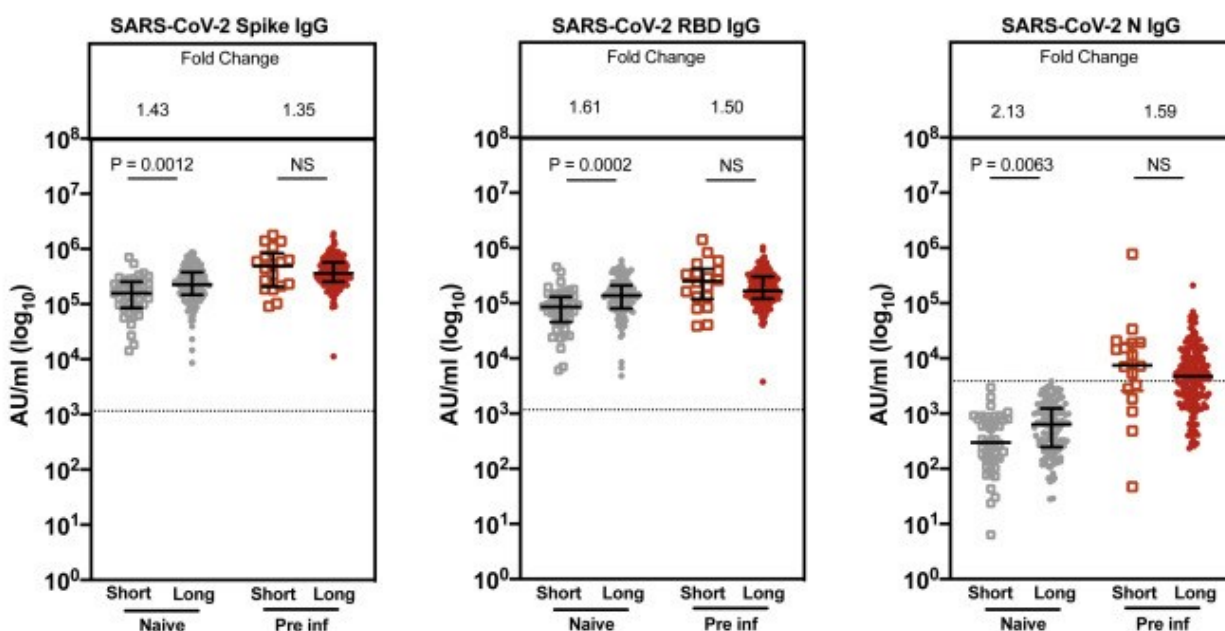
จากการที่เปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส กับการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนที่จัดแบ่งเป็นกลุ่ม ๆ คือช่วงระหว่างประมาณ 4 สัปดาห์ 6 สัปดาห์ 8 สัปดาห์ 10 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ เราพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (infection-naive HCWs) ระหว่างการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน 4 สัปดาห์กับ 10 หรือ 12 สัปดาห์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบอื่น ๆ เช่น ระหว่าง 8 สัปดาห์กับ 12 สัปดาห์ ตลอดจนไม่มีความแตกต่างสำหรับเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน (ภาพประกอบ S2A) อาสาสมัครจำนวนหนึ่งที่ได้รับการระบุมาก่อนหน้านี้ว่าไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) ตอนเริ่มต้น (baseline) โดยอ้างอิงผลการตรวจทางเซรั่มวิทยา (serology) และประวัติการติดเชื้อ (จำนวน 14 คนจากทั้งหมด 138 คน หรือ 10.1%) มีการแสดงออกของปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโปรตีน N ในการตรวจชนิด MSD immunoglobulin G (IgG) assay ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ซึ่งทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าการติดเชื้อ/รับสัมผัสเชื้อในช่วงระหว่างการสังเกต เราได้ทดสอบว่าการนำเอาอาสาสมัครเหล่านี้ในกลุ่มผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนซึ่งมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน N (seroconvert to anti-N) ออกไป จะมีผลกระทบต่อผลที่ได้หรือไม่ (ภาพประกอบ S2B) และพบว่าปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับสูง ๆ ของแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน ส่วนหนามของไวรัสและต่อ RBD ยังคงมีนัยสำคัญ

A Antibody responses : IgG – vaccine dosing intervals



B Antibody responses : IgG – MSD sensitivity threshold analysis



ภาพประกอบ ส2. ผลของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน (vaccine dosing interval) และ MSD sensitivity threshold ต่อปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG, ที่สัมพันธ์กับ [ภาพประกอบ 2B](#) และ [3C](#)

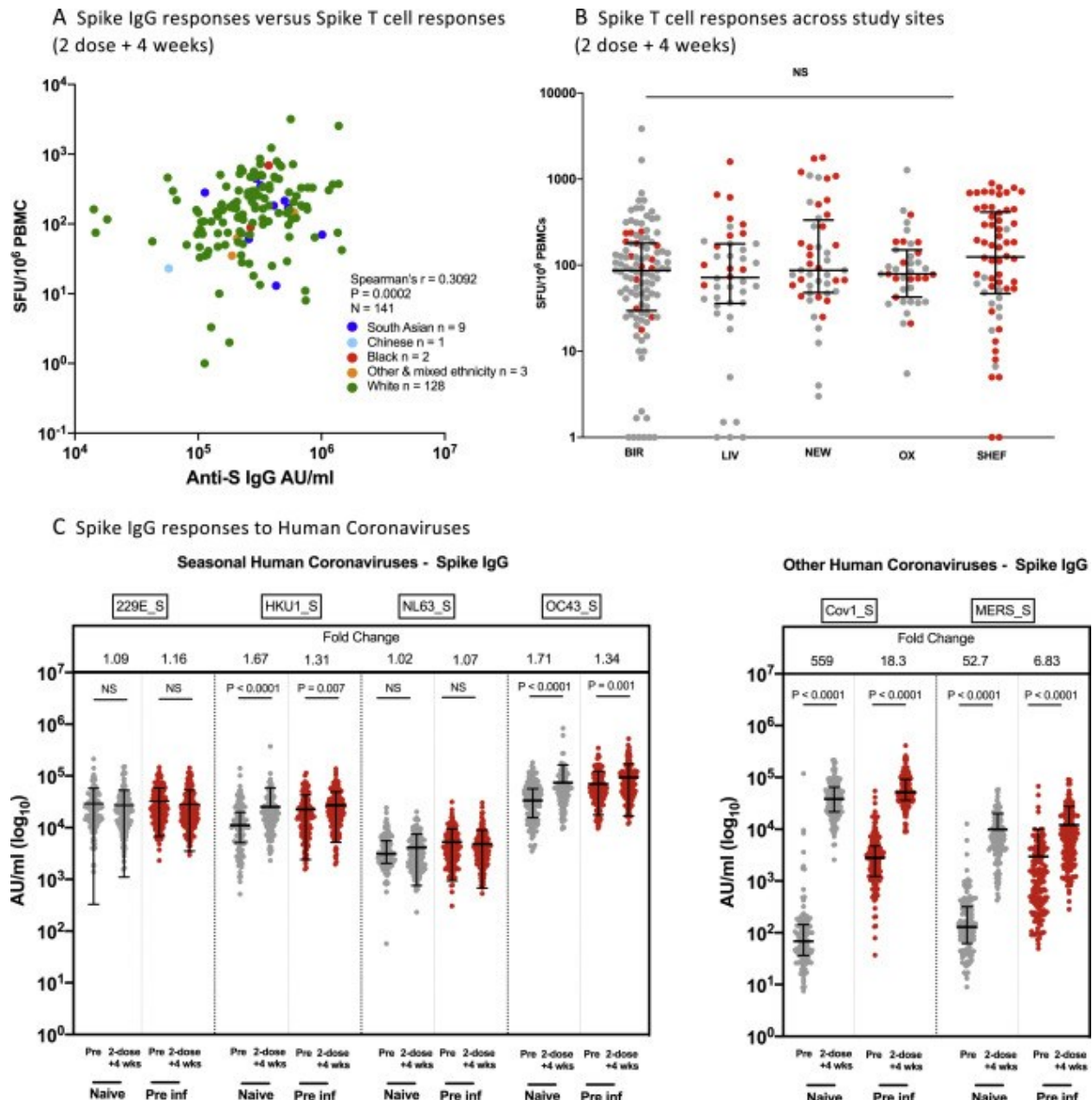
A. ผลของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่จัดแบ่งกลุ่มในช่วงทุก ๆ 4 สัปดาห์ ต่อปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (สัญลักษณ์สีเทา) และในอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน (สัญลักษณ์สีแดง). ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ได้รับการตรวจวัดในเซรัม ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การตรวจวิธี multiplexed MSD immunoassays และแสดงในหน่วย Arbitrary Units/ml (AU/ml). แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range). การเปรียบเทียบชนิดไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ระหว่างกลุ่มทำโดยใช้การทดสอบแบบ Mann-Whitney test.

B. ผลของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ "สั้น" หรือแบบยืดขยายเวลา "ยาว" ออกไป ต่อปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนาม ต่อ RBD และต่อโปรตีน N ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (สัญลักษณ์สีเทา) และในอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน (สัญลักษณ์สีแดง)

ภายหลังจากที่นำเอาอาสาสมัครที่มีปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีน N สูงกว่า sensitivity threshold (3,874 AU/ml) ออกไป. ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ได้รับการตรวจวัดในเซรัม ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การตรวจวิธี multiplexed MSD immunoassays และแสดงในหน่วย Arbitrary Units/ml (AU/ml). แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range). การเปรียบเทียบชนิดไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ระหว่างกลุ่มทำได้โดยใช้การทดสอบแบบ Mann-Whitney test. เส้นประในแนวนอนหมายถึงค่า sensitivity threshold ของแต่ละการตรวจซึ่งอ้างอิงยึดถือตามเซรัมช่วงก่อนหน้าที่จะมีการแพร่ระบาดของโรค.

ปฏิกิริยาการตอบสนองของ B cell ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 แสดงถึงการกระตุ้นและการดำรงรักษาให้คงไว้ในช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไประหว่างวัคซีนเข็มแรกและเข็มที่ 2 ในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน ([ภาพประกอบ 3D](#)) และจริง ๆ ที่เดียวขนาดปริมาณของปฏิกิริยาการตอบสนองของ B cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจน ที่ 10 สัปดาห์หลังจากที่ได้รับวัคซีนเข็มแรกในกลุ่มที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไปมีระดับสูงกว่าที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกในกลุ่มที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ “สั้น” ปกติ ซึ่งเป็นการสนับสนุนการพัฒนาของ B cell ที่ต่อเนื่องเกินเลย 4 สัปดาห์ภายหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 เราพบว่าขนาดของปฏิกิริยาการตอบสนองของ B cell มีการเพิ่มสูงขึ้นถึงเกือบ 7 เท่าตัวสำหรับกลุ่มที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบ “สั้น” ปกติ พร้อมกันกับระดับแอนติบอดีที่สูงขึ้น

การยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนไม่ได้นำไปสู่การกระตุ้นที่มากขึ้นของปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ภายหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ([ภาพประกอบ 3E](#)) จริงทีเดียวถึงแม้ว่าสำหรับอาสาสมัครผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อนเราไม่พบความแตกต่าง แต่สำหรับอาสาสมัครผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนเราพบว่าปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell มีการลดต่ำลงเล็กน้อยพอประมาณในหลายสัปดาห์หลังจากที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างของวัคซีนออกไป เมื่อเปรียบเทียบกับเว้นระยะห่างวัคซีนแบบ “สั้น” ปกติ ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อแอนติเจนควบคุม (control antigens) (CEF – ไวรัส cytomegalovirus ไวรัส Epstein-Barr และไวรัสไข้หวัดใหญ่) ไม่ได้แสดงผลกระทบจากการสัมผัสเชื้อมาก่อนหน้า หรือจากข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน ในขณะที่ปฏิกิริยาการตอบสนองที่จำเพาะต่อโปรตีน M และโปรตีน N ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ล้วนได้รับผลกระทบตามที่เราได้คาดการณ์ไว้ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสัมผัสเชื้อมาก่อนหน้าแต่มีการคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา มีสหสัมพันธ์อย่างอ่อน ๆ ระหว่างแอนติบอดีชนิดที่ยึดจับกับโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ (binding Abs) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยที่ไม่พบว่ามีผลกระทบที่ชัดเจนจากชาติพันธุ์ที่รายงาน ([ภาพประกอบ S3A](#)) ถึงแม้ว่าการศึกษาวินิจฉัยนี้ได้รับการยกเว้น (underpowered) สำหรับการประเมินทางด้านชาติพันธุ์อย่างเต็มรูปแบบ เราได้ใช้โมเดลการถดถอยเชิงเส้นทั่วไป (generalized linear regression models) เพื่อยืนยันสิ่งที่พบเหล่านี้ภายหลังจากมีการปรับสำหรับอายุ เพศ และสถานะของการติดเชื้อมาก่อนหน้า ([ตาราง 3](#)) เราไม่พบผลกระทบจากชาติพันธุ์ในชุดข้อมูล (dataset) ที่มีการลดลง ซึ่งมีข้อมูลน้อย (n = 277; [ตาราง S2](#))



ภาพประกอบ s3. ผลกระทบจากชาติพันธุ์ (ethnicity) และจากสถานที่ที่ศึกษาวิจัย (study site) ต่อปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG และ T cells และการเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG กับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อัลฟาและสายพันธุ์เบต้าที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในผู้ที่ไม่มีประวัติติดเชื้อมาก่อนและผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า ที่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบสลับปกติหรือแบบยืดขยายออกไป. Data points แสดงเป็นสีตามกลุ่มชาติพันธุ์. ใช้สหสัมพันธ์แบบ Spearman's correlation.

A. สหสัมพันธ์ของปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN- γ ELISpot ต่อโปรตีนส่วนหนาม B และปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีนส่วนหนามในอาสาสมัคร ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในผู้ที่ไม่มีประวัติติดเชื้อมาก่อนและผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า ที่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบสลับปกติหรือแบบยืดขยายออกไป. Data points แสดงเป็นสีตามกลุ่มชาติพันธุ์. ใช้สหสัมพันธ์แบบ Spearman's correlation.

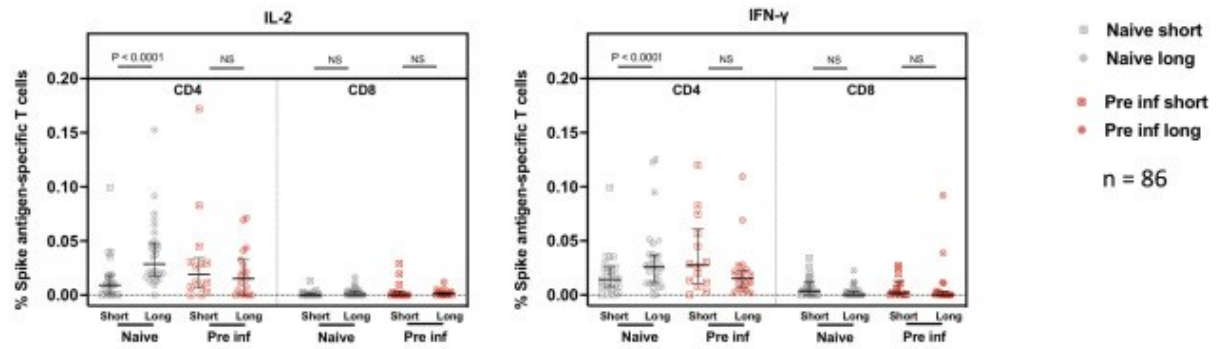
B. การเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN- γ ELISpot ต่อโปรตีนส่วนหนาม B จาก PBMCs ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในผู้ที่ไม่มีประวัติติดเชื้อมาก่อน และผู้ที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า ที่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป ใน 5 ศูนย์ (BIR: เบอร์มิงแฮม, LIV: ลิเวอร์พูล, NEW: นิวคาสเซิล, OX: อ็อกฟอร์ด, SHEF: เชฟฟิลด์). ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย spot-forming units ต่อล้าน

เซลล์ของ peripheral blood mononuclear cells (SFU/10⁶ PBMCs). การเปรียบเทียบแบบไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ข้ามระหว่าง 2 กลุ่มทำโดยใช้การทดสอบชนิด Mann-Whitney test. สัญลักษณสีเทาแสดงถึงอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน สัญลักษณสีแดงแสดงถึงอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า.

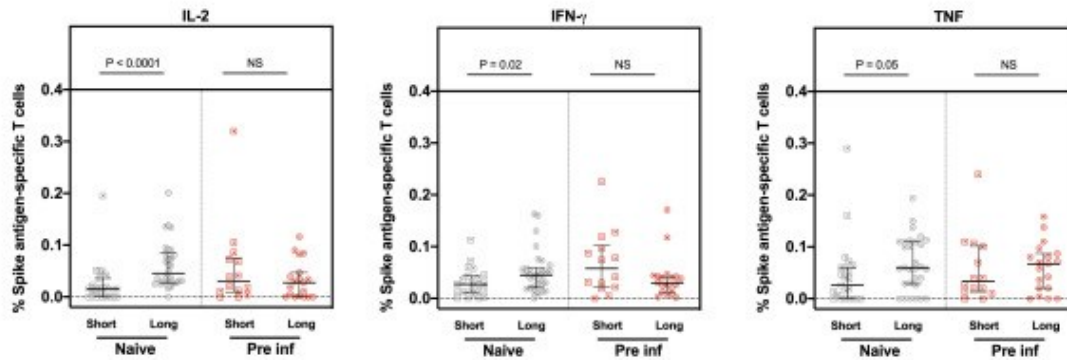
C. ปฏิกริยาการตอบสนองของ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อัลฟาและสายพันธุ์เบต้า ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (วงกลมสีเทา, n = 151) และในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า (วงกลมสีแดง, n = 169) ที่ได้รับวัคซีนตามข้อกำหนดการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไประหว่างวัคซีนแต่ละเข็ม. ปฏิกริยาการตอบสนองของ IgG ได้รับการตรวจวัดในเซรัมที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired sera) ก่อนการได้รับวัคซีนและที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (1-dose +4 wks) โดยใช้การตรวจชนิด multiplexed MSD immunoassays. ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย Arbitrary Units/ml (AU/ml). แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range). การเปรียบเทียบชนิดไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ระหว่างกลุ่มทำโดยใช้การทดสอบแบบ Mann-Whitney test. ค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change values) แต่ละค่าแสดงถึงการเปรียบเทียบค่า P value ที่อยู่ข้างใต้.

ต่อจากนั้นเราได้เปรียบเทียบ functionality ของปฏิกริยาการตอบสนองของ T cell เหล่านี้ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ที่ละเอียดลึกซึ้งมากขึ้นในเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์จำนวน 86 คน โดยใช้การย้อมสีไซโตไคน์ในเซลล์ (intracellular cytokine staining - ICS) สำหรับในการตรวจวิเคราะห์ที่ว่าเราได้คัดเลือกเฉพาะอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีผลการตรวจวิธี ELISpot assays เป็นบวกเท่านั้น ซึ่งเราได้กำหนดไว้ว่ามากกว่า 40 (หน่วยเป็น spot-forming units ต่อล้านเซลล์ของ peripheral blood mononuclear cells [PBMCs]) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของการตรวจ DMSO ในกลุ่มที่มีผลการตรวจเป็นลบ (DMSO negative values) บวกกับสองเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เนื่องจากว่าในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Ogbe และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) เราสังเกตว่าประชากรความถี่ (frequency populations) ที่น้อยกว่านี้ตรวจพบได้ยากโดยวิธี flow cytometry และนอกจากนี้ก็ยังมีความไม่แน่นอนเนื่องจากจำนวนเซลล์ที่ต่ำ เราพบว่ามีความเอนเอียงที่เห็นได้ชัดเจนใน CD3⁺ T cell compartment ไปทางปฏิกริยาการตอบสนองของ CD4⁺ T cell ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสกับการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป แต่มีสมดุลมากกว่าระหว่าง CD4⁺ กับ CD8⁺ สำหรับการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ ([ภาพประกอบ 4A](#) กลยุทธ์วิธีการ gating ที่เป็นตัวแทนใน [ภาพประกอบ S4](#)) การตรวจวิเคราะห์ต่อมาแสดงให้เห็นว่าภายใน CD4⁺ compartment ปฏิกริยาการตอบสนองที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสสำหรับไซโตไคน์ทั้งหมดที่เราตรวจสอบมีระดับสูงกว่าในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนที่ใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป เมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ ในขณะที่เราสังเกตไม่พบความแตกต่างในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า ([ภาพประกอบ 4B](#)) ในทางตรงกันข้ามภายใน CD8⁺ compartment ไม่มีความแตกต่างของปฏิกริยาการตอบสนองที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ยกเว้นสำหรับปฏิกริยาการตอบสนอง CD8⁺ IFN γ ซึ่งมีระดับต่ำกว่าสำหรับอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป โดยที่ไม่สำคัญว่ามีสถานะของการติดเชื้อมาก่อนหรือไม่ก็ตาม ([ภาพประกอบ 4C](#))

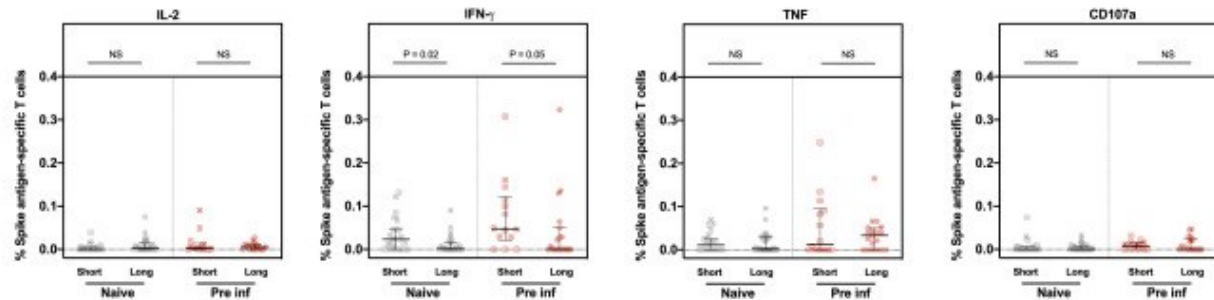
A Spike antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ proportion of total CD3⁺ T cells : Cytokine (IL-2, IFN- γ) -positive cells



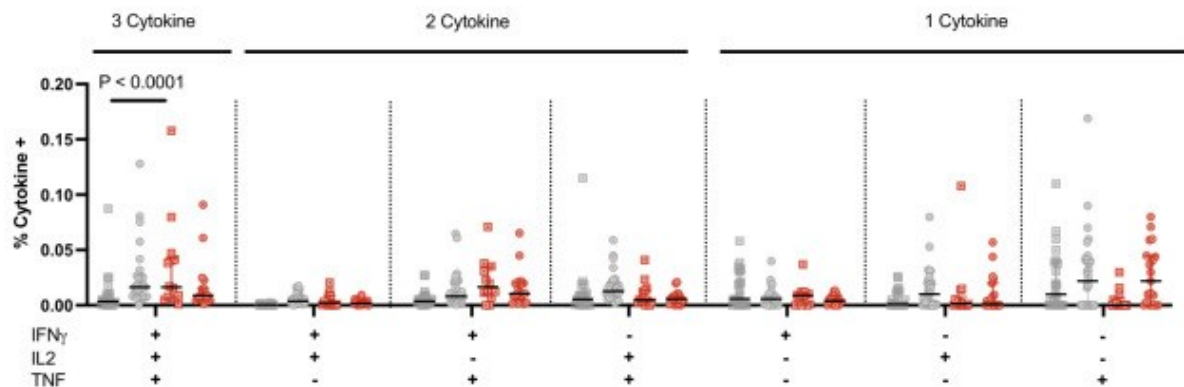
B Proportion of spike antigen-specific CD4⁺ T cells : Cytokine (IL-2, IFN- γ , TNF)



C Proportion of spike antigen-specific CD8⁺ T cells : Cytokine (IL-2, IFN- γ , TNF) -and CD107a-positive cells



D Polyfunctional expression profile of total cytokines in CD4⁺ T cells



ภาพประกอบที่ 4. การตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโดยวิธี flow cytometry

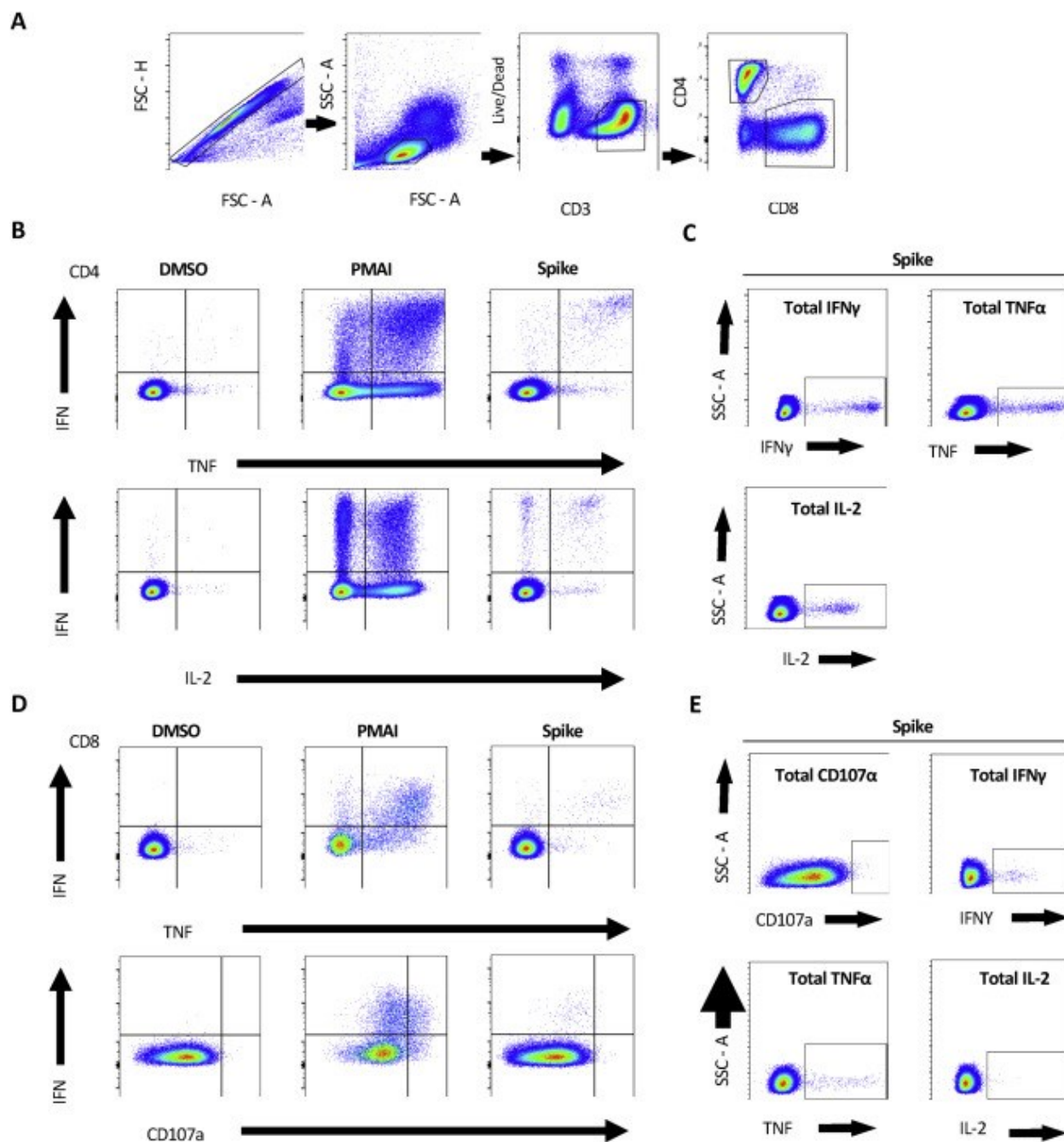
PBMCs ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) จากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมจำนวน 86 คน ที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสลับปกติหรือแบบยืดขยายออกไป ที่มีระดับปฏิกิริยาการตอบสนองของ ELISpot ที่จำเพาะต่อแอนติเจนหนามไวรัสเกิน 40 SFU/ล้านเซลล์ของ PBMCs ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ICS และวิธี flow cytometry.

(A) ประชากร T cell ที่เป็นสาเหตุของการแสดงออกของ IFN γ หรือ IL-2 ได้รับการประเมินโดยการรายงานอัตราส่วนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ IFN γ - หรือ IL-2 ในบรรดา CD4 $^{+}$ หรือ CD8 $^{+}$ cells โดยแสดงในรูปของสัดส่วนของประชากรเซลล์ CD3 $^{+}$ ที่มีชีวิตของมัน.

(B และ C) ระดับของการแสดงออกของไซโตไคน์แต่ละชนิดของ total IFN γ , IL-2, หรือ TNF ได้รับการรายงานเป็นสัดส่วนของ (B) ประชากร CD4 $^{+}$ T cell หรือ (C) CD8 $^{+}$ T cells ที่มีการเพิ่มเข้ามาของ CD107a (marker ของ cytotoxicity).

(D) Polyfunctionality ได้รับการประเมินโดยการแสดงออกของไซโตไคน์หนึ่งชนิดหรือมากกว่าใน CD4 $^{+}$ cells ที่แสดงจำนวนของไซโตไคน์ที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละกลุ่ม และยับยั้งขีดขวางแต่ละ IFN γ , IL-2, และ/หรือ TNF gated combination ที่แสดงเป็นสัดส่วนของ CD4 $^{+}$ T cells ทั้งหมด.

อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสลับปกติ, n = 23; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป, n = 30; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสลับปกติ, n = 14; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อน และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป, n = 19. แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range). การเปรียบเทียบชนิดไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ระหว่างกลุ่มทำโดยใช้การทดสอบแบบ Mann-Whitney test และการเปรียบเทียบชนิด paired comparisons ทำโดยใช้การทดสอบแบบ Wilcoxon matched pairs signed rank test. วงกลมสีเทาหมายถึงผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (naive); วงกลมสีแดงหมายถึงผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน.



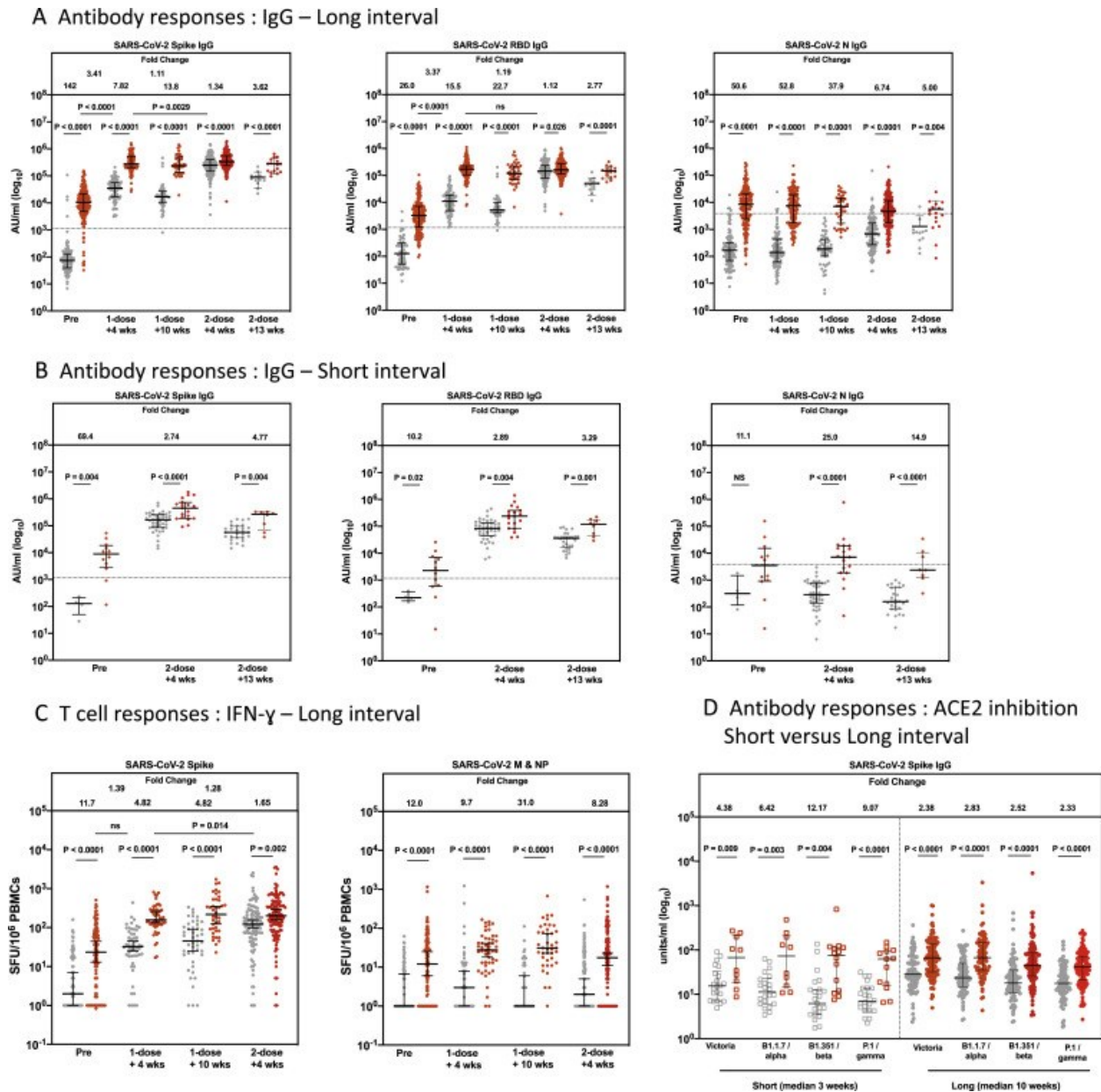
ภาพประกอบ S4. กลยุทธ์วิธีการ gating ที่เป็นตัวแทนสำหรับการวิเคราะห์แบบ ICS analysis, สัมพันธ์กับ [ภาพประกอบที่ 4](#)

(A) คำอธิบายเกี่ยวกับ gates จากซ้ายไปขวาแสดงให้เห็นถึง gates ตามลำดับที่ใช้ในการวิเคราะห์เบื้องต้นของอาสาสมัคร (subject) แต่ละคน. Cell doublets ถูกนำออกไปโดยใช้พารามิเตอร์ชนิด forward scatter (FSC). ลิมโฟไซต์ได้รับการคัดเลือกโดย FSC และประชากร side scatter (SSC), CD3 positive แต่ไม่ใช่ประชากรที่เป็น Live-dead stained living populations ได้รับการดำเนินการต่อเพื่อที่จะแยก CD4+ และ CD8+ T Cells. (B) gates ที่ใช้ในการอธิบายความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของไซโตไคน์ต่างๆ กัน และ (C) การแสดงออกทั้งหมดของแต่ละไซโตไคน์ในเซลล์ CD4+ และ (D,E) CD8+ ตามลำดับ. DMSO และ PMAI แสดง control conditions ที่เป็นลบและบวกในการแสดงออกความแตกต่างของการแสดงออกของไซโตไคน์. สิ่งเหล่านี้ถูกใช้ในการ setting gate boundaries ในอาสาสมัคร (subject) แต่ละคนสำหรับการวิเคราะห์ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนา SARSCoV2.

การทดลองเหล่านี้เปิดเผยให้เห็นว่าอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (infection-naive) และใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไปมีปฏิกิริยาการตอบสนองของ interleukin-2 (IL-2) CD4 ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสในระดับสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ รวมทั้งปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN γ และ tumor necrosis factor (TNF) CD4⁺ ที่สูงกว่าด้วย (ภาพประกอบ 4B) ในขณะที่ปฏิกิริยาการตอบสนองของ CD8⁺ กลับตรงกันข้ามโดยที่ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN γ มีการลดต่ำลงสำหรับการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป (ภาพประกอบ 4C)

โดยการเปรียบเทียบสัดส่วนของ polyfunctional CD4⁺ T cells ระหว่างกลุ่มที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป กับกลุ่มที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ เราสังเกตพบ CD4⁺ T cell polyfunctionality ที่เพิ่มสูงขึ้นในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน ที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป เมื่อเปรียบเทียบกับที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ (ภาพประกอบ 4D) เราไม่พบความแตกต่างของ polyfunctionality ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อน การเปรียบเทียบ polyfunctionality ของ CD8⁺ T cell ถูกจำกัดโดยจำนวนที่น้อยของเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่มีปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ CD8⁺ เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์นี้ แต่ก็ได้ชี้ให้เห็นความแตกต่างที่มากมายได้ ระหว่างกลุ่ม ข้อมูล ELISpot รวมกับข้อมูล ICS แสดงให้เห็นความแตกต่างเล็กน้อยพอประมาณของปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ระหว่างข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไป กับข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ โดยที่ทั้ง 2 แบบล้วนมีการกระตุ้นและดำรงรักษาไว้ซึ่งปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ ที่แข็งแกร่งในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน และในอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบยืดขยายออกไปมีการเชื่อมโยงกับการกระตุ้นของ CD4⁺ T cells ที่หลัง IL-2 ซึ่งมีระดับสูงขึ้นในกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน รวมทั้งระดับที่ลดลงเล็กน้อยของ CD8⁺ T cells ที่หลัง IFN γ

การเปรียบเทียบระหว่างอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและที่มีการติดเชื้อมาก่อน ตลอดจนการวิเคราะห์เราสังเกตพบว่ามี ความแตกต่างของปฏิกิริยาการตอบสนองระหว่างอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและที่มีการติดเชื้อมาก่อน เพื่อที่จะทำความเข้าใจในเรื่องนี้ต่อไปเราจึงได้ใช้ชุดข้อมูล (dataset) ขนาดใหญ่ขึ้นของข้อมูลทั้งหมดที่มีอยู่ตลอดช่วงเวลาการศึกษาวิจัยที่ไม่ได้รับการจับคู่ (n = อาสาสมัครผู้เข้าร่วมจำนวน 589 คน) และทำการวิเคราะห์ควบคู่กันไปสำหรับปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับเซลล์และปฏิกิริยาการตอบสนองที่อาศัยสารน้ำ หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกกับหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 รวมทั้งที่ 13 สัปดาห์ (3 เดือน) หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในกรณีที่ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจยังมีอยู่ (ภาพประกอบ S5A–S5D) ที่ 4 สัปดาห์ หลังจากการฉีดวัคซีนเข็มแรก อาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อนมีข้อดีอย่างมีนัยสำคัญในส่วนของขนาดปริมาณของแอนติบอดีชนิด IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (ประมาณ 8 เท่า; ภาพประกอบ S5A) และในส่วนของปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell (ประมาณ 5 เท่า; ภาพประกอบ S5C) (ตามที่รายงานในการศึกษาวิจัยของ Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564) 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีน 2 เข็มก็ยังคงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดี และของ T cell ในระหว่างอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน กับอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน ถึงแม้ว่าขนาดปริมาณมีความชัดเจนน้อยลง (สูงถึง 3 เท่า) ในอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อนมีหลักฐานที่สอดคล้องสม่าเสมอของปฏิกิริยาการการกลบล้างฤทธิ์ (neutralization activity) ต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่น่ากังวล (variants of concern) ที่สูงกว่าจากการตรวจการยับยั้งขัดขวางการยึดจับของ RBD กับ ACE2 (ภาพประกอบ S5D) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่า “ภูมิคุ้มกันลูกผสม” (“hybrid immunity”) จากการติดเชื้อมาก่อนบวกกับการได้รับวัคซีนทำให้มี cross-reactive neutralization ที่แข็งแกร่งที่สุด



ภาพประกอบ S5. ผลของการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อนต่อขนาดปริมาณของปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG และของ T cell, สัมพันธ์กับ [ภาพประกอบที่ 2](#)

A-B. Time course ของ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนาม (S) ต่อ receptor-binding domain (RBD) และต่อ nucleocapsid (N) ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน (วงกลมสีเทา, n = 234) และอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อน ที่ได้รับวัคซีน (วงกลมสีแดง, n = 228) โดยมีการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายออกไป (A) หรือใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบสั้นปกติ (B). ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ได้รับการตรวจวัดในเซรัมที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired sera) ก่อนหน้าที่จะได้รับวัคซีน (pre) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ที่ 8 – 12 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (1-dose + 10 wks) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 และที่ 13 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 โดยใช้การตรวจแบบ multiplexed MSD immunoassays. ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย Arbitrary Units/ml (AU/ml). C. การเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN- γ ELISpot ต่อโปรตีนส่วนหนามไวรัส (วัดต่อเรีย) จากเซลล์ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) จากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน

276 คนและอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน 165 คนที่ไม่ได้รับการจับคู่ (unmatched) สำหรับช่วงก่อนหน้าที่จะได้รับวัคซีน (pre) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ที่ 8 – 12 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (1-dose + 10 wks) และที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย spot-forming units ต่อล้านเซลล์ของ PBMCs (SFU/10⁶ PBMCs). D. ผลกระทบของการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบสั้นปกติและแบบยืดขยายเวลาออกไป ต่อความสามารถของเซรั่มในการยับยั้งขัดขวางการยึดจับของ ACE2 กับโปรตีนส่วนหนามไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (วิคตอเรีย B.1.1.7 (อัลฟา) B.1.351 (เบต้า) หรือ P.1 (แกมมา) ที่ 28 วันหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. การยับยั้งขัดขวางของ ACE2 ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี multiplexed MSD assay. ข้อมูลแสดงเป็น units/ml. อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบสั้นปกติ: n = 23; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนและใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายเวลาออกไป: n = 94; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนและใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบสั้นปกติ: n = 14; อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่มีการติดเชื้อมาก่อนและใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายเวลาออกไป: n = 119.

แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range). การเปรียบเทียบชนิดไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ระหว่างกลุ่มทำได้โดยใช้การทดสอบแบบ Mann-Whitney test. ค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change values) แต่ละค่าแสดงถึงการเปรียบเทียบค่า P value ที่อยู่ข้างใต้. เส้นประในแนวนอนหมายถึงค่า cut-offs ของแต่ละการตรวจซึ่งอ้างอิงยึดถือตามเซรั่มช่วงก่อนหน้าที่จะมีการแพร่ระบาดของโรค. ข้อมูลจากปฏิบัติการการตอบสนองของก่อนหน้าได้รับวัคซีนในอาสาสมัครจำนวน 51 คน และจากปฏิบัติการการตอบสนองที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกในอาสาสมัครจำนวน 51 คนได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ก่อนหน้านี้ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)).

เมื่อเร็ว ๆ นี้เราได้ไปถึงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงระยะห่างจากการติดเชื้อมาก่อนหน้าจนกระทั่งถึงการได้รับวัคซีนเข็มแรกกับขนาดปริมาณของปฏิบัติการการตอบสนองของแอนติบอดีต่อวัคซีนเข็มแรกในผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน ความสัมพันธ์นี้แสดงให้เห็นว่าการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายเวลาออกไปมีความสัมพันธ์กับปฏิบัติการการตอบสนองของ IgG ที่แข็งแรงขึ้นต่อวัคซีนเข็มแรก ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) การที่เราพบว่าระดับของ IgG ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายออกไปในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนเป็นหลักฐานว่าการเว้นช่วงระยะห่างระหว่างการสัมผัสกับแอนติเจนแต่ละครั้งให้ยืดขยายออกไปสนับสนุนให้เกิดการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในระดับที่สูงขึ้น

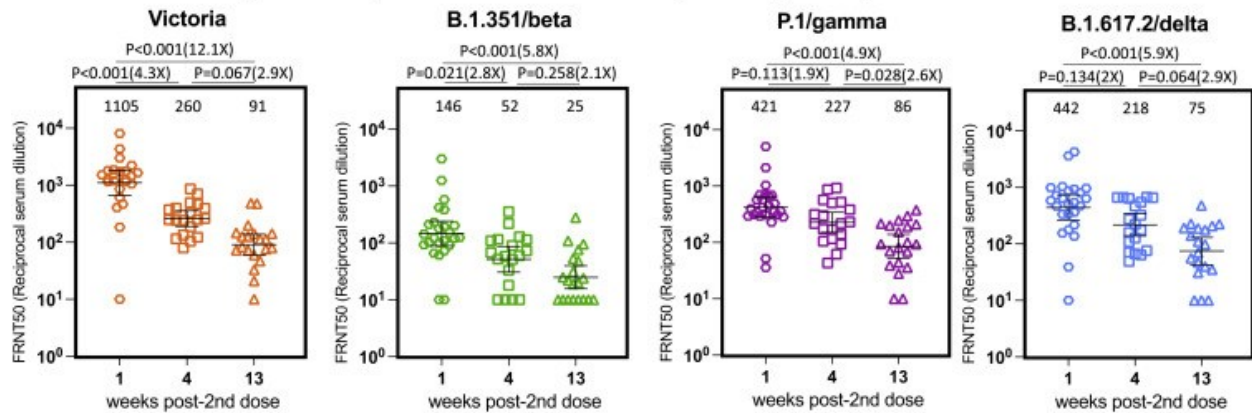
วัคซีนชนิด BNT162b2 จำนวน 2 เข็มกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนหนามของ betacoronaviruses สายพันธุ์อื่น ๆ โดยการกระตุ้นใหม่ ๆ ของ IgG ต่อไวรัสโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS) และไวรัสโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (MERS) ([ภาพประกอบ S3C](#)) และการกระตุ้น baseline IgG ต่อ betacoronaviruses ตามฤดูกาลในมนุษย์คือ HKU1 และ OC43 แต่ไม่มีการกระตุ้นที่มีนัยสำคัญของแอนติบอดี baseline ต่อ alphacoronaviruses ตามฤดูกาลในมนุษย์คือ NL63 และ 229E

พลวัตของปฏิบัติการการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังการกระตุ้น

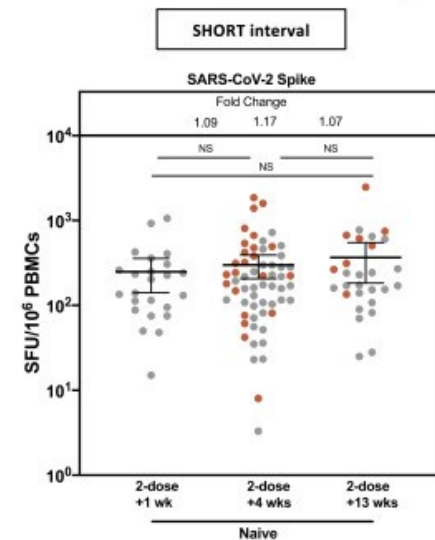
ต่อจากนั้นเราได้พูดถึงพลวัตของปฏิบัติการการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหลังได้รับวัคซีนกระตุ้นเข็มที่ 2 จากการติดตามปฏิบัติการการตอบสนองของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAb) หลังจากใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบสั้นปกติ เราได้พบระดับสูงสุดที่ 1 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 และการลดลงอย่างชัดเจนในเวลาต่อมาของไคเตอร์แอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAb) ต่อวิคตอเรียและไวรัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ ในห้วงเวลาต่อมา (ที่ 4 สัปดาห์และ 13 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในอาสาสมัครทั้งหมดที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน; [ภาพประกอบ 5A](#)) การลดลงสำหรับสายพันธุ์วิคตอเรียระหว่างสัปดาห์ที่ 1 กับสัปดาห์ที่ 4 มีประมาณ 4 เท่า เปรียบเทียบกับประมาณ 3 เท่าระหว่างสัปดาห์ที่ 4 กับสัปดาห์ที่ 13

ดังนั้นการลดลงในช่วง 3 เดือนจึงมีอยู่ราว ๆ 12 เท่า ควรมีการศึกษาวิจัยในอนาคตเพื่อประเมินความทนทาน (durability) ของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบยืดขยายออกไป

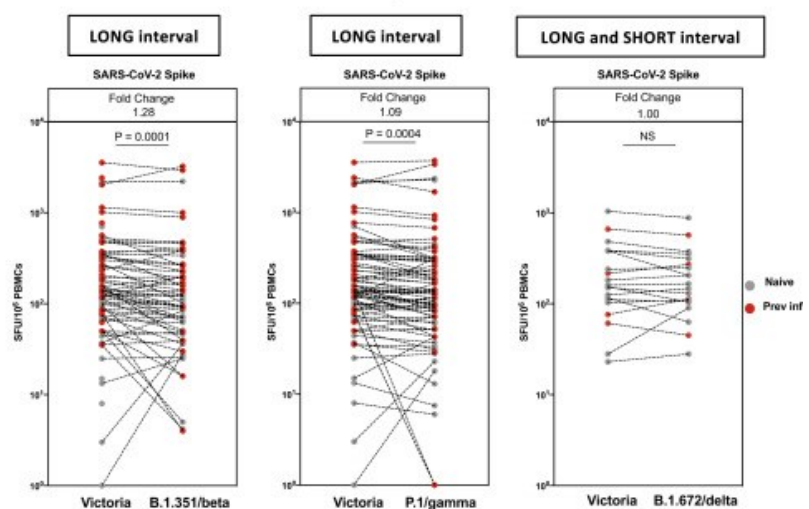
A Neutralizing antibody titers - Short interval; naïve participants



B T-cell responses : IFN- γ



C T-cell responses : IFN- γ



ภาพประกอบที่ 5. การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแต่ละเข็มแบบสั้นปกติกับวัคซีนชนิด BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) กระตุ้นให้เกิดโปรไฟล์ไคเตอร์แอนติบอดีชนิดกลางฤทธิ์ (NAb) ที่ชัดเจนต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่น่ากังวล (variants of concern) ซึ่งมีการลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่ปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ยังมีการดำรงรักษาไว้

(A) ไคเตอร์แอนติบอดีชนิดกลางฤทธิ์ (NAb) ที่ตรวจวัดโดยวิธี FRNT ต่อ Victoria isolate ตอนระยะแรก ๆ ของการแพร่ระบาด, B.1.351 (เบต้า), P.1 (แกมมา), และ B.1.617.2 (เดลต้า) จากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนในสัปดาห์ที่ 1 (n = 25), สัปดาห์ที่ 4 (n = 19), และสัปดาห์ที่ 13 (n = 20) หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ในกลุ่มที่ใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ (ค่ากลางมัธยฐานของระยะห่างวัคซีนแต่ละเข็มเท่ากับ 3.3 สัปดาห์; พิสัยเท่ากับ 2.4 – 4.3). แกน x แสดงระยะเวลาเป็นสัปดาห์นับจากได้รับวัคซีน. แสดงค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของ neutralizing titers ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95%. Neutralization titers ที่ 1 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (วัดต่อเชื้อ, B.1.351, P.1, และ B.1.617.2) และที่ 4 สัปดาห์กับ 10 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (วัดต่อเชื้อ และ B.1.617.2) ได้รับการรายงานก่อนหน้านี้ (Dejnirattisai และคณะ, พ.ศ. 2564; Liu และคณะ, พ.ศ. 2564; Supasa และคณะ, พ.ศ. 2564; Zhou และคณะ, พ.ศ. 2564).

(B) การเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN γ ELISpot ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสสายพันธุ์คัดเลือกร่วมจาก PBMCs ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) จากอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน 43 คน และอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน 26 คนที่ได้รับวัคซีนโดยมีการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบสลับปกติ ที่ 1 สัปดาห์ 4 สัปดาห์ และ 13 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2.

(C) การเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตอบสนองของ IFN γ ELISpot จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) จากอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน 40 คน และอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อนจำนวน 42 คนที่ได้รับการจับคู่ (matched) สำหรับปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ S Victoria, spike B.1.35/เบต้า, และ S P.1/แกมมา. อาสาสมัครได้รับวัคซีนโดยใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยาย และเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2. ข้อมูลแสดงเป็นหน่วย spot forming units (SFU) ต่อล้านเซลล์ของ PBMCs.

จุดเวลา (time points) สำหรับ (A) ได้รับการเปรียบเทียบโดยใช้ Kruskal-Wallis non-parametric test และ Dunn's multiple comparisons tests. ค่า p values แสดงไว้เหนือเส้นเชื่อม และการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold changes) ในวงเล็บ. แท่งต่าง ๆ (bars) แสดงถึงค่ากลางมัธยฐานที่มีค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range) สำหรับ (B) และ (C). จุดเวลา (time points) ได้รับการเปรียบเทียบโดยใช้ two-tailed Mann-Whitney tests สำหรับ (A) และ (B) และการเปรียบเทียบชนิดจับคู่ (paired comparisons) ทำโดยใช้ Wilcoxon matched pairs signed rank test สำหรับ (C) ที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change values) ซึ่งแสดงถึงการเปรียบเทียบค่า p value ที่อยู่ข้างใต้. วงกลมสีเทาหมายถึงอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน วงกลมสีแดงหมายถึงอาสาสมัครที่มีการติดเชื้อมาก่อน.

เราสังเกตเห็นการดำรงรักษาไว้ซึ่งปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ([ภาพประกอบ 5B](#)) ปฏิกิริยาการตอบสนองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการสูญเสียของปฏิกิริยาอาการที่น้อยมากแต่นัยสำคัญทางสถิติต่อ peptide pools จาก sequence ของโปรตีนส่วนหนามของไวรัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ คือสายพันธุ์กลายพันธุ์เบต้า (ต่ำลง 1.18 เท่า, $p = 0.0001$) และแกมมา (ต่ำลง 1.1 เท่า, $p = 0.0016$) เมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type sequence แต่ไม่พบการสูญเสียของปฏิกิริยาอาการต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์เดลต้า (fold change = 1.00, $p = 0.2058$) ([ภาพประกอบ 5C](#))

ข้อมูลเหล่านี้เน้นย้ำถึงข้อมูลที่พบหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก กล่าวคือมีการลดลงอย่างชัดเจนของแอนติบอดีในกระแสเลือดในห้วงระยะเวลา 3 เดือน โดยที่มีการดำรงรักษาอย่างแข็งแรงไว้ซึ่งปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell นี่เป็นช่วงระยะเวลาที่มีการศึกษากันเป็นอย่างดีในการศึกษาวิจัยทางคลินิก ซึ่งสังเกตพบว่าการป้องกันที่แข็งแกร่งหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ([Polack และคณะ, พ.ศ. 2563](#))

การอภิปราย (Discussion)

การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาเพื่อกระตุ้นวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ได้รับการริเริ่มขึ้นโดยอยู่บนพื้นฐานของการแปลความหมายของข้อมูลจากการศึกษาวิจัยทางคลินิกสำหรับวัคซีนชนิด BNT162b2 และการคาดการณ์ล่วงหน้าจากวัคซีนของ AstraZeneca ตลอดจนวัคซีนสำหรับเชื้ออื่น ๆ แต่ไม่มีชุดข้อมูลที่แข็งแกร่งสำหรับวัคซีนชนิด BNT162b2 ในการสนับสนุนภูมิคุ้มกันวิทยาหรือประสิทธิผลทางคลินิกในสถานการณ์จริง ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ให้ชุดข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทางเซรัมวิทยาและของ T cell ที่กว้างขวางเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่พบในโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ซึ่งเป็นโครงการแม่ ปฏิบัติการตอบสนองทางเซรัมวิทยาต่อวัคซีนชนิด BNT162b2 หนึ่งหรือสองเข็มมีการลดลงเมื่อเวลาผ่านไป และมีระดับสูงขึ้นหลังจากที่ใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไปในอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อน เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีน 3 – 4 สัปดาห์ที่ได้รับการทดสอบใน licensing trials อย่างที่ได้รายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ ([Dan และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Goel และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Turner และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) เราพบปฏิบัติการตอบสนองของ B cell ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสที่ได้รับการดำรงรักษาเป็นอย่างดี ซึ่งตรงกันข้ามกับปฏิบัติการตอบสนองของแอนติบอดี และเราพบว่าปฏิบัติการตอบสนองของ B cell มีการเพิ่มสูงขึ้นราว ๆ 7 เท่าในกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนที่ใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไป ปฏิบัติการตอบสนองของ T cell ได้รับการดำรงรักษาเป็นอย่างดีหลังจากได้รับวัคซีน 1 เข็มและ 2 เข็ม ปฏิบัติการตอบสนองของ T cell ที่คงอยู่ต่อเนื่องจาก 1 ถึง 10 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกในกลุ่มที่มีการเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไปตรงกันข้ามกับการลดลงของ T cells ที่เราและผู้วิจัยคนอื่น ๆ ([Dan และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Tomic และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) ได้เคยรายงานไว้หลังจากมีการติดเชื้อในธรรมชาติ นอกจากนี้การดำรงรักษาไว้ซึ่งปฏิบัติการตอบสนองของ T cell จาก 1 ถึง 13 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ก็ยังตรงกันข้ามกับการศึกษาวิจัยวัคซีนในระยะยาวอื่น ๆ ซึ่งปฏิบัติการตอบสนองของ T cell ขึ้นสูงสุดสูงสุดที่ 1 สัปดาห์หลังการกระตุ้นด้วยวัคซีนเข็ม 2 ([Esposito และคณะ, พ.ศ. 2563](#); [Swadling และคณะ, พ.ศ. 2557](#); [Venkatraman และคณะ, พ.ศ. 2562](#)) ปฏิบัติการตอบสนองของ T cell มีการลดลงน้อยมาก ๆ หลังจากที่ใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีนแบบยืดขยายเวลาออกไปเมื่อตรวจวัด T cell effector function โดยวิธี ELISpot assay โดยที่ปฏิบัติการตอบสนองของ IL-2, IFN γ , และ TNF CD4 $^{+}$ มีการเพิ่มสูงขึ้น และปฏิบัติการตอบสนองของ IFN γ CD8 $^{+}$ ลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้การเว้นช่วงระหว่างของวัคซีน 3 – 4 สัปดาห์ ควรมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องต่อไปเมื่อกลุ่มนี้ผ่านไปถึง 6 เดือนหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 เพื่อประเมินว่า variation ของ T cell functionality ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 จะมีการพัฒนาเปลี่ยนไปมีความแตกต่างของความจำที่คงอยู่ต่อเนื่อง (sustained memory) หรือไม่

ข้อมูลจากโครงการการศึกษาวิจัยทางคลินิกในการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ได้ให้หลักฐานที่ชัดเจนของผลในการป้องกันของวัคซีนเข็มแรกในช่วงระยะเวลาที่ยืดออกไปต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาที่กำลังแพร่ระบาด โครงการการศึกษาวิจัยทางคลินิกในการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ตั้งอยู่บนพื้นฐานของการตรวจคัดกรองที่มีการเก็บข้อมูลไปข้างหน้า (prospective screening) สำหรับการติดเชื้อ มากกว่าที่จะเป็นการตรวจเชิงรับ (reactive testing) ที่อยู่บนพื้นฐาน

ของอาการต่าง ๆ แต่เพียงอย่างเดียวเท่านั้น และดังนั้นจึงเป็นการวัดที่แข็งแกร่งของระดับการป้องกัน จำนวนของผู้ที่ไม่ได้รับวัคซีนมีการลดลงในช่วงระยะเวลาของการศึกษาวิจัยนี้ ซึ่งนำไปสู่ช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval) ที่กว้างสำหรับค่าประมาณของประสิทธิภาพ แต่ก็ไม่มีหลักฐานของการลดลงในช่วง 3 เดือนแรก และถ้ามีหลักฐานก็หมายถึงแนวโน้มในการเพิ่มการป้องกันซึ่งคงอยู่ต่อเนื่องหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยวัคซีนเข็มที่ 2

การป้องกันในช่วงระยะเวลาที่ยืดออกไประหว่างวัคซีนแต่ละเข็ม และจริง ๆ แล้วหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยวัคซีนเข็มที่ 2 อาจจะได้มาจากตัวกลางต่าง ๆ (a range of mediators) ซึ่งรวมทั้งแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) และ effector T cells ในกระแสเลือดตามที่เราได้ตรวจวัด แต่ก็ยังมีปัจจัยต่าง ๆ มากมายที่นอกเหนือไปจาก peripheral blood ที่เราไม่ได้ตรวจวัด มีความเป็นไปได้ที่จะมีองค์ประกอบที่แข็งแกร่งของการป้องกันที่มีปฏิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากเยื่อเมือกเป็นสื่อกลาง รวมทั้ง local IgA และ IgG (Fröberg และ Diavatopoulos, พ.ศ. 2564) รวมทั้ง resident memory T cells ในทางเดินหายใจ (Niesl และคณะ, พ.ศ. 2564) ทั้งนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงถึงปฏิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีที่นอกเหนือไปจากการทำหน้าที่ลบล้างฤทธิ์ (neutralizing function) ต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 หลังการติดเชื้อและหลังจากได้รับวัคซีน (Barrett และคณะ, พ.ศ. 2564; Bartsch และคณะ, พ.ศ. 2564; Tomic และคณะ, พ.ศ. 2564) การสังเกตที่น่าสนใจอื่น ๆ ซึ่งสนับสนุนบทบาทของ T cells ในการป้องกันมาจากการวิเคราะห์ในบริบทของการแพร่ระบาดของสายพันธุ์กลายพันธุ์เบต้าในประเทศแอฟริกาใต้ (Moore และคณะ, พ.ศ. 2564) ปฏิริยาการตอบสนองของ T cell ไม่ได้รับผลกระทบโดยรวมมากนักจากสายพันธุ์กลายพันธุ์อุบัติใหม่ ตรงกันข้ามกับแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) ซึ่งแสดงให้เห็น cross-reactivity ที่ไม่ตึงนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสายพันธุ์กลายพันธุ์เบต้า ดังนั้นประสิทธิภาพในการป้องกันของวัคซีน เช่นวัคซีนชนิด Ad26 ในการศึกษาวิจัยในประเทศแอฟริกาใต้จึงได้รับการตั้งสมมติฐานว่ามีความเชื่อมโยงสัมพันธ์กันกับภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์ ข้อมูลอื่น ๆ ที่เป็นการศึกษาบทบาทเชิงสัมพันธ์ของแอนติบอดีและ T cells ในการป้องกันมาจากการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองที่เกี่ยวข้องกับลิงกอโมมากกว่า ซึ่งการพร่องของ CD8⁺ T cells ในลิงแม็กแคค (macaques) ในระยะพักฟื้นจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มีผลต่อภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติต่อการติดเชื้อซ้ำ (re-challenge) เมื่อระดับของแอนติบอดีลดลง (McMahan และคณะ, พ.ศ. 2564) สิ่งที่เกิดจากการสังเกตที่มีนัยสำคัญมากที่สุดของการศึกษาวิจัยนี้ก็คือการได้รับวัคซีนเข็มกระตุ้นหลังจากมีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดยาวออกไป ได้นำไปสู่ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ที่ได้รับการดำรงรักษาไว้ มีผลที่ชัดเจนต่อปฏิริยาการตอบสนองต่อโปรตีนส่วนหนามไวรัสพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (NAbs) เช่นที่พบหลังจากมีการใช้การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดยาวออกไปกับวัคซีนชนิด AZD1222 ของ AstraZeneca (Voysey และคณะ, พ.ศ. 2564) แต่มีการลดลงเล็กน้อยพอประมาณของปฏิริยาการตอบสนองของ ELISpot ที่ผลิต IFN γ เมื่อเปรียบเทียบกับที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ ถึงแม้ว่าความแตกต่างของปฏิริยาการตอบสนองของ T cell จะมีน้อยมาก แต่มันก็สามารถทำซ้ำได้ (reproducible) โดยใช้การตรวจทดสอบต่าง ๆ กัน และยังพบในการศึกษาวิจัยในกลุ่มผู้สูงอายุในสหราชอาณาจักรอีกด้วย (Parry และคณะ, พ.ศ. 2564) ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ และข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปส่งผลให้เกิดการกระตุ้นปฏิริยาการตอบสนองของ T cell อย่างมากมายเป็นรูปธรรม การฉีดวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติทำให้เกิดปฏิริยาการตอบสนองของ T cell ที่ผลิต IFN γ สูงกว่าเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกันกับ effector functions ที่เป็นผลมาจาก

เซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ ในขณะที่การฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายระยะห่างระหว่างแต่ละเข็มออกไปทำให้เกิดฟีนไทป์ที่ถูกชมโดย CD4⁺ ที่มีการผลิต IL-2 ที่เด่นชัดต่อโปรตีนส่วนหางของไวรัส การศึกษาวิจัยจากกระทรวงสาธารณสุขของประเทศอังกฤษ (PHE) ได้ยืนยันว่าแอนติบอดีมีระดับสูงขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนที่มีการยืดขยายระยะห่างระหว่างแต่ละเข็มออกไป เมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ และเป็นหลักฐานชิ้นแรกของประสิทธิผลที่สูงของวัคซีนสำหรับการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไป ([Amirthalingam และคณะ, พ.ศ. 2564](#))

อย่างที่คุณเขียนอธิบาย มีความเป็นไปได้ว่ายังคงมีปัจจัยรบกวนที่หลงเหลือตกค้างอยู่ระหว่างกลุ่มต่าง ๆ และควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต ในขณะนี้ยังไม่มีปัจจัยของความเชื่อมโยงสัมพันธ์กันที่เป็นที่ตกลงยอมรับกันของการป้องกัน แต่ก็มี การบอกเป็นนัยว่าในกรณีของการศึกษาวิจัยวัคซีนชนิด AZD122 ระดับเฉลี่ยที่ 40,923 arbitrary units (a.u.) /mL ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 สำหรับ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหางของไวรัสจากการตรวจด้วยวิธี MSD assay ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ซึ่งเทียบเท่ากับแอนติบอดีชนิดที่ยึดจับกับโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ (binding Ab) จำนวน 264 หน่วย (BAUs)/mL โดยใช้มาตรฐานระหว่างประเทศขององค์การอนามัยโลกมีความสัมพันธ์กับการป้องกันในระดับ 80% จากการติดเชื้อที่มีอาการสำหรับประชากรผู้ที่ได้รับวัคซีนตามวิธีการเว้นระยะห่างเช่นนั้น ([Feng และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) แต่อย่างไรก็ตามนี้ เป็นการป้องกันต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาเสียเป็นส่วนใหญ่ ระดับเฉลี่ยสำหรับทุกกลุ่มในการศึกษาวิจัยของเราล้วนสูงเกิน ค่า threshold นี้ สอดคล้องกับในการศึกษาวิจัยอื่น ๆ ซึ่งรายงานว่าระดับของแอนติบอดีมีการเพิ่มสูงขึ้นหลังได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 จำนวน 2 เข็มเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนชนิด AZD122 ([Liu และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) ปฏิกริยาการตอบสนองของ CD4⁺ helper T cell ที่ได้รับการกระตุ้นชักนำจากวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดยาวออกไป ทำให้เกิดความเข้าใจในข้อมูลเชิงลึกในกลไกที่เป็นไปได้ต่อการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี ด้วยเหตุว่า IL-2 ได้ให้ความช่วยเหลือที่สำคัญสำหรับ B cells ในการพัฒนาเป็น plasmablasts ([Hipp และคณะ, พ.ศ. 2560](#); [Le Gallou และคณะ, พ.ศ. 2555](#)) ประโยชน์ที่ได้รับจากการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดยาวออกไประหว่างวัคซีนแต่ละเข็มพบในวัคซีนชนิดอื่น ๆ จากการศึกษาวิจัยในหนูทดลองและในมนุษย์ ซึ่งการฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้นตั้งแต่เนิ่น ๆ ทำให้เกิด T cells ที่ทำหน้าที่จำเพาะ (terminally differentiated) และ effector T cells ในจำนวนที่สูงกว่า ในขณะที่การฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้นช้ากว่าช่วยส่งเสริมการขยายตัวของ T cell ที่มีประสิทธิภาพและการคงอยู่ของ memory cell ในระยะยาวเพิ่มมากขึ้น ([Capone และคณะ, พ.ศ. 2563](#); [Steffensen และคณะ, พ.ศ. 2556](#)) ดังนั้นการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายออกไประหว่างวัคซีนแต่ละเข็มในผู้ที่ไม่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน อาจจะช่วยให้ T cells ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหางของไวรัสสามารถเปลี่ยนสภาพเซลล์ได้อย่างเต็มที่ (fully differentiate) กลายเป็น memory T cells ที่มีปฏิกริยาตอบสนองต่อการรับสัมผัสซ้ำกับโปรตีนส่วนหางของไวรัสได้อย่างเหมาะสมที่สุด ที่น่าสนใจก็คือการยืดขยายช่วงเวลาระหว่างการติดเชื้อก่อนหน้านี้และการฉีดวัคซีนเข็มแรก (prime) ในกลุ่มที่มีการรับสัมผัสเชื้อมาก่อนหน้าก็ยังนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันที่เป็นสารน้ำ (humoral immunity) ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#))

เนื่องจากว่าการได้รับวัคซีนเข็มแรกในผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อนเป็นการกระตุ้นอย่างมีประสิทธิภาพสำหรับ memory pools ที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงสอดคล้องกับสิ่งที่สังเกตพบในการศึกษาวิจัยในขณะนี้ ที่ภูมิคุ้มกันที่เป็นสารน้ำ (humoral immunity) มีการเพิ่มสูงขึ้นสำหรับผู้ที่ได้รับวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายออกไปในกลุ่มที่ไม่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน และข้อสังเกตที่ว่าผลของช่วงระยะห่างของวัคซีนมีนัยสำคัญอย่างมากสำหรับกลุ่มที่เคยติดเชื้อมาก่อน การศึกษาวิจัยของเราแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อก่อนหน้านี้เป็นการเตรียมสำหรับปฏิกริยาการตอบสนองของแอนติบอดีและของ T cell ที่เพิ่มสูงขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Bradley และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Ebinger และคณะ, พ.ศ.](#)

2564; [Manisty และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) หลังจากได้รับวัคซีน 2 เข็ม การติดเชื้อมาก่อนหน้านี้ยังคงมีข้อดีในแง่ของปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีและของ T cell ที่วัดได้และการลบล้างฤทธิ์ข้ามสายพันธุ์กลายพันธุ์ (cross-neutralization) ต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เป็นที่กังวล (variants of concern) ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างที่ชัดเจนอยู่น้อยกว่าในส่วนของขนาดปริมาณเมื่อเปรียบเทียบกับหลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก ความสำคัญในเชิงการทำงาน (functional importance) ของเรื่องนี้ในแง่ของการป้องกันและผลกระทบต่อความทนทานของปฏิกิริยาการตอบสนองยังคงต้องมีการทำให้ชัดเจนกันต่อไป การติดเชื้อในอดีตอาจจะมีข้อดีอื่น ๆ รวมทั้งภูมิคุ้มกันจากเยื่อเมือก (mucosal immunity) ปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีและของ T cell ต่อแอนติเจนของไวรัสอื่น ๆ นอกเหนือจากโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ตลอดจนความแตกต่างของลักษณะปฏิกิริยาการตอบสนอง ไม่ว่าข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนจะเป็นแบบใดก็ตามก็ยังคงมีความผันแปรเปลี่ยนแปลงระหว่างในแต่ละคนเป็นอย่างมากในด้านการตอบสนองต่อวัคซีนสำหรับปฏิกิริยาการตอบสนองที่อาศัยสารน้ำและปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับเซลล์ โดยรวมแล้วเราพบเห็นสหสัมพันธ์ระหว่าง 2 สิ่งนี้เมื่อเราพิจารณาถึงปฏิกิริยาการตอบสนองตลอดจุดเวลาทั้งหมด (across all time points) แต่ก็ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีกับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell (ELISpot) เมื่อพิจารณาเฉพาะจุดเวลา คือที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ผลกระทบของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนและผลกระทบของการฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้นต่อผู้ที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อนมีความชัดเจนน้อยกว่าในผู้ที่ไม่เคยมีการติดเชื้อเป็นอย่างมาก นอกจากนี้เรายังได้ศึกษาถึงผลกระทบจากอายุ เพศ และชาติพันธุ์ในกลุ่มอาสาสมัครของเรา ถึงแม้ว่าสิ่งที่สังเกตพบเหล่านี้ถูกจำกัดจากจำนวนของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมและสมดุลงของกลุ่ม แต่เราก็สังเกตไม่พบผลกระทบที่มากมายเป็นรูปธรรมใด ๆ ของการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบอย่างง่ายหรือการวิเคราะห์พหุตัวแปร ยกเว้นผลกระทบที่น้อยมาก ๆ ของอายุที่สูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดีที่ต่ำลงในเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่ไม่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน อย่างไรก็ตามยังคงมีความเป็นไปได้ว่าผลกระทบทางด้านพันธุกรรม เช่นประเภทของ human leukocyte antigen (HLA) มีบทบาทจริง ๆ เนื่องจากมีการแสดงให้เห็นในบริบทของวัคซีนอื่น ๆ ด้วย ([Mentzer และคณะ, พ.ศ. 2558](#)) นอกจากนี้ผลกระทบจากการสัมผัสกับ betacoronaviruses อื่น ๆ ยังคงต้องมีการศึกษาวิจัยกันต่อไป

ดูเหมือนว่าความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ของการฉีดวัคซีนโดยใช้ข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน ที่มีการยืดขยายเวลาระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปจะมีความแข็งแกร่ง และสำหรับระดับแอนติบอดีก็มีการปรับปรุงดีขึ้นมากกว่าที่ใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีระยะห่างระหว่างแต่ละเข็มแบบปกติ (3 ถึง 4 สัปดาห์) เราได้ให้หลักฐานที่ว่า T cells ได้รับการกระตุ้นและยังคงดำรงอยู่ในช่วงระยะเวลาระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มที่ยาวนานกว่า คือ 6 ถึง 14 สัปดาห์ แต่ก็มีผลกระทบของช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มต่อสัดส่วนเชิงสัมพัทธ์ (relative proportion) ของกลุ่มย่อย ๆ ของ T cell การศึกษาวิจัยต่อเนื่องในอาสาสมัครกลุ่มนี้จะเป็นการเฝ้าสังเกตความทนทาน (durability) ของปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีและของ T cell ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ที่ใช้ข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่มีการยืดขยายเวลาระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มออกไปและปฏิกิริยาการตอบสนองต่อวัคซีนเข็มกระตุ้นเข็มที่ 3 (ถ้าหากได้รับ) สำหรับผู้กำหนดนโยบายการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแต่ละเข็มที่เหมาะสมที่สุดอาจจะขึ้นอยู่กับความชุกในชุมชน ภูมิคุ้มกันหมู่ในประชากรจากการติดเชื้อในธรรมชาติ สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เป็นที่กังวลที่กำลังแพร่ระบาดในขณะนั้น ตลอดจนปริมาณวัคซีนที่

มีอยู่ การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นตามปกติทำให้เกิดการป้องกันแต่เนิ่น ๆ ในขณะที่ปรากฏว่าการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายเวลาออกไปช่วยปรับปรุงยกระดับปริมาณของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ได้สูงสุด

ข้อจำกัดของการศึกษาวิจัยนี้ (Limitations of the study)

การศึกษานี้ได้ให้ข้อมูลที่ละเอียดในระดับ relative scale เกี่ยวกับปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนชนิด BNT162b2 ในประชากรวัยทำงานที่มีสุขภาพดี เพื่อช่วยให้เราเกิดความเข้าใจในประสิทธิภาพของวัคซีนต่อสายพันธุ์กลายพันธุ์อัลฟาที่พบในโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) และในสหราชอาณาจักรโดยรวม ข้อจำกัดของการศึกษาวิจัยนี้ได้แก่ ประการแรกสุดคือการที่อาสาสมัครส่วนมากเป็นเพศหญิงและมีชาติพันธุ์เป็นคนผิวขาว ซึ่งสะท้อนถึงเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่เราสามารถรับสมัครเข้ามา ถึงแม้ว่าทั้งความเป็นเพศหญิงหรือชาติพันธุ์ล้วนได้รับการเปิดเผยว่าไม่เป็นตัวแปรที่มีนัยสำคัญในการวิเคราะห์แบบจำลองของเรา ประการที่ 2 การตรวจวัดค่าทางห้องปฏิบัติการ เช่น ระดับต่ำ ๆ ของแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ (Nab) ขึ้นอยู่กับ threshold effects และอาจจะไม่ได้สะท้อนถึงภูมิคุ้มกันที่เป็น functional immunity จริงในขณะที่มีการสัมผัสซ้ำกับโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ประการที่ 3 จำเป็นจะต้องมีการติดตามต่อเนื่องในการประเมินผลกระทบของการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนต่อความทนทานของปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ประการที่ 4 ความหลากหลายผสมผสานในระดับสูง (high heterogeneity) ของปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีและของ T cell ที่เราสังเกตเห็นหมายความว่าการศึกษาในระดับสูงขึ้นของแอนติบอดีและของ T cell memory function หลังจากที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายออกไปมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันมากที่สุดในระดับประชากรมากกว่าในระดับปัจเจกชน ประการที่ 5 ถึงแม้ว่าเราจะทราบถึงประสิทธิภาพของวัคซีนในกลุ่มอาสาสมัครในโครงการแม่ (SIREN study) แต่เราก็ไม่ได้ตรวจวัดค่า (ประสิทธิภาพของวัคซีน) นี้โดยตรงในบุคคลคนเดียวเท่ากับที่เราตรวจวัดระดับ T cell และแอนติบอดี ซึ่งหมายความว่าเราไม่สามารถตรวจวัดปัจจัยความสัมพันธ์ใหม่ ๆ (novel correlates) ของการป้องกันได้โดยตรงในการศึกษาวิจัยนี้ และประการสุดท้ายขนาดของกลุ่มอาสาสมัครมีความเอนเอียงไปทางจำนวนของอาสาสมัครที่มากกว่าเป็นอย่างมากในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนโดยมีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายออกไป เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนโยบายอย่างกะทันหันในระหว่างการเริ่มโครงการฉีดวัคซีนให้แก่พลเมืองอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่มีความกดดันสูงสุดจากจำนวนผู้ป่วยโควิด 19 ที่จำเป็นต้องเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลต่อระบบการบริการสุขภาพของสหราชอาณาจักร หมายความว่าเราถูกจำกัดในเรื่องจำนวนของอาสาสมัครที่เราสามารถรับสมัครที่เป็นผู้ที่จะได้รับวัคซีนที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติ ในทางตรงกันข้ามการเปลี่ยนแปลงนโยบายอย่างกะทันหันนี้ทำให้เรามีโอกาสพิเศษในการเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ระหว่างการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายออกไปกับการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนแบบสั้นปกติได้โดยตรง

ความสำคัญของ immune memory และหลาย ๆ หนทางที่ระบบภูมิคุ้มกันมีภายหลังจากที่ได้รับวัคซีนสามารถช่วยป้องกันโรคร้ายแรงได้ ซึ่งรวมถึงบทบาทของ memory pools ด้วย และคุณสมบัติเชิงหน้าที่จำเพาะของแอนติบอดีชนิดที่จับกับโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ (binding Abs) และปฏิกิริยาการตอบสนองของระดับเซลล์จะต้องได้รับการคำนึงถึง เพื่อหลีกเลี่ยงการมุ่งความสนใจที่มากเกินไปต่อการวัดเฉพาะจุด (point measures) ของระดับแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ในกระแสเลือดว่าเป็นตัวแทนเพียงหนึ่งเดียวสำหรับภูมิคุ้มกันที่ได้รับการกระตุ้นจากวัคซีน การศึกษาวิจัยของเราได้แสดงให้เห็นว่าวัคซีนชนิด BNT162b2 จำนวน 2 เข็มมีความสามารถอย่างสูงในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน สำหรับแอนติบอดีและ T cells ตลอดช่วงการเว้นระยะห่างของวัคซีนที่เราศึกษา เมื่อระดับของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ที่กำลังแพร่ระบาดต่ำลงในชุมชน การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนที่ยืดขยายเวลาออกไปจะมีความเหมาะสมสำหรับความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) แต่ก็จำเป็นจะต้องมีการชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบประโยชน์ของการได้รับวัคซีน 2 เข็มที่มากกว่าวัคซีนเข็มเดียวด้วย การตัดสินใจในระดับนโยบายเกี่ยวกับการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ รวมทั้งอัตราความชุกของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในปัจจุบัน สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เป็นที่กังวล (variants of concern) ชนิดใดที่กำลังอุบัติอยู่ในขณะนั้น ความอ่อนแอ (susceptibility) ของประชากร ตลอดจนอุปทานของวัคซีน อย่างไรก็ตามขณะนี้ข้อมูลทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่แข็งแกร่งก็สามารถแจ้ง (ผู้กำหนด) นโยบายที่ว่ำนั้น

ตารางแสดง resources ที่สำคัญ

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
แอนติบอดี (Antibodies)		
Purified NA/LE mouse anti-human CD28 (Clone: CD28.2)	BD Biosciences, UK	Cat#555725; RRID: AB_396068
Purified NA/LE mouse anti-human CD49d (Clone: 9F10)	BD Biosciences, UK	Cat#555501; RRID: AB_2130052
BV510 mouse anti-human CD3 (Clone: UCHT1)	BD Biosciences, UK	Cat#563109; RRID: AB_2732053

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
Brilliant Violet 421 mouse anti-human CD8 (Clone: RPA-T8)	BD Biosciences, UK	Cat#562428; RRID: AB_11154035
PE mouse anti- human TNF α (Clone: MAb11)	Thermo Fisher Scientific,	Cat#12-7349-82; RRID: AB_466208
PERCP/ Cyanine 5.5 mouse anti-human CD4 (Clone: RPA-T4)	Biologend, UK	Cat#300530; RRID: AB_394493
APC-Cy7 mouse anti-human CD14 (Clone: M ϕ P9)	BD Biosciences, UK	Cat#557831; RRID: AB_396889
FITC mouse anti- human IFN γ (Clone: 45-15)	Miltenyi Biotec Ltd	Cat#130-113-492; RRID: AB_2733589
APC mouse anti- human IL- 2 (5344.111)	BD Biosciences, UK	Cat#341116; RRID: AB_400574
PE- Cy7 mouse anti- human CD107 α (Clone: H4A3)	BD Biosciences, UK	Cat#561348; RRID: AB_10644018
Human FluoroSPOT anti- IgG capture mAb	Mabtech	Cat#FSX-05R-10
Human anti-NP (mAb206)	Dejnirattisai et al., 2021	N/A

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
Anti- Human IgG (Fc specific) - Peroxidase	Sigma	Cat#A0170; RRID: AB_257868
สายพันธุ์แบคทีเรียและไวรัส (Bacterial and virus strains)		
SARS-CoV-2/P.1	Dejnirattisai et al., 2021	N/A
SARS-CoV-2/B.1.617.2	Wendy Barclay and Thushan De Silva	N/A
SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	Caly et al., 2020	N/A
SARS-CoV-2/B.1.351	Public Health England	N/A
สารเคมี เปปไทด์ และโปรตีนที่เกิดจากการตัดต่อดีเอ็นเอ (Chemicals, peptides, and recombinant proteins)		
TrueBlue Peroxidase Substrate	Insight Biotechnology	Cat#5510-0030
Dulbecco' s Modified Eagle Medium, high glucose	Sigma-Aldrich	Cat#D5796

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
Custom synthesized peptides (18-mers)	Mimotopes	http://www.mimotopes.com
Dimethyl Sulfoxide	Sigma	Cat#D2650-100ML
RPML- 1640 Medium with Sodium bicarbonate, no L-Glutamine	Sigma	Cat#R0883
L-Glutamine	Sigma	Cat#G7513
Penicillin/Streptomycin	Sigma	Cat#P0781
Fetal Bovine Serum	Sigma	Cat#F9665-500ML
Lymphoprep	StemCell Technology	Cat#07861
L- Glutamine– Penicillin– Streptomycin solution	Sigma-Aldrich	Cat#G1146
GlutaMAX Supplement	GIBCO	Cat#35050061
Phosphate buffered saline tablets	Fisher Scientific	Cat#12821680
Fetal Bovine Serum	GIBCO	Cat#12676029
Carbonate/bicarbonate capsules	Sigma Aldrich	Cat#C3041-100CAP

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
ProMix CEF peptide pool	Proimmune, Oxford	Cat#PX-CEF
Phytohemagglutinin-L	Sigma Aldrich	Cat#11249738001
Carboxymethyl cellulose	Sigma	Cat#C4888
Tween 20	Sigma Aldrich	Cat#P2287-500ml
1- Step NBT/ BCIP Substrate Solution	Life Technologies	Cat#34042
LIVE/ DEAD fixable near- IR dead cell stain kit	Thermo Fisher Scientific	Cat#L34975
Perm/Wash Buffer (10x)	BD Biosciences	Cat#554723
Brefeldin A	Merck, UK	Cat#B6542
PMA	Merck, UK	Cat#P1585
Ionomycin calcium salt from <i>Streptomyces globatus</i>	Merck, UK	Cat# <u>I0634</u>
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific	Cat#14190144

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
37% Formaldehyde solution	Merck, UK	Cat#F8775
GIBCO Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated	Thermo Fisher Scientific, UK	Cat#10500064
RPML- 1640 Medium with sodium biicarbonate but without L- Glutamine	Merck, UK	Cat#R0883
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck, UK	Cat#A9418
ชุดทดสอบทางการค้าที่สำคัญ (Critical commercial assays)		
V- PLEX COVID- 19 Coronavirus Panel 3 (IgG) Kit	Meso Scale Discovery, Rockville, MD USA	Cat#K15399U-2
V- PLEX SARS- CoV- 2 Panel 7 (ACE2) Kit	Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA	Cat#K15440u
Human IgA/IgG FluoroSpotFLEX kit	Mabtech	Cat#X-06G05R-10
Human memory B cell stimpack	Mabtech	Cat#3660-1
Human IFN γ ELISpot Basic kit	Mabtech	Cat#3420-2A

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
ข้อมูลฝาก (Deposited data)		
Immunogenicity of standard and extended dosing intervals of BNT162b2 mRNA vaccine. Payne et al.	Mendeley Data	https://doi.org/10.17632/fyp26zjgmj.1
โมเดลการทดลอง (Experimental models: Cell lines)		
Vero cells	ATCC	Cat#CCL-81
ซอฟต์แวร์และอัลกอริทึม (Software and algorithms)		
Discovery Bench 4.0	Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA	Immunoassay Analysis Software Meso Scale Discovery
Prism 8.0	GraphPad	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
IBM SPSS Software 26	IBM	https://www.ibm.com/us-en/?ar=1
AID ELISpot software 8.0	Autoimmun Diagnostika	http://www.elispot.com/products/software
Flojo 10.7.1	BD Biosciences	https://www.flowjo.com/

น้ำยาหรือทรัพยากร (REAGENT or RESOURCE)	แหล่งที่มา (SOURCE)	ตัวระบุ (IDENTIFIER)
R version 4.0.4 (2021-02-15)–“Lost Library Book”	Web- based open source software	https://www.r-project.org
R studio version 1.1.463	Web- based open source software	https://www.rstudio.com
อื่น ๆ (Other)		
FacsCanto II cytometer	BD Biosciences UK	N/A

โมเดลการทดลองและรายละเอียดของอาสาสมัคร (Experimental model and subject details)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (Primary Cell cultures)

Vero cells (ATCC CCL-81) ได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (Sigma-Aldrich) ที่เสริมด้วย 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM L-Glutamine (Sigma) และ 2mM GlutaMax (GIBCO)

Viral Stocks

การทดลองกับเชื้อไวรัสที่มีชีวิตดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 ซึ่งสอดคล้องเป็นไปตามแนวทางปฏิบัติของคณะกรรมการที่ปรึกษาว่าด้วยเชื้ออันตรายแห่งสหราชอาณาจักร (UK's Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) guidelines) SARS-CoV-2/human/AUS/VIC01/2020 ([Caly และคณะ, พ.ศ. 2563](#)), SARS-CoV-2/B.1.1.7 และ SARS-CoV-2/B.1.351 ได้รับการจัดหาให้โดยกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย (Public Health England) P.1 จาก throat swab จากบราซิลได้รับการเพาะเลี้ยงใน Vero (ATCC CCL-81) cells เซลล์ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 โดยใช้ MOI เท่ากับ 0.0001 ไวรัสที่มี supernatant ได้รับการเก็บเกี่ยว (harvested) ที่ cytopathic effect เท่ากับ 80% และปั่นที่ 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนการจับที่อุณหภูมิ -80°C ไตเตอร์ของไวรัสได้รับการตรวจวัดโดย focus-forming assay on Vero cells. Stock ของไวรัส Victoria passage 5, B.1.1.7 passage 2, B.1.351 passage 4 และ P.1 passage 1 ได้รับการทำ sequencing เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าไวรัสเหล่านี้มี sequence ของโปรตีนส่วนหนามตามที่คาดไว้และไม่มีการ

เปลี่ยนแปลงต่อ furin cleavage sites เราได้รับความอนุเคราะห์จาก Wendy Barclay และ Thushan De Silva ในการจัดหาไวรัส B.1.617.2 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ต่อไปนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ sequence ของไวรัสที่เคยแพร่ระบาดในเมืองหู่อัน: T19R, G142D, Δ 156-157/R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N.

อาสาสมัครผู้เข้าร่วม (Human participants)

โครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (The PITCH [Protective Immunity from T cells in Healthcare Workers] study)

เจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่ได้รับการรับสมัครสรรหาเข้าร่วมในโครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ที่โรงพยาบาลในสังกัดหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (National Health Service หรือ NHS) ของประเทศอังกฤษจำนวน 5 ศูนย์ด้วยกัน (ได้แก่ University Hospitals Birmingham NHS Foundation Trust, Liverpool University Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Oxford University Hospitals NHS Foundation Trust, และ Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust) อาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการรับสมัครสรรหา ทั้งผู้ที่มีและผู้ที่ไม่มีความวิตกกังวลต่อเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อน อาสาสมัครแต่ละคนได้รับการระบุว่าไม่เคยมีการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อน (SARS-CoV-2 naïve) หรือว่าเคยมีการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อนโดยอ้างอิงตามผลการตรวจที่เป็นลายลักษณ์อักษรโดยวิธี PCR และ/หรือการตรวจทางเซรั่มวิทยาจากหน่วยงานที่ได้รับ ความไว้วางใจจากหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (NHS) ในพื้นที่ หรือจากผลการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนาม (spike) และ nucleocapsid (N) ของไวรัสด้วยวิธีการตรวจระดับปานกลาง (mesoscale discovery [MSD] assay) ถ้าหากว่าข้อมูลเหล่านี้ไม่สามารถหาได้ในพื้นที่ อาสาสมัครทั้งหมดได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 ของบริษัท Pfizer/BioNTech การเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนถ้าไม่เป็นแบบ “สั้น” ปกติ คือ 3-5 สัปดาห์ (มาตรฐานคือ 24 วัน, ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 21-27, พิสัยเท่ากับ 14-35) ก็เป็นแบบยืดขยายการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีน “ยาว” ออกไปเป็น 6-14 สัปดาห์ (มาตรฐานคือ 71 วัน, ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 64-77, พิสัยเท่ากับ 45-105) ข้อมูลเกี่ยวกับปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากเริ่มแรก (baseline) และที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรกได้รับการรายงานมาก่อนหน้า พร้อมกับข้อมูลสำหรับเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์จำนวน 21 คนที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 ที่มีการเว้นช่วงระยะห่างของวัคซีนเป็นแบบ “สั้น” ปกติ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) โครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) เป็นโครงการการศึกษาวิจัยย่อย (sub-study) ของโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ซึ่งได้รับการเห็นชอบอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย (Berkshire Research Ethics Committee, Health Research 250 Authority [IRAS ID 284460, REC reference 20/SC/0230]) โดยที่โครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) ได้รับการยอมรับว่าเป็นโครงการการศึกษาวิจัยย่อยในวันที่ 2 ธันวาคม พ.ศ. 2563 โครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ได้รับการขึ้นทะเบียนซึ่งมีหมายเลข International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN) คือเลข Trial ID ลำดับที่ 252 ISRCTN11041050) อาสาสมัครผู้เข้าร่วมบางคนได้รับการรับสมัครสรรหาภายใต้โปรโตคอลโครงการการศึกษาวิจัยร่วม ในเบอร์มิงแฮมอาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการรับสมัครสรรหาภายใต้โครงการการ

ศึกษาวิจัย “การวัดปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ในเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่อยู่ในระยะพักฟื้น” (“Determining the immune response to SARS-CoV-2 infection in convalescent health care workers” (หรือ COCO study) (IRAS ID: 282525) ในลิเวอร์พูลอาสาสมัครผู้เข้าร่วมบางคนได้รับการรับสมัครสรรหาภายใต้โครงการการศึกษาวิจัย “ปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดเฉียบพลัน” (“Human immune responses to acute virus infections” Study) (16/NW/0170) ซึ่งได้รับการเห็นชอบอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย (North West - Liverpool Central Research Ethics Committee) ในวันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2559 และได้รับการปรับปรุงแก้ไขเมื่อวันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2563 และต่อมาในวันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2564 ในอ็อกซ์ฟอร์ดอาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการรับสมัครสรรหาภายใต้โครงการการศึกษาวิจัย “GI Biobank Study” 16/YH/0247 ซึ่งได้รับการเห็นชอบอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย (the research ethics committee (REC) at Yorkshire & The Humber - Sheffield Research Ethics Committee) ในวันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 ซึ่งได้รับการปรับปรุงแก้ไขเพื่อวัตถุประสงค์นี้เมื่อวันที่ 8 มิถุนายน พ.ศ. 2563 ในเซฟฟิลด์อาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการรับสมัครสรรหาภายใต้โครงการการศึกษาวิจัย “Observational Biobanking study STHObs” (18/YH/0441) ซึ่งได้รับการปรับปรุงแก้ไขสำหรับโครงการการศึกษาวิจัยนี้เมื่อวันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2563 โครงการการศึกษาวิจัยนี้ได้ดำเนินการตามกฎหมายข้อบังคับด้านจริยธรรมทั้งหมดที่เกี่ยวข้องสำหรับการศึกษากับอาสาสมัครที่เป็นมนุษย์ และสอดคล้องเป็นไปตามหลักการต่าง ๆ ของปฏิญญาเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) (พ.ศ. 2551) และแนวปฏิบัติการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดีของ ICH (the International Conference on Harmonization (ICH) Good Clinical Practice (GCP) guidelines) อาสาสมัครจำนวน 589 คนได้รับการรับสมัครสรรหาเข้าร่วมในโครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) นี้ โดยอัตราส่วนระหว่างอาสาสมัครเพศหญิงต่อเพศชายอยู่ที่ 74 ต่อ 26 ค่ากลางมัธยฐานของอายุเท่ากับ 43 ปี (พิสัย 21 - 71) ข้อมูลเพิ่มเติมด้านประชากรศาสตร์รายงานไว้ใน [ตารางที่ 1](#) เราได้รับคำยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากอาสาสมัครทั้งหมดที่ลงทะเบียนเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยนี้

โครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study)

โครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อซ้ำสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) เป็นโครงการการศึกษาวิจัยต่อเนื่องที่แตกต่างหาก ซึ่งระเบียบวิธีการในการศึกษาวิจัย (methodology) เคยได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่มาแล้วก่อนหน้านี้ ([Hall และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) โครงการการศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยขนาดใหญ่ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยแบบ cohort study ชนิดก้าวไปข้างหน้า (prospective) ในเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปปฏิบัติงานอยู่ในโรงพยาบาลต่าง ๆ ในสังกัดหน่วยงานบริการสุขภาพแห่งชาติ (National Health Service หรือ NHS ของสหราชอาณาจักร (โรงพยาบาลเหล่านี้ได้รับเงินทุนจากรัฐบาล) การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวัคซีนที่รวมอยู่ใน [ภาพประกอบ 1A](#) ของเอกสารผลงานการศึกษาวิจัยนี้เป็น การนำเสนอกาวิเคราะห์ซ้ำ (repeat analysis) ภายหลังจากที่มีการยืดขยายช่วงระยะเวลาในการติดตามผล (จนถึงวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2564) ต่อจากที่เคยตีพิมพ์เผยแพร่มาแล้วก่อนหน้านี้ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) ซึ่งเป็นข้อมูลที่เก็บจนถึงวันที่ 5 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 กล่าวโดยย่อ ประสิทธิภาพของวัคซีนชนิด BNT162b2 ต่อการติดเชื้อที่ยืนยันโดยการตรวจวิธี PCR (ที่ไม่มีอาการและที่มีอาการ) ได้รับการประมาณในอาสาสมัคร

ผู้เข้าร่วมในโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ที่ได้รับการติดตามผลจากวันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2563 จนถึงวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2564 โดยการเปรียบเทียบเวลาในการติดเชื้อ (time to infection) ในอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีนกับอาสาสมัครที่ไม่ได้รับวัคซีน อาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ที่ไม่มีอาการโดยวิธี PCR ในทุก ๆ 2 สัปดาห์และการตรวจหาแอนติบอดีทุก ๆ เดือน ๆ ละ 1 ครั้ง นอกจากนี้ยังมีการเก็บข้อมูลของการตรวจทั้งหมดทุกอย่าง (รวมทั้งการตรวจหาการติดเชื้อที่มีอาการ) ที่อยู่นอกโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (SIREN study) ด้วย ปัจจัยความเสี่ยงพื้นฐานต่าง ๆ (baseline risk factors) ได้รับการเก็บรวบรวมข้อมูลตอนลงทะเบียน สถานะของการได้รับการเก็บรวบรวมข้อมูลทุก ๆ 2 สัปดาห์ และสถานะของการได้รับวัคซีนได้รับการเก็บรวบรวมข้อมูลโดยผ่านทางวิธีการเชื่อมโยงไปยังระบบการบริหารจัดการวัคซีนแห่งชาติ (National Immunisations Management System) รวมทั้งทางแบบสอบถาม ข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 โดยวิธี PCR ที่ผ่านมา และการตรวจหาแอนติบอดีถูกใช้ในการกำหนดตัดสินว่าอาสาสมัครผู้เข้าร่วมแต่ละคนมีสถานะของการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 มาก่อนหรือไม่ (กลุ่มที่มีผลการตรวจเป็นบวกหรือกลุ่มที่มีผลการตรวจเป็นลบ) ในตอนเริ่มต้นของช่วงระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ (วันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2563) ประสิทธิภาพของวัคซีนชนิด BNT162b2 ได้รับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองชนิด piecewise exponential hazard mixed-effects model (shared frailty-type model) ซึ่งใช้การกระจายแบบ Poisson distribution ที่ปรับสำหรับอุบัติการณ์ของตัวแปรในระหว่างช่วงระยะเวลาการติดตามผลและสำหรับตัวแปรที่สำคัญ การศึกษาวิจัยนี้ขึ้นทะเบียนซึ่งมีหมายเลข International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN) ลำดับที่ ISRCTN11041050 โครงการการศึกษาวิจัยนี้ยังมีการดำเนินการอยู่อย่างต่อเนื่องในขณะนี้ มีอาสาสมัครจำนวน 25,661 คนเข้าร่วมในการตรวจวิเคราะห์นี้ โดยที่อัตราส่วนระหว่างอาสาสมัครเพศหญิงต่อเพศชายอยู่ที่ 84 ต่อ 16

รายละเอียดของวิธีการในการศึกษาวิจัย (Method details)

การออกแบบการศึกษาวิจัยและการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (Study design and sample collection)

ในการศึกษาวิจัยเชิงสังเกตแบบ cohort study ชนิดก้าวไปข้างหน้า (prospective) นี้เจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ได้รับการรับสมัครสรรหาจากทั่วทั้ง 5 ศูนย์ เพื่อเข้าร่วมในโครงการการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) อาสาสมัครแต่ละคนที่ได้ให้ความยินยอมเข้าร่วมได้รับการรับสมัครโดยผ่านการบอกต่อ ๆ กันไปปากต่อปาก ผ่านช่องทางการสื่อสารโดยใช้อีเมลล์ของโรงพยาบาล จากโครงการตรวจคัดกรองเจ้าหน้าที่ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ของทางโรงพยาบาลเอง ตลอดจนเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ที่ลงทะเบียนเข้าร่วมในโครงการการศึกษาวิจัยการประเมินภูมิคุ้มกันและการติดเชื้อสำหรับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (national SIREN study) ที่สถานที่ทำการการศึกษาวิจัยทั้ง 3 แห่ง (ลิเวอร์พูล นิวคาสเซิล และเซฟฟิลด์) อาสาสมัครที่มีสิทธิ์จะต้องเป็นผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปซึ่งปฏิบัติงานเป็นเจ้าหน้าที่บุคลากรทางการแพทย์ในปัจจุบัน ซึ่งรวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายสนับสนุนและเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการด้วย อาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการสุ่มตัวอย่างสำหรับโครงการการศึกษาวิจัยนี้ในช่วงระหว่างวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2563 ถึงวันที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2564 อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่อยู่ในกลุ่มที่ใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีการยืดขยายระยะห่างระหว่างแต่ละเข็มออกไปได้รับการเจาะเลือด เพื่อประเมินปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันก่อนได้รับวัคซีนเข็มแรก (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 23 วัน ค่าพิสัย

ระหว่างควอไทล์เท่ากับ 6/55) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 28 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 26/31) ที่ 8 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มแรก (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 70 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 62/75) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 28 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 25/32) และที่ 13 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 94 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 91/103) อาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่อยู่ในกลุ่มที่ใช้ข้อกำหนดการฉีดวัคซีนที่มีระยะห่างระหว่างแต่ละเข็มแบบสั้นปกติได้รับการเจาะเลือด เพื่อประเมินปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ 1 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 7 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 7/8) ที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 28 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 27/33) และที่ 13 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 (ค่ากลางมัธยฐานอยู่ที่ 98 วัน ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์เท่ากับ 93/122) ภาพรวมของการตรวจมีรายละเอียดดังที่แสดงไว้ใน [ตาราง S1](#) ข้อมูลทางคลินิกซึ่งรวมทั้งวันที่ได้รับวัคซีนชนิด BNT162b2 วันที่มีการติดเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ครั้งใด ๆ มาก่อนซึ่งกำหนดตัดสินโดยผลการตรวจวิธี PCR ที่เป็นบวกและ/หรือ การตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามหรือโปรตีน nucleocapsid การมีอาการต่าง ๆ หรือไม่มีอาการ ช่วงระยะเวลาระหว่างเริ่มมีอาการและการสุ่มตัวอย่าง อายุ เพศ ตลอดจนชาติพันธุ์ของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมได้รับการเก็บบันทึก

การตรวจด้วยวิธี Focus Reduction Neutralization Assay (FRNT)

ศักยภาพในการบล้างฤทธิ์ของแอนติบอดีได้รับการตรวจวัดโดยใช้การตรวจวิธี Focus Reduction Neutralization Test (FRNT) ซึ่งการลดลงของจำนวนของจุดรวมการติดเชื้อ (infected foci) ได้รับการเปรียบเทียบกับ negative control well ที่ไม่มีแอนติบอดี กล่าวโดยย่อคือแอนติบอดีหรือพลาสมาที่เจือจางแบบ serial dilution ถูกผสมเข้ากับไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 สายพันธุ์วัดต่อเรียหรือ P.1 และ incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ต่อจากนั้นส่วนผสมนี้ถูก transferred ไปยัง microplates (ชนิด 96-well, cell culture-treated, flat-bottom) ซึ่งมี confluent Vero cell monolayers โดยทำเป็น 2 ชุด (duplicate) และ incubate ต่ออีก 2 ชั่วโมง ตามด้วยการใส่ 1.5% semi-solid carboxymethyl cellulose (Sigma) overlay medium ลงในแต่ละหลุม (well) เพื่อจำกัดการแพร่กระจายของไวรัส ต่อจากนั้นก็ทำการตรวจวิธี focus forming assay โดยการย้อมสี Vero cells ด้วย human anti-nucleocapsid monoclonal Ab (mAb206) ตามด้วย peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (A0170; Sigma) และสุดท้ายจุดรวมการติดเชื้อ (เซลล์ที่ติดเชื้อ) ประมาณ 100 ต่อ well ที่ไม่มีแอนติบอดีก็ได้รับการ visualized โดยการใส่สารละลาย TrueBlue Peroxidase Substrate (Insight Biotechnology) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ถูกนับจำนวนบนเครื่อง classic AID ELISpot reader ซึ่งใช้ซอฟต์แวร์ AID ELISpot เปอร์เซ็นต์ของ focus reduction ได้รับการคำนวณและ IC_{50} ได้รับการวัดโดยใช้ probit program จากชุดโปรแกรม SPSS

การตรวจด้วยวิธี Mesoscale Discovery (MSD) binding assays

ปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, MERS-CoV และไวรัสโคโรนาตามฤดูกาล ได้รับการตรวจวัดโดยใช้ multiplexed MSD immunoassay คือใช้ชุดทดสอบ V-PLEX COVID-19 Coronavirus Panel 3 (IgG) Kit จาก Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD USA และ plate ชนิด MULTI-SPOT® 96-well, 10 spot plate ได้รับการเคลือบด้วยแอนติเจนของไวรัสโคโรนา SARS CoV-2 จำนวน 3 อย่าง (โปรตีนส่วนหนาม, RBD, และโปรตีน N) เคลือบด้วย spike trimers ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-1 และ MERS-CoV และโปรตีนส่วนหนามจาก human coronaviruses ที่แพร่ระบาดตามฤดูกาล HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E และ HCoV-NL63 รวมทั้ง bovine serum albumin เราพบแอนติเจนที่ความเข้มข้นระหว่าง 200–400 µg/mL (MSD® Coronavirus Plate 3) เราทำการตรวจวิธี multiplex MSD assays ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพื่อที่จะตรวจวัด IgG antibodies เราทำการ block plates (96-well plates) ด้วย MSD Blocker A เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการล้างด้วย washing buffer ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 ถึง 1:10,000 ใน diluent buffer หรือในมาตรฐาน MSD หรือ internal MSD controls ที่ไม่เจือจางก็ถูกใส่ลงหลุม (wells) หลังจากการ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและผ่านขั้นตอนการล้างแล้ว detection antibody (MSD SULFO-TAG Anti-Human IgG Antibody, 1/200) ก็ถูกใส่ลงไป หลังจากการล้าง MSD GOLD Read Buffer B ก็ถูกเติมลงไปและ plates ถูกอ่านโดยใช้เครื่อง MESO® SECTOR S 600 Reader เส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) ได้รับการสร้างขึ้นโดยการ fitting สัญญาณจากมาตรฐานโดยใช้แบบจำลอง 4-parameter logistic model ความเข้มข้นของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจวัดจากสัญญาณ electrochemiluminescence โดยการ back-fitting กับเส้นโค้งมาตรฐาน และคูณด้วย dilution factor ความเข้มข้นแสดงเป็นหน่วย Arbitrary Units/ml (AU/ml) ค่า cut-offs ได้รับการวัดสำหรับ แอนติเจนของไวรัสโคโรนา SARS CoV-2 แต่ละอย่าง (โปรตีนส่วนหนาม, RBD, และโปรตีน N) โดยอ้างอิงความเข้มข้นที่วัดได้ใน 103 เซอร์ุ่มก่อนหน้าการแพร่ระบาด + 3 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า cut-off สำหรับโปรตีนส่วนหนามเท่ากับ 1160 AU/ml; ค่า cut-off สำหรับ RBD เท่ากับ 1169 AU/ml; ค่า cut-off สำหรับโปรตีน N เท่ากับ 3874 AU/ml

การตรวจด้วยวิธี MSD ACE2 inhibition assay

ชุดทดสอบ V-PLEX SARS-CoV-2 Panel 7 (ACE2) Kit จาก MSD, Rockville, MD ซึ่งเป็นการตรวจ multiplexed MSD immunoassay ก็ถูกใช้ในการวัดความสามารถของเซรัมของมนุษย์ในการยับยั้งขัดขวางการจับยึดของ ACE2 ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 (B, B.1, B.1.1.7, B.1.351 หรือ P.1) Plate (ชนิด MULTI-SPOT® 96-well, 10 spot plate) ได้รับการเคลือบด้วยแอนติเจนโปรตีนส่วนหนามของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 จำนวน 5 อย่าง (B, B.1, B.1.1.7, B.1.351 หรือ P.1) เราทำการตรวจวิธี Multiplex MSD Assays ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพื่อที่จะวัดการยับยั้งขัดขวางของ ACE2 เราทำการ block plates (96-well plates) ด้วย MSD Blocker เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้น plates ถูกล้างใน MSD washing buffer และตัวอย่างสิ่งส่งตรวจถูกเจือจางที่อัตราส่วน 1:10 ถึง 1:100 ใน diluent buffer ที่สำคัญคือเส้นโค้งการสอบเทียบ (calibration curve) สำหรับ ACE2 ซึ่งประกอบด้วย monoclonal antibody ที่มีปฏิกิริยาอาการที่เทียบเท่ากันต่อโปรตีนหนามของไวรัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ ถูกใช้ในการ interpolate ผลที่ได้ออกมาเป็นหน่วย arbitrary units (units/ml) โดยที่ 1 หน่วยเทียบเท่ากับปฏิกิริยาอาการลบล้างฤทธิ์ที่ขนาด 1 µg/ml ของมาตรฐาน นอกจากนี้ internal controls และมาตรฐาน WHO SARS-CoV-2 Immunoglobulin international standard (20/136) ก็ได้รับการเพิ่มเติมในแต่ละ plate

ด้วย หลังจากการ incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้ว recombinant human ACE2-SULFO-TAG ก็ถูกเติมลงในทุกหลุม (all wells) และหลังจากอีก 1 ชั่วโมงต่อมา plates ก็ถูกล้าง และสารละลาย MSD GOLD Read Buffer B ก็ถูกเติมลงไป ต่อจากนั้น plates ถูกอ่านทันทีโดยใช้เครื่อง MESO® SECTOR S 600 Reader

การตรวจด้วยวิธี Memory B cell Fluorospot assay

PBMCs ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) ถูก thawed และเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยการกระตุ้นชนิดที่เป็น polyclonal stimulation ที่มี $1\mu\text{g/ml}$ R848 และ 10ng/ml IL-2 จาก Human memory B cell stimpack (Mabtech) หลังจากใช้ชุดทดสอบ Human IgA/IgG FluoroSpotFLEX kit (Mabtech) แล้ว ต่อจากนั้นเซลล์ PBMCs ที่ได้รับการกระตุ้นก็ถูกใส่ในปริมาณ 2×10^5 cells/well ลงใน fluorospot plates ที่เคลือบด้วย $10\mu\text{g/ml}$ Sars-CoV-2 spike glycoprotein ที่เจือจางในสารละลาย PBS ต่อจากนั้น plates ก็ได้รับการ incubated เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C และ develop ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Mabtech) การวิเคราะห์ดำเนินการโดยใช้ AID ELISpot software 8.0 (Autoimmun Diagnostika) ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งหมดได้รับการทดสอบโดยทำเป็น 3 ชุด (triplicates) และปฏิกิริยาการตอบสนองวัดเป็นจำนวน spots ที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนหนามต่อล้านเซลล์ของ PBMCs ที่มี PBS background ถูกหักลบออกไป

การตรวจด้วยวิธี T cell ELISpot assays

ขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐานของ ELISpot สำหรับการศึกษาวิจัยภูมิคุ้มกันจาก T cells ในบุคลากรทางการแพทย์ (PITCH study) ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่มาแล้วก่อนหน้านี้ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) การตรวจวิธี Interferon-gamma (IFN γ) ELISpot assays ได้รับการ set up จาก PBMCs ที่ได้รับการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง (cryopreserved) โดยใช้ชุดทดสอบ Human IFN γ ELISpot Basic kit (Mabtech 3420-2A) โพรโตคอลหนึ่งเดียวได้รับการตกลงยอมรับสำหรับใช้ในทุก ๆ ศูนย์ตามที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่มาแล้วก่อนหน้านี้ ([Angyal และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) และเราไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญของขนาดปริมาณของปฏิกิริยาการตอบสนองของ ELISpot ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสที่ 4 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนเข็มที่ 2 จากทั้ง 5 ศูนย์นี้ ([ภาพประกอบ S3B](#)) MultiScreen-IP filter plates (Millipore, MAIPS4510) ได้รับการเคลือบ 50ul ต่อหลุม (well) โดยใช้ capture antibody ที่ได้จากชุดทดสอบ ELISpot Basic kit (clone 1-D1K) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $10\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเจือจางใน sterile phosphate buffered saline (PBS; Fisher Scientific) และ sterile carbonate bicarbonate (Sigma Aldrich) เป็นเวลา 8 ถึง 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C เซลล์ PBMCs ถูก thawed และพักไว้ 3 ถึง 6 ชั่วโมงใน RPMI media (Sigma) ซึ่งเสริมด้วย 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (Sigma), 1% (v/v) L-Glutamine (Sigma) และ 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin (Sigma) ที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนการกระตุ้นด้วย เปปไทด์ plates ที่เคลือบด้วย capture antibody ถูกล้าง 4 ครั้งด้วย sterile PBS ต่อจากนั้นถูก blocked ด้วย RPMI media ที่เสริมด้วย 10% (v/v) Fetal Bovine Serum และ 1% (v/v) penicillin/streptomycin เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C Overlapping peptide pools (18-mers ที่มี 10 amino acid overlap. Mimotopes) ที่แสดงโปรตีนส่วนหนาม (S), Membrane (M) หรือ nucleocapsid (N) ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 ได้รับการใส่ใน 250,000 PBMCs/well ที่ความเข้มข้นสุดท้าย

เท่ากับ 2 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง สำหรับอาสาสมัครผู้เข้าร่วมที่ได้รับการคัดเลือก pools ที่แสดงกลุ่มย่อย (subunits) S1 และ S2 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เป็นที่กังวล (variant of concern) ก็ได้รับการรวมอยู่ด้วย (B.1.35/เบต้า และ P.1/แกมมา) Pools ที่ประกอบไปด้วยเปปไทด์ CMV เปปไทด์ EBV และเปปไทด์ใช้หัดใหญ่ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 $\mu\text{g/ml}$ (CEF; Proimmune) และ phytohemagglutinin-L (Sigma) ถูกใช้เป็น positive controls และ DMSO ถูกใช้เป็น negative control ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับเปปไทด์เหล่านั้น ต่อจากนั้นหลุม (wells) ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS ที่มี 0.05% (v/v) Tween20 (Sigma Aldrich) และถูก incubated ด้วย detection antibody ที่ติดฉลากด้วย biotin จากชุดทดสอบ ELISpot Basic kit (clone 7-B6-1) ซึ่งเจือจางในสารละลาย PBS ที่มี 0.05% (v/v) Tween20 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหลุม (wells) ก็ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS ที่มี 0.05% (v/v) Tween20 และได้รับการ incubate ด้วย ELISpot Basic kit streptavidin-ALP ที่เจือจางในสารละลาย PBS ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นหลุม (wells) ก็ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS และ color development ก็ได้รับการดำเนินการโดยใช้สารละลาย 1-step NBT/BCIP Substrate Solution ปริมาณ 50 μl ของ NBT/BCIP ที่ได้รับการกรองถูกใส่ลงในแต่ละหลุม (well) เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง การทำ color development ยุติลงโดยการล้างหลุม (wells) ด้วยน้ำก็อก plates ที่ปล่อยให้แห้งเอง (air dry) ได้รับการ scanned และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AID Classic ELISpot reader (ซอฟต์แวร์เวอร์ชัน 8.0, Autoimmune Diagnostika GmbH, Germany) ปฏิบัติการตอบสนองของที่จำเพาะต่อแอนติเจนได้รับการตรวจวัดปริมาณโดยการหักลบด้วยค่า spots เฉลี่ย (ค่า mean) ของ control wells ออกจาก test wells และผลที่ได้แสดงเป็นหน่วย spot-forming units (SFU)/ 10^5 PBMCs

การย้อมหาไซโตไคน์ในเซลล์ (Intracellular cytokine staining)

ปฏิบัติการตอบสนองของ T cell ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่มีผลการตรวจวิธี IFN γ ELISpot เป็นบวกที่คัดเลือกได้รับการอธิบายลักษณะต่อไปโดยใช้วิธีการย้อมหาไซโตไคน์ในเซลล์ (intracellular cytokine staining - ICS) หลังจากการกระตุ้นด้วย overlapping spike peptide pools กล่าวโดยย่อ ๆ คือเซลล์จำนวน $1-1.5 \times 10^5$ เซลล์ถูกใส่ลงใน plate ที่มี RPMI media (Merck) ซึ่งเสริมด้วย 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (ThermoFisher), 1% (v/v) L-Glutamine (Sigma) และ 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin (Sigma) และแอนติบอดีที่มีส่วนร่วมในการกระตุ้น (co-stimulatory antibodies) ต่อจากนั้น anti-CD28 (BD) และ anti-CD49d (BD) ใน plate ชนิด 96 well U-bottom plate และ peptide pools ก็ถูกใส่ลงไปเพื่อที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับแต่ละเปปไทด์ DMSO ถูกใช้เป็น negative control ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับเปปไทด์เหล่านั้น ในฐานะที่เป็น positive control เซลล์ได้รับการกระตุ้นพร้อมกันด้วย ionomycin (Sigma) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 500 ng/ml และ PMA (Sigma) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ng/ml ภาวะ degranulation ของ T cells ซึ่งเป็น functional marker ของความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ([Betts และคณะ, พ.ศ. 2546](#)) ได้รับการตรวจวัดโดยการเติม anti-CD107a specific antibody (BD) ที่การเจือจาง 1 ใน 20 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ ต่อจากนั้นเซลล์ได้รับการ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO $_2$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเติม 10 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A (Merck) ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้รับการ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO $_2$ ต่ออีก 5 ชั่วโมงก่อนดำเนินการย้อมสำหรับการตรวจด้วยเทคนิค flow cytometry ต่อไป อันดับแรกเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นถูกย้อมด้วย live/dead stain (ThermoFisher) 1:500 ที่อุณหภูมิห้องในห้องมืดเป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นถูกล้างใน DPBS (ThermoFisher) ตามด้วยการปั่น (spinning)

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ 300 g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเซลล์ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) ใน 2% formaldehyde (Merck) เป็นเวลา 20 นาที และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ใน DPBS ที่เสริมด้วย 1% (v/v) bovine serum albumin (Merck) และ 10% (v/v) DMSO (Sigma) หลังจากนั้นเซลล์ถูก thawed เป็นชุด ๆ (in batches) และปั่นแยก (centrifuged) ที่ 400 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเอาวัตถุสำหรับให้ความเย็น (freezing mix) ออกไปก่อนการทำ permeabilization ในสารละลาย 1x Perm/Wash buffer (BD) เป็นเวลา 20 - 25 นาทีที่อุณหภูมิห้อง การย้อมทำในห้องมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีใน 1x Perm/Wash buffer ที่มีแอนติบอดีต่าง ๆ ตามที่มีรายนามใน [ตารางแสดง resources ที่สำคัญ](#) หลังจากนั้นเซลล์ถูกล้างและ resuspended ใน DPBS ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACS Canto II cytometer และข้อมูลได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ FlowJo software เวอร์ชัน 10 (Treestar) สำหรับวิธีการทำ gating ได้แสดงตัวอย่างไว้แล้วใน [ภาพประกอบ S4](#)

การตรวจวัดปริมาณและการวิเคราะห์ทางสถิติ (Quantification and statistical analysis)

ตัวแปรต่อเนื่องต่าง ๆ แสดงด้วยค่ามัธยฐาน (median) และค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range [IQR]) การเปรียบเทียบชนิดจับคู่ (paired comparisons) ทำโดยใช้การทดสอบชนิด Wilcoxon matched pairs signed rank test การเปรียบเทียบชนิดไม่จับคู่ (unpaired comparisons) ระหว่าง 2 กลุ่มทำโดยใช้การทดสอบชนิด Mann-Whitney test ค่า P ที่เป็น two-tailed P values ได้แสดงไว้แล้ว การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม R version 3.5.1 และ GraphPad Prism 9.0.1

โมเดลการถดถอยทางสถิติ (Statistical regression models)

โมเดลการถดถอยชนิดพหุตัวแปรได้รับการสร้างขึ้น เพื่อประมาณค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ ในกลุ่มอาสาสมัครผู้เข้าร่วม (study cohort) กับปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากแอนติบอดีและ T cell ตัวแปรเหล่านี้ได้แก่ อายุ เพศ ชาติพันธุ์ การติดเชื้อมาก่อน จุดเวลา และการเว้นช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็ม ปฏิสัมพันธ์และสภาพที่เกิดสหสัมพันธ์ (correlation) กันเองระหว่างตัวแปรอิสระในระดับค่อนข้างสูง (co-linearity) ได้รับการตรวจหาและตัวแปรต่าง ๆ ได้รับการวิเคราะห์ในโมเดลที่แยกออกไปต่างหากในกรณีที่มีความจำเป็น โมเดลเชิงเส้นทั่วไป (generalized linear models) ได้รับการสร้างขึ้นเพื่อประมาณค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ เพศ (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) อายุ (ตัวแปรต่อเนื่อง) ชาติพันธุ์ (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) การติดเชื้อมาก่อน (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) และข้อกำหนดการเว้นช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็ม (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสจากการตรวจวิธี ELISpot (spike B SFU/ 10^6 ; log transformed) หรือปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (SARS-Cov-2 S AU/ml; log transformed) โมเดลผลกระทบผสมเชิงเส้น (linear mixed-effect models) ได้รับการสร้างขึ้นเพื่อประมาณค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ คือ เพศ (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) อายุ (ตัวแปรต่อเนื่อง) จุดเวลาในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) การติดเชื้อมาก่อน (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) และชาติพันธุ์ (ตัวแปรไม่ต่อเนื่อง) ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัสจากการตรวจวิธี ELISpot (spike B SFU/ 10^6 ; log transformed) หรือปฏิกิริยาการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส (SARS-Cov-2 S AU/ml; log transformed) ในข้อมูลจากการเว้นช่วงระยะห่างแบบยืดขยายยาวออกไประหว่างวัคซีนแต่ละเข็ม เราพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อมาก่อนกับการเว้นช่วงระยะห่างระหว่างวัคซีนแต่ละเข็มในโมเดลที่ 1 และ โมเดลที่

2 สำหรับปฏิบัติการตอบสนองของ IgG ต่อโปรตีนส่วนหนามของไวรัส ดังนั้นเราจึงได้สร้างโมเดลแยกต่างหากสำหรับกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน (naïve) และกลุ่มอาสาสมัครที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อน โมเดลเชิงเส้นทั่วไป (generalized linear models) และโมเดลผลกระทบผสมเชิงเส้น (linear mixed-effect models) ได้รับการดำเนินการโดยใช้โปรแกรม R /R studio ตารางสรุปได้รายงานไว้แล้ว เพื่อที่จะตรวจสอบว่าสมมติฐานที่ตั้งไว้มีความถูกต้องเราได้สร้างพล็อตระหว่าง residuals กับ fitted and Normal Q-Q diagnostic plots

- Model 1 < - glm (immune response ~ age + sex + previous infection + vaccine dosing interval + previous infection: vaccine dosing interval, data = data)
- Model 2 < - glm (immune response ~ age + sex + previous infection + vaccine dosing interval + ethnicity + previous infection: vaccine dosing interval, data = data)
- Model 3 < - lmer (immune response ~ age + sex + previous infection + sample time point + previous infection: time point, data = data)