

PRACA POGLĄDOWA/REVIEW PAPER

Pojęcie wyniku fałszywie pozytywnego w kontekście diagnostyki COVID-19 i rekomendacji medycznych

The concept of a false-positive (result) in the context of COVID-19 diagnostics and medical recommendations

Ewelina Stoczynska-Fidelus^{1,2,3}, Piotr Rieske^{2,3,4}

¹Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

²Celther Polska Sp. z o.o., Laboratorium Naukowo-Badawcze, Konstancinów Łódzki, Polska

³Personather Sp. z o.o., Konstancinów Łódzki, Polska

⁴Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

STRESZCZENIE

COVID-19 stanowi bardzo duże wyzwanie dla diagnostyki. W przypadku wielu chorób i objawów istnieje możliwość powtórzenia badań, a czas przeznaczony na postawienie diagnozy liczony jest nawet w tygodniach, a nie godzinach jak w COVID-19. Sytuacja związana z COVID-19 prowadzi do dużej liczby napięć, zarówno wśród lekarzy diagnostów, jak i pacjentów, zwłaszcza że w tym przypadku na podstawie pozytywnego wyniku brano pod uwagę podjęcie decyzji nie tylko o wyborze ewentualnej terapii, lecz także o kwarantannie. W pracy odniesiono się do pojęcia wartości predykcyjnej testów stosowanych w diagnostyce COVID-19 (głównie RT-PCR), skupiając się na pojęciu wyniku fałszywie pozytywnego. Przedstawiono, że jest to pojęcie względne, w zależności od stawianego pytania, celu diagnostyki (zastosowanie terapii przeciwwirusowej, kwarantanna, wykrycie choroby) czy nawet wariantu wirusa SARS-CoV-2. Skuteczne szczepienia przeciwko COVID-19, coraz wyższy odsetek ozdrowieńców i pojawienie się wariantu omikron SARS-CoV-2 minimalizują wszystkie te problemy. Odejście od testów przesiewowych nie może jednak oznaczać, że zaniecha się w ogóle testowania w kierunku COVID-19, ponieważ część populacji nadal może umrzeć z powodu tej choroby, a istnieje już skuteczna terapia celowana. Na potrzeby personalizacji tego leczenia musi być stosowane badanie, takie jak RT-PCR.

SŁOWA KLUCZOWE

COVID-19, SARS-CoV-2, SPIKE, RT-PCR, szczepionka.

ABSTRACT

COVID-19 is an example of a big challenge for diagnostics. In the case of many diseases and syndromes, there is a possibility to repeat the tests, and the time allocated for diagnosis is counted even in weeks, not in hours, as in COVID-19. The situation related to COVID-19, therefore leads to a large number of tensions, both among diagnostic physicians and patients. Especially that in this case, based on a positive result, the decision is being made not only about the choice of a possible therapy, but also about quarantine. This article refers to the predictive value of tests used in the diagnosis of COVID-19 (mainly RT-PCR), focusing on the concept of

a false positive result. The article demonstrates that this is a relative term, depending on the question posed, the purpose of the diagnosis (selection of therapy, quarantine decision, disease detection), or even the variant of the SARS-CoV-2 virus. Effective vaccination against COVID-19, the increasing percentage of convalescent patients, and the emergence of the SARS-CoV-2 omicron variant minimize all these problems. However, shifting away from widely used screening tests, should not cause abandoning COVID-19 testing completely. Part of the population may still die from the disease and effective targeted therapy already exists. In order to personalize this therapy, a test such as RT-PCR must be used.

KEY WORDS

COVID-19, SARS-CoV-2, SPIKE, RT-PCR, vaccine.

ADRES DO KORESPONDENCJI

prof. dr hab. n. med. Piotr Rieske, Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska, e-mail: piotr.rieske@umed.lodz.pl

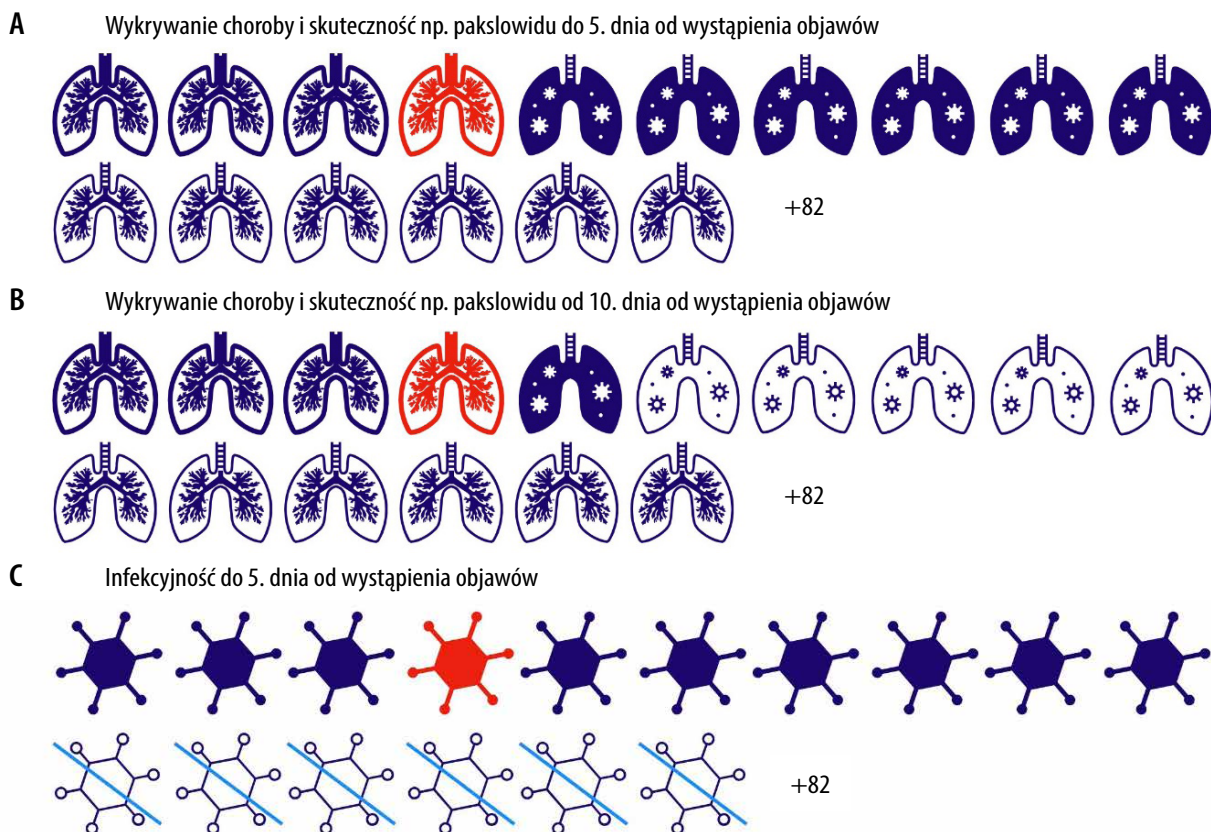
WYNIK FAŁSZYWIE POZYTYWNY

Wynik fałszywie pozytywny oznacza, że przeprowadzony test może wprowadzać w błąd. Uzyskujemy informację oznaczającą lub wskazującą na występowanie jakiegoś zjawiska, choroby lub markera, gdy to zjawisko, choroba lub marker są w istocie nieobecne [1]. Podstawowym problemem jest pojawianie się markera wskazującego na występowanie choroby (lub syndromu), gdy choroba (zespół) nie występuje [2]. Dla wielu sytuacji sprawa jest dość jednoznaczna. Za przykład można tu podać diagnostykę zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS). W teście diagnostycznym poszukuje się w komórkach badanej osoby RNA ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (HIV). Jeśli to RNA zostanie wykryte, oznacza to, że pacjent albo ma, albo rozwinie się u niego AIDS. Wynik fałszywie pozytywny to przypadek, kiedy wykrywa się RNA wirusa HIV w badanej próbce, podczas gdy pacjent nie ma zakażenia HIV. Przyczyny takiego zdarzenia mogą być różne. Próbkę mogła zostać zanieczyszczona materiałem od kogoś, kto ma infekcję HIV, próbka mogła zostać pomyłona itp. Czułość analityczna metody jest maksymalna. Umożliwia wykrycie nawet jednej molekule RNA w badanej próbce. Jest to zaleta, pod warunkiem że przestrzega się skrupulatnie zasad postępowania diagnostycznego. W przypadku HIV można jednak rozstrzygnąć, czy faktycznie doszło do błędu – powtórzyć nawet kilkakrotnie badanie. W przypadku HIV stosuje się również badania ilościowe i półilościowe RT-PCR (to zagadnienie omówiono dalej). Można również zbadać poziom przeciwciał przeciwko antygenom wirusa HIV, aby sprawdzić, czy infekcja ma miejsce. W przeciwieństwie do SARS-CoV-2, pozytywny wynik

badania RT-PCR oznacza prawie zawsze infekcję, ponieważ ta utrzymuje się latami [3, 4]. Również dla HIV podkreśla się przewagę testów PCR nad badaniami serologicznymi [5]. Wartość predykcyjną testu zwiększa fakt, że u prawie wszystkich zainfekowanych (ponad 99,9%), u których wykryje się RNA wirusa, rozwinie się AIDS, a pacjenci umrą, jeśli nie podejmie się leczenia [6, 7]. Jest to więc przykład optymistyczny w sensie wartości diagnostycznej testu RT-PCR i dzięki pojawianiu się skutecznej terapii. W zasadzie przy możliwości powtarzania badań swoistość (odsetek przypadków, w których nie wykryto RNA HIV, podczas gdy go nie było i nie wystąpi AIDS) sięga 100%. Czułość diagnostyczna (odsetek próbek, w których wykryto RNA HIV, podczas gdy to RNA faktycznie w próbce było) również wynosi 100%. Są to wyniki tzw. prawdziwie pozytywne. Co bardzo ważne, w przypadku HIV osoba, która otrzymuje wynik prawdziwie pozytywny, zawsze może zakażać.

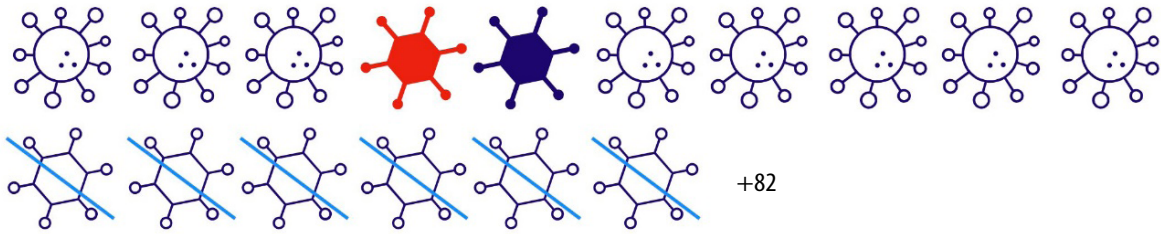
WYNIK FAŁSZYWIE POZYTYWNY W DIAGNOSTYCE COVID-19

Dlaczego diagnostyka COVID-19 jest bardziej skomplikowana? Do problemu tego odniesiono się schematycznie na rycinie 1. Test RT-PCR jest rekomendowaną przez WHO metodą wykrywania zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Należy więc zauważyć, że nie u wszystkich zainfekowanych SARS-CoV-2 rozwijają się objawy COVID-19 (inaczej niż w przypadku HIV) [8, 9]. Przy czym przez osoby bezobjawowe nie należy rozumieć jedynie presymptomatyczności, ale brak objawów w ciągu całego okresu infekcji i wydzielania remnantów wirusów [10]. Dodatkowo trzeba wspomnieć, że odsetek osób

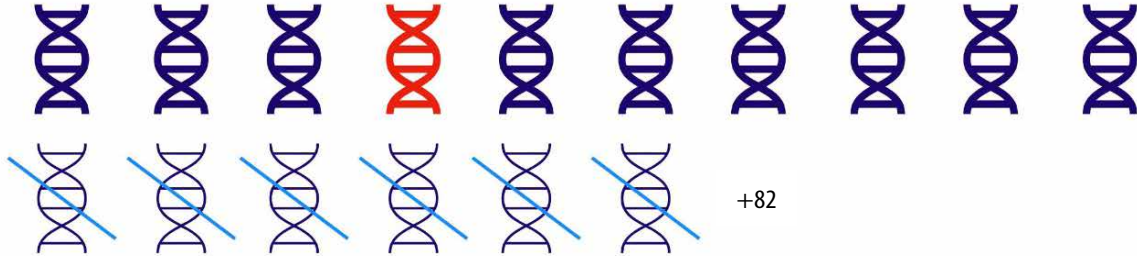


RYCINA 1. Infografika przedstawi w sposób poglądowy, jak zmienia się znaczenie pojęcia *wynik fałszywie pozytywny* w zależności od tego, jaki cel stawia się wykonywanemu badaniu diagnostycznemu. W proponowanej infografice posłużono się danymi dla wariantów od alfa do delta SARS-CoV-2. Infografika pokazuje problem w uproszczeniu, nie odzwierciedla dokładnych danych. W przypadku wariantu omikron SARS-CoV-2 zmniejsza się odsetek osób z chorobą (symptomatyczną) wśród zakażonych. Dla uproszczenia problemu interpretacji wyników fałszywie pozytywnych przyjęto 100-procentową czułość testów. Ponieważ praca skupia się na problemie wyników fałszywie pozytywnych, zaprezentowano problem swoistości, a nie czułości. Dla większej czytelności schematu nie pokazano większości (82/100) osób, które otrzymały wyniki prawdziwie negatywne. Problem doboru terapii i izolacji przedstawiono do 5. i od 10. dnia od wystąpienia objawów. Na infografice pominięto problem *long COVID-19*. Omówiono go jednak szerzej w tekście. **A** – Wykrywanie COVID-19 i skuteczność terapii przeciwwirusowej do 5. dnia od wystąpienia objawów. Cel testu: ocena, kto jest chory; u kogo stosować terapię przeciwwirusową (np. paksłowid). Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 96% w kierunku wykrywania, kto ma chorobę objawową. Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 96% w kierunku wykrywania, u kogo zastosować np. paksłowid. Wśród wszystkich pacjentów, u których zdiagnozuje się na podstawie testu COVID-19 (10/100), 60% (6/10) będzie miało objawy, natomiast 40% (4/10) nie ma choroby symptomatycznej (nie ma objawów i nie będzie miało) i nie ma sensu podawać im paksłowidu (koresponduje z częścią C). **B** – Wykrywanie COVID-19 i skuteczność terapii przeciwwirusowej od 10. dnia od wystąpienia objawów. Cel testu: ocena, kto jest chory; u kogo stosować terapię przeciwwirusową (np. paksłowid). Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 96% w kierunku wykrywania, kto ma chorobę objawową. Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 91% w kierunku wykrywania, u kogo zastosować paksłowid. Wśród wszystkich pacjentów, u których zdiagnozuje się COVID-19, (10/100), 60% (6/10) osób będzie miało objawy. 40% osób (4/10) z pozytywnym wynikiem testu nie ma i nie będzie miało choroby (symptomatycznej), ale po 10. dniu u 90% zdiagnozowanych z COVID-19 (9/10) paksłowid nie będzie najpewniej skuteczny. **C** – Wykrywanie osób zdolnych infekować do 5. dnia od wystąpienia objawów. Cel testu: ocena, kto ma infekcyjne wiriony. Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 99% w kierunku wykrywania, kto może infekować. Wśród wszystkich pacjentów, u których test będzie pozytywny (10/100), 90% (9/10) mogłoby infekować (koresponduje z częścią A)

D Infekcyjność od 10. dnia od wystąpienia objawów







E Wykrywanie molekuł wirusowych w trakcie obecności wirionów lub remnantów







Legenda


Osobę zdrową (bez objawów) symbolizują prawidłowe płuca:

-  Osoba zdrowa (bez objawów) i niezainfekowana SARS-CoV-2.
-  Osoba zdrowa (bez objawów), zainfekowana SARS-CoV-2, asymptomatyczna przez cały okres trwania infekcji.
-  Osoba bez wirionów SARS-CoV-2 i bez remnantów, która otrzymała prawidłowy negatywny wynik.
-  Osoba bez molekuły markerowej wirusa, która otrzymała prawidłowy negatywny wynik (wybrano symbol DNA, pomimo że SARS-CoV-2 to wirus RNA, zdecydowano tak ze względu na popularność symbolu).

 Osoby, które uzyskały wynik prawdziwie negatywny.

- Symbole czerwone:** Osoba, której próbkę zanieczyszczono materiałem genetycznym wirusa lub pomyłono.
-  Osoba, u której wykryto RNA wirusa i u której faktycznie ta molekuła występuje (wybrano symbol DNA, pomimo że SARS-CoV-2 to wirus RNA, zdecydowano tak ze względu na popularność symbolu).
-  Osoba, u której występują tylko remnanty wirusa SARS-CoV-2.
-  Osoba, u której występują wiriony (infekcyjne) wirusa SARS-CoV-2.

 Osoba chora do 5. dnia od wystąpienia objawów COVID-19. Osoba, u której zasadne jest stosowanie terapii przeciwwirusowej.

 Osoba chora od 10. dnia od wystąpienia objawów COVID-19 z remnantami SARS-CoV-2. Osoba, u której stosowanie terapii przeciwwirusowej, np. pakslowidu, nie ma sensu.

RYCINA 1. Cd. **D** – Wykrywanie osób zdolnych infekować od 10. dnia od wystąpienia objawów. Cel testu: ocena, kto ma infekcyjne wiriony. Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 91% w kierunku wykrywania, kto może infekować. Wśród wszystkich pacjentów, w których test będzie pozytywny (10/100), tylko 10% (1/10) mogłoby infekować. Z tego powodu w pewnym momencie zdecydowano się nie kontynuować kwarantanny, jeśli od pierwszego pozytywnego wyniku upłynęło kilkanaście dni. **E** – Wykrywanie molekuł wirusowych w trakcie obecności wirionów lub remnantów. Cel: wykrywanie molekuł wirusowych w materiale badanym. Czułość diagnostyczna 100%, swoistość 99%. Wśród wszystkich pacjentów, w których test będzie pozytywny (10/100), u 90% (9/10) faktycznie obecna jest molekuła markerowa wirusa

z objawami zmienia się w zależności od wariantu SARS-CoV-2 [11, 12]. Występują także takie zjawiska, jak *long COVID-19*. Siła predykcyjna testu (jeśli za cel postawi się wykrywanie choroby symptomatycznej) jest więc zmienna. Waha się w sposób skrajnie nie tylko w zależności od wariantu, lecz także w grupach wiekowych [13, 14]. Ponadto występują inne problemy, które w przypadku HIV praktycznie nie istnieją [15]. Nie każdy, u kogo wykrywa się molekuły RNA wirusa SARS-CoV-2, ma aktywną infekcję tym wirusem (wiremę). Po około 10 dniach od wystąpienia objawów (około 15 dni od infekcji) wykrywa się zazwyczaj wyłącznie remnanty wirionów (wirion

to upostaciowana zakaźna forma wirusa), a nie wiriony zakaźne. Problem ten (obecność remnantów) zaczyna występować już od około piątego dnia objawów [16–18]. Co to oznacza dla pojęcia wyniku fałszywie pozytywnego? W takich przypadkach wartość predykcyjna wykrywania choroby jest nadal bardzo dobra w takiej sytuacji. Osoby, u których wykrywa się remnanty, mogą mieć COVID-19 (choroba może, ale nie musi, wejść u nich nawet w II czy III fazę), ale osoby te nie będą zakażać albo ryzyko tego jest znikome.

Wykrycie samej choroby nie jest oczywiście jedynym problemem. Diagnostyka powinna umożliwić lub uła-

twić dobór terapii, a ta zmienia się w zależności od fazy COVID-19. Ze względu na szybkie pojawianie się remnantów leki przeciwwirusowe działają naprawdę skutecznie wyłącznie przez kilka dni od wystąpienia objawów [19–21]. Z każdym dniem ich skuteczność się zmniejsza. Bardzo ważne jest więc uświadomienie sobie, że pojęcie wyniku fałszywie pozytywnego nie jest jednoznaczne i wymaga szerszej interpretacji. Zależy ona od tego, o co pyta osoba zlecająca badanie. Pacjent z remnantami i bez wirionów SARS-CoV-2 może mieć COVID-19 (II/III faza), ale zastosowanie u niego paksłowidu nie ma sensu. Innymi słowy w przypadku stawiania pytania, o to, czy pacjent ma COVID-19, nie otrzyma się zazwyczaj wyniku fałszywie pozytywnego, pomimo że wykrywa się remnanty SARS-CoV-2. Natomiast taki wynik (fałszywie pozytywny) po dziesiątym dniu od wystąpienia objawów COVID-19 otrzyma osoba, która na podstawie testu PCR oczekuje odpowiedzi na pytanie, czy pacjent zakaża lub czy terapia przeciwwirusowa będzie skuteczna. Taka osoba, opierając się wyłącznie na wyniku badania RT-PCR i traktując je jako metodę wykrywania infekcyjnych wirionów, jeśli nie uwzględni czasu trwania objawów, otrzyma informację błędną, czyli wynik fałszywie pozytywny w takim zakresie postawionego pytania (czy badany nadal infekuje lub czy zastosować terapię przeciwwirusową) [22, 23]. Dlatego, co do zasady, nie kontynuowano kwarantanny po otrzymaniu nawet drugiego pozytywnego wyniku w badaniu RT-PCR, jeśli od pierwszego testu upłynęło kilkanaście dni. Od niedawna nie ma już wątpliwości co do tego, że terapie przeciw SARS-CoV-2 są naprawdę skuteczne do piątego dnia od wystąpienia objawów w przypadku wariantów alfa czy delta [24]. Trwają prace dotyczące skuteczności terapii u pacjenta zakażonego wariantem omikron SARS-CoV-2 i być może skuteczność ta trwa trochę dłużej, ale nie będzie to najpewniej więcej niż 10 dni od wystąpienia objawów [25]. Nie można jednak za to obwiniać testy RT-PCR. Przede wszystkim pacjenci muszą odpowiadać szczerze na pytanie, od kiedy mają objawy. Nie dowiemy się także dokładnie, jak często popełniono w takich przypadkach inny błąd – umożliwiono zakończenie kwarantanny osobom, które nadal infekowały. Zdarza się to zapewne podobnie rzadko jak to, że terapia przeciwwirusowa jest skuteczna dłużej niż do piątego czy nawet dziesiątego dnia od wystąpienia objawów. Wiemy o tym dzięki badaniom naukowym, a nie *stricte* diagnostycznym. Ze względu na koszt i stopień trudności analiz ocena tego, czy wyniki testów PCR faktycznie wykrywają wiriony infekcyjne czy jednak remnanty, nie może być wykonana nawet dla promila badanych przypadków. Wymaga to bowiem pobrania próbek od pacjenta i ustalenia, czy obecne są w nich wiriony infekcyjne z zastosowaniem hodowli komórkowych i długotrwałych badań *in vitro* [26, 27]. Do otrzymania wyniku upływa tyle czasu, że

nie ma to już znaczenia dla pacjenta. Prowadzenie badań RT-PCR wymaga zaostrzonych zasad bezpieczeństwa. Jednak nie da się ich porównać z działaniami wymaganymi przy badaniu aktywnych wirionów, a czas potrzebny na otrzymanie wyniku jest krótki. Możliwe jest to wyłącznie w laboratoriach klasy BL4, co tłumaczy, dlaczego analiza taka może być wykonana dla bardzo niewielkiego odsetka prób. Niemniej to właśnie te analizy pozwoliły stwierdzić, że po około piątym dniu od wystąpienia objawów u większości osób wiriony zamieniają się w remnanty (*viral debris* – gruz powirusowy). Naturalnie nie można powszechnie stosować takich badań. Istnieje jedynie możliwość oceny statystycznej.

Objawy związane z procesem neutralizacji wirionów w przypadku COVID-19 występują średnio u 30% do 70% zakażonych, w zależności od wariantu wirusa (najniższy odsetek wykazano dla wariantu omikron SARS-CoV-2), grupy wiekowej, poziomu wyszczepienia itd. Nie ma pewności, na ile wariant omikron SARS-CoV-2 jest mniej niebezpieczny, a na ile znaczenie ma to, że obecnie większość osób jest już zaszczepiona lub jest ozdowieńcami [11, 28]. W każdym razie szczepienia, zdecydowanie obniżając odsetek osób, u których COVID-19 przechodzi w II niebezpieczną i III ekstremalnie groźną fazę, komplikują proces decyzyjny. Podawanie terapii (jej personalizacja) zależy więc od bardzo wnikliwej oceny sytuacji, ustalenia z pacjentem, ile dni upłynęło od wystąpienia objawów, uwzględnienia dodatkowych zmiennych, takich jak wiek chorego, istnienie chorób współtowarzyszących itp. Szczera odpowiedź pacjenta na pytanie, ile dni upłynęło od wystąpienia objawów może mieć większe znaczenie niż pozytywny bądź negatywny wynik testu PCR, jeśli ma być podjęta decyzja o stosowaniu paksłowidu. Kolejne, bardzo trudne jest pytanie, czy test PCR stosować tylko u osób, które mają objawy. Podawanie molnupirawiru lub paksłowidu (składnik nirmatrelwir) może mieć sens u tych osób presymptomatycznych, u których występują wiriony i u których infekcja wywoła objawy, ale zanim one się pojawią. Zwiększa to szansę skuteczności terapii, ponieważ lek może zwalczać wiriony, zanim pojawią się objawy. Z reguły objawy występują po około 5 dniach od infekcji. U kogo więc ma sens takie działanie? Nie ma łatwej odpowiedzi na to pytanie. Bez wątpienia można wskazać osoby starsze z chorobami współtowarzyszącymi. Warto zauważyć, że w tym przypadku molnupirawiru albo paksłowid stosowany byłby jako premedykacja, ponieważ nie doszło jeszcze do wystąpienia objawów. Ze względu na skutki uboczne, szczególnie molnupirawiru, grupa tych osób powinna być szczególnie ostrożnie dobierana. Nadal brakuje dodatkowych testów diagnostycznych, które wykonane razem z badaniem RT-PCR pomogłyby stwierdzić, u kogo choroba wejdzie w II czy III fazę. Oczywiście bardzo trudno liczyć na to, że szybko

się pojawiają, ponieważ nie jest dokładnie znany mechanizm molekularny tego przejścia.

Premedykacja w COVID-19 prowadzona była z wykorzystaniem różnych leków. Wystarczy wspomnieć heparynę, antybiotyki przeciwbakteryjne czy sterydy [29–32]. Nie oznacza to jednak, że ma być kontynuowana bez testowania, a grupy, w których takie działanie może być rozważone, są coraz mniejsze. Wydaje się, że w przypadku takich osób lepsze jest monitorowanie ich stanu i stosowanie terapii po pojawieniu się objawów. Do tej pory nie ma markerów genetycznych czy biochemicznych pozwalających stwierdzić, komu zagraża w tym czasie zaostrzenie się objawów COVID-19, chociaż prace nad takimi markerami cały czas są prowadzone [33–35].

PROBLEM WARTOŚCI *CT* TESTÓW RT-PCR W DIAGNOSTYCE COVID-19

Bardzo często podnosi się, że unikanie wyników fałszywie pozytywnych mogłoby zostać osiągnięte dzięki obniżeniu wartości *Ct*, która jest brana pod uwagę, aby uznać, czy wynik testu jest pozytywny czy negatywny. Wartość *Ct* oznacza liczbę cykli PCR potrzebnych, aby dokonać detekcji jakiegoś fragmentu kwasu nukleinowego. Im wyższa jest ta wartość, tym mniej molekuł znajdowało się na początku reakcji w badanej próbce. Zdarzały się więc sugestie, aby obniżyć wartość *Ct* nawet do 25. W trakcie formułowania takich sugestii zapomina się bardzo często o tym, że zmniejszenie odsetka wyników fałszywie pozytywnych po takim zabiegu metodologicznym zwiększa z kolei odsetek wyników fałszywie negatywnych, czyli np. takich, kiedy pomimo obecności molekuly wirusa, stwierdza się, że jej nie ma w próbce [36–38]. Należy pamiętać, że w przypadku COVID-19 bardzo ważnym etapem jest samo pobranie materiału do badania. Błąd popełniony na tym etapie może powodować, że na wymazówce nie znajdzie się odpowiednia liczba zainfekowanych komórek. Wartość *Ct* nie jest więc wartością stałą u danego pacjenta w danym momencie. Zmienia się ona i to drastycznie w zależności od sposobu pobrania materiału. Przy błędach na tym etapie i obniżeniu wartości *Ct* można otrzymywać wyniki fałszywie negatywne [39, 40]. Fałszywie negatywny wynik otrzyma się również, jeśli infekcja dopiero się zaczyna i miano wirusa jest niskie, traktując tylko wyniki z niską wartością *Ct* jako pozytywne. Jak wspomniano powyżej, już na tak wczesnym etapie można byłoby rozważyć premedykację za pomocą terapii celowanej. Należy również przypomnieć, że w II fazie choroby zmniejsza się liczba wironów i że stopniowo redukuje się również liczba ich remnantów. Na tym etapie stosowanie molnupirawiru czy nirmatrelwiru (składnik paksłowidu) nie ma sensu, ale lekarze chcą wiedzieć, czy mogą mieć do czynienia z II czy nawet III fazą COVID-19, a obniże-

nie wartości *Ct* prowadziłyby do błędnych danych w tym względzie. W badaniach RT-PCR na wysoką wartość *Ct* mają wpływ również substancje hamujące reakcję, które mogą trafić do materiału badanego. Ogólnie zastosowanie badań molekularnych czy nawet biochemicznych wynikało z tego, że najczęściej chorobom nie towarzyszą objawy patognomiczne (charakterystyczne dla danej jednostki chorobowej). Ponadto zawsze zdarzały się przypadki symulacji. Testy te mają więc także za zadanie obiektywizować ocenę. W przypadku niektórych wariantów COVID-19 bardzo pomocna była ocena utraty węchu. Jednak jest to typowy objaw, dla którego nie ma w pełni obiektywnych kryteriów i łatwo go symulować, a w przypadku wariantu omikron SARS-CoV-2 występuje bardzo rzadko [11]. Niemniej zdarzały się przypadki, kiedy pomimo braku pozytywnego wyniku testu PCR, prawidłowo diagnozowano COVID-19, uwzględniając ten i inne objawy [16]. Były to więc przypadki, w których badanie RT-PCR prowadziło do otrzymania fałszywie negatywnych wyników. Zgodnie z zaleceniami WHO w celu poprawienia swoistości analitycznej badano więcej niż jeden fragment genomu SARS-CoV-2 [41].

Osoby zaznajomione z testami dotyczącymi innych infekcji wirusowych zwracają niekiedy uwagę, że np. w diagnostyce AIDS używa się testów półilościowych czy nawet ilościowych [42]. Testy takie eliminują pewne problemy, które tutaj opisano. Są one stopniowo opracowywane, także dla zakażeń SARS-CoV-2. Trzeba jednak mieć świadomość, że w związku z dynamiką COVID-19 w porównaniu z AIDS nie będą one miały tak dużego znaczenia. Trzeba przyznać, że w przypadku badania przeciwciał zawsze otrzymuje się wynik półilościowy lub nawet ilościowy, co przy wyższych mianach daje większe poczucie komfortu diagnostyce informującemu, że wynik jest pozytywny [43].

LONG COVID-19 A TESTY RT-PCR

Long COVID-19 jest zjawiskiem, które bardzo trudno badać i definiować [44, 45]. Ostatnio pojawiają się doniesienia, że nieco częściej występują ponowne okresy infekcyjności u osób z long COVID-19, ewentualnie okresy produkcji niektórych molekuł wirusa [46]. W tej chwili wiadomo, że w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) czy łożysku molekuly wirusa SARS-CoV-2 potrafią się utrzymywać nawet do roku od wystąpienia pierwszych objawów [47, 48]. Nie jest pewne, czy SARS-CoV-2 nie zachowuje się w tym czasie podobnie jak np. wirus opryszczki i nie występują okresy powrotu do zdolności infekcyjnych u pacjentów z long COVID-19. Bardzo trudno odróżnić takie zjawiska od ponownej infekcji [49]. To pokazuje, jak skomplikowana jest diagnostyka w przypadku COVID-19 i próba udzielenia odpowiedzi

na pytania, czy pacjent infekuje lub nie, a nawet czy jest chory lub jest definitywnie ozdrowieńcem. Aktualnie uznaje się jednak, że problem ponownego nabywania zdolności do infekcji wynikający z przetrwania wirusa występuje ekstremalnie rzadko lub wcale i nie powinien być brany pod uwagę przy ustalaniu, kto może zakończyć kwarantannę. Przyjmuje się, że jest to tzw. *shedding*, a nie wydzielanie aktywnych wirionów [50]. Wydaje się, że w przypadku *long* COVID-19 badanie RT-PCR nie może być stosowane ani po to, żeby skierować pacjenta na izolację, ani, żeby podjąć odpowiednie działanie *stricte* medyczne – terapeutyczne. Szansa na skuteczność testu jest znikoma, nawet jeśli występują przetrwałe mikroinfekcje. W praktyce, ze względu na immunotolerancję, mikroinfekcje mogą być miejscowo ograniczone do np. OUN i nie wykryje się ich, wykonując wymaz z nosogardzieli. Mikroinfekcje nie muszą w ogóle prowadzić do cyklicznej zakaźności (tak jak w opryszczce), ponieważ mogą być ograniczone do organów, w których występuje immunotolerancja.

Long COVID-19 z pewnością może prowadzić do kalectwa, a nawet przyczynić się do śmierci. Długotrwałe zaburzenia węchu to jeden z sygnałów sugerujących, że *long* COVID-19 może się przyczynić do większej liczby demencji w następnych latach [51]. Po przejściu COVID-19 częściej dochodzi do wystąpienia chorób układu krążenia [52] lub cukrzycy [53]. Problem pojawiania się wirionów w *long* COVID-19 powinien być nadal analizowany, ponieważ leki, takie jak molnupirawir czy paksłowod, mogłyby być tu skuteczne, jeśli faktycznie za *long* COVID-19 odpowiadają przetrwałe cykliczne mikroinfekcje ograniczone do miejsc immunotolerancji.

TESTY RT-PCR NA ZAKAŻENIE SARS-COV-2 A DIAGNOSTYKA RÓŻNICOWA COVID-19 Z INNYMI CHOROZAMI UKŁADU ODDECHOWEGO

Wiadomo, że nie tylko SARS-CoV-2 może powodować niektóre objawy, które występują w COVID-19. Nie wszyscy pacjenci tracą węch. W związku z tym, że nie u wszystkich SARS-CoV-2 powoduje objawy, zastosowanie badań molekularnych dotyczy nie tylko problemu diagnostyki tej choroby, lecz także diagnostyki różnicowej z innymi chorobami, w których dochodzi chociażby do zapalenia płuc [54–56]. Między innymi dlatego próbowano wprowadzać testy pozwalające na jednoczesne wykrywanie różnych wirusów razem z wirusem SARS-CoV-2, np. wirusów grypy [57]. W przypadku testów różnicowych większe znaczenie okazało się mieć jednak uwzględnianie ogólnej sytuacji epidemicznej w skojarzeniu z wirulencją występującego lub dominującego w danym okresie wariantu SARS-CoV-2. Być

może testy takie (różnicujące) będą częściej stosowane. Do tej pory świadomość tego, że zwiększa się ryzyko zakażenia SARS-CoV-2 w związku ze zwiększającą się liczbą przypadków miało wpływ na stawianie prawidłowej diagnozy. Jednocześnie jednak wariant omikron SARS-CoV-2 stanowi przykład zmiany podejścia, pomimo bardzo dużej infekcyjności i narastania liczby zakażeń. Oczywiście w przypadku infekcji różnymi patogenami odmienne terapie są skuteczne. Wydaje się, że remdesiwir ma dość szerokie spektrum działania, ale na pewno nie jest skuteczny w grypie i chorobach wirusowych [58]. Nie ma do tej pory danych na temat, czy nirmatrelwir ma szersze spektrum działania, ale jest to wątpliwe. Nie ma więc w zasadzie możliwości wyboru właściwej terapii bez identyfikacji patogenu czy nawet wykonania antybiogramu (bakterie). Dzięki olbrzymim wysiłkom opracowano skuteczne leki przeciw COVID-19. Można je zastosować, jeśli odróżni się COVID-19 od innych chorób, między innymi dzięki badaniom, takim jak RT-PCR [59]. Możliwe jest także wsparcie poprzez zastosowanie innych metod diagnostycznych [60]. Należy jednak znowu przypomnieć, że leki antywirusowe w przypadku COVID-19 działają tylko przez kilka dni od wystąpienia objawów [61].

WYKRYWANIE COVID-19, KWARANTANNA, NADAWANIE STATUSU OZDROWIENCA I OCENA SKUTECZNOŚCI SZCZEPIEŃ ZA POMOCĄ RT-PCR

Bardzo wiele emocji towarzyszy określaniu osób bezobjawowych chorymi. Znacznie mniej emocji pojawia się przy nadawaniu statusu ozdrowieńca osobom, które miały pozytywne wyniki testów PCR, a nie miały objawów. Pomimo że testy PCR mogą dawać w niewielkim odsetku wyniki fałszywie pozytywne, właściwie nikt nie protestował przeciwko nadawaniu statusu ozdrowieńca osobom, które miały taki wynik. Tymczasem przy masowym testowaniu liczba takich osób mogła być niebagatelna [12]. Warto zauważyć, że jeśli test daje 1% wyników fałszywie pozytywnych, ale zostanie wykonany masowo, np. u 100 milionów osób, to 1 milion otrzyma wynik fałszywie pozytywny i zostanie skierowany na kwarantannę, ale również otrzyma status ozdrowieńca. Jest to jedna z przyczyn, dla których stopniowo odchodzono od tego statusu i zachęcano do szczepień nawet wśród ozdrowieńców. Trzeba też dodać, że jeśli w tym 1 milionie osób z wynikiem fałszywie pozytywnym były osoby zaszczepione, można stwierdzić, iż szczepienie nie chroni przed infekcją, chociaż wcale nie musi być to prawda. Bardzo ciekawie w tym przypadku wypada ocena przeciwciał przeciwko białkom wirusa SARS-CoV-2. Wykrywa się je u około 70% do 100% ozdrowieńców. Najczęściej są to przeciwciała

przeciwno białku SPIKE [62–64]. Odpowiedź na pytanie, dlaczego nie u wszystkich ozdrowieńców występuje czy wykrywa się przeciwciała, nie jest jednoznaczna. Z jednej strony pokazuje to, że testy PCR są bardzo skuteczne, z drugiej – może być wskazówką, iż część wyników RT-PCR była fałszywie pozytywna i dlatego u niektórych osób ze statusem ozdrowieńca nie wykrywa się przeciwciał. Tego zagadnienia nie da się jednak sprowadzić wyłącznie do problemu fałszywie pozytywnych wyników. Nie wolno zapominać, że w przypadku chorób, takich jak COVID-19, przeciwciała nie muszą odgrywać najważniejszej roli w trakcie eliminacji infekcji. Zadanie to mogą wykonywać limfocyty cytotoksyczne [65, 66]. Badań tych limfocytów w walce z SARS-CoV-2 właściwie się nie wykonuje, ponieważ są one bardzo drogie i czasochłonne. Prowadzone badania naukowe wskazują jednak, że zjawisko takie występuje [67]. Oznacza to więc, że badania PCR spełniły zadanie na tyle, na ile było to możliwe w opisanej sytuacji. Trzeba dodać, że badania przeciwciał skierowanych przeciw SPIKE do ustalania, kto jest ozdrowieńcem, straciły na znaczeniu w związku ze szczepieniami. Po szczepieniach pojawiają się przeciwciała przeciwko SPIKE SARS-CoV-2. Oczywiście można jeszcze prowadzić badania na obecność przeciwciał przeciwko innym antygenom SARS-CoV-2, takim jak białko N czy M, które mogą mieć tylko ozdrowieńcy, ale przeciwciała te nie zawsze są wytwarzane w czasie infekcji [68, 69]. Wskazuje to zresztą kolejny raz, że przejście infekcji nie wymusza zawsze otrzymania przeciwciał dla wszystkich antygenów, a więc brak przeciwciał przeciw SPIKE nie może być traktowany jako dowód na to, że test RT-PCR dał wynik fałszywie pozytywny.

ZMIANY W REKOMENDACJACH DO TESTOWANIA WYNIKAJĄCE Z POJAWIENIA SIĘ WARIANTU OMIKRON SARS-COV-2 I NABYWANIA ODPORNOŚCI W POPULACJI

Przedstawione dotychczas problemy diagnostyki uświadamiają, jak ważne były szczepienia przeciwko COVID-19. W przypadku szczepienia nie ma wątpliwości, czy wyniki RT-PCR albo badania serologicznego są fałszywie pozytywne (pomijając kwestię fałszowania certyfikatów). Szczepienia są zdecydowanie bardziej skuteczne niż oczekiwano na początku pandemii, szczególnie uwzględniając czas, w jakim szczepionki powstały [70, 71]. Bez wątpliwości szczepienia przyczyniły się do zmniejszenia liczby koniecznych hospitalizacji, a pojawienie się wariantu omikron dodatkowo zredukowało niebezpieczeństwo wystąpienia COVID-19 (symptomatycznego). W przeciwieństwie do szczepień prowadzonych w dowolnym momencie, w przypadku decyzji terapeutycznych były one bardzo skomplikowane, a musiały być podejmo-

wane w ciągu dni, a czasem godzin. Szczepienia umożliwiły więc w przypadku wielu osób zapobieganie dylematom, które opisano powyżej w odniesieniu do diagnostyki COVID-19. Szczepienia z pewnością przyczyniają się również do poprawienia skuteczności terapii przeciwwirusowych. Warto również dodać, że ciągłe testy przesiewowe sugerują mniejszą skuteczność szczepień przeciwko zakażeniu niż w rzeczywistości ma ona miejsce. Ponownie można wskazać, że po przetestowaniu 100 milionów osób u 1 miliona stwierdzi się infekcję, pomimo że jej nie ma przy teście pozwalającym uzyskać 99% prawidłowych wyników.

Zmiany rekomendacji wynikające z pojawienia się wariantu omikron mają więc różne podstawy, w tym diagnostyczne [3, 72]. W przypadku wariantu omikron SARS-CoV-2 obserwuje się bardzo wysoką redukcję odsetka osób wymagających hospitalizacji, jak również osób z objawami [11]. Oznacza to, że wartość predykcyjna testów molekularnych służących wykrywaniu choroby (objawowej) zmniejszyła się. W tej sytuacji stosowanie testów przesiewowych staje się jeszcze bardziej kontrowersyjne, jeśli weźmie się pod uwagę idealny test, który umożliwiłby otrzymanie 1% wyników fałszywie pozytywnych. Należy podkreślić, że dostępne do badań testy nie pozwalają stwierdzić, z jakim wariantem mamy do czynienia. Bazuje się w tym przypadku na analizach populacyjnych [73]. Poza faktem pojawienia się łagodniejszego wariantu, bez wątpliwości znaczenie dla zmiany rekomendacji mają trzy inne czynniki. Współistnienie tych zmiennych trudno w ogóle oddzielić. Po pierwsze, mamy obecnie wysoki odsetek ozdrowieńców, po drugie – wysoki odsetek osób zaszczepionych (w tym zaszczepionych ozdrowieńców), po trzecie – niestety populacja zmniejszyła się o osoby najbardziej zagrożone śmiercią z powodu tej choroby [74–76]. Gdy epidemia wygasa, wzrasta prawdopodobieństwo błędnego zakwalifikowania pacjenta w czasie testów przesiewowych [12]. Nie zmienia to jednak faktu, że pozostała wciąż część osób jest podatna [77]. Brak rekomendacji dotyczących wykonywania testów przesiewowych nie powinien być rozumiany jako zachęta do zaniechania testów w ogóle, szczególnie że istnieje skuteczne leczenie (paksłowod). Bez testów i stosowania paksłowidu część tych osób umrze [78]. Określenie *testy przesiewowe* jest niejednoznaczne [12]. W Polsce nie stosowano testów przesiewowych w takim znaczeniu jak np. w Niemczech [79]. Wykonywanie testów RT-PCR powszechnie w szpitalnictwie ma inne znaczenie niż stosowanie ich w populacji zdrowej. Pacjenci na oddziałach szpitalnych częściej należą do grup ryzyka. Odporność na COVID-19 wśród tych grup spada szybciej [80]. Rekomendacja, aby nie stosować badań przesiewowych, nie powinna być przyczynkiem do zaniechania testowania na COVID-19 w ogóle, ponieważ wykonywanie testów pomoże zapobie-

gać śmierci osób podatnych, a istnieje bardzo skuteczne leczenie [78].

PODSUMOWANIE

Diagnostyka COVID-19 jest bardzo trudna ze względu na to, że powinna być wykonana w ciągu kilkunastu godzin od zgłoszenia się pacjenta do badania. Bez właściwej diagnostyki i szczepień, jak również pojawiania się ozdrowieńców niemożliwe było lepsze postępowanie niż częste testowanie techniką RT-PCR. Obecnie możliwe jest ograniczenie stosowania testów do osób z grup ryzyka, ale nie rezygnacja z nich. Odchodzenie od testowania jest błędem, szczególnie że istnieje skuteczna terapia celowana, a bez tego leczenia wiele osób z pewnością jeszcze umrze z powodu COVID-19. Testy RT-PCR powinny być częścią procesu personalizacji terapii w tej chorobie.

KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy są członkami międzynarodowego zespołu opracowującego terapię przeciw COVID-19. Terapia ta nie została opisana w artykule.

PIŚMIENNICTWO

1. Tharwat A. Classification assessment methods. *Applied Computing and Informatics* 2018. doi:10.1016/j.aci.2018.08.003
2. Olliaro P, Torreale E. Managing the risks of making the wrong diagnosis: first, do no harm. *Int J Infect Dis* 2021; 106: 382-5.
3. Peeling RW, Heymann DL, Teo YY, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *Lancet* 2022; 399: 757-68.
4. Abraham SA, Girma M, Habteselassie A, et al. Diagnostic accuracy of HIV test kits, Genscreen Ultra and Bioelisa. *HIV/AIDS* 2019; 11: 17-22.
5. Reid J, Van Zyl G, Linström M, et al. High positive HIV serology results can still be false positive. *IDCases* 2020; 21: e00849.
6. False-Positive HIV Test Results False-Positive Results and Specificity; 2018. <https://www.cdc.gov/hiv/pdf/testing/cdc-hiv-factsheet-false-positive-test-results.pdf>
7. Figueroa C, Johnson C, Ford N, et al. Reliability of HIV rapid diagnostic tests for self-testing compared with testing by health-care workers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* 2018; 5: e277-90.
8. Wilmes P, Zimmer J, Schulz J, et al. SARS-CoV-2 transmission risk from asymptomatic carriers: Results from a mass screening programme in Luxembourg. *Lancet Regional Health - Europe* 2021; 4: 100056.
9. Ma Q, Liu J, Liu Q, et al. Global percentage of asymptomatic SARS-CoV-2 infections among the tested population and individuals with confirmed COVID-19 diagnosis. *JAMA Network Open* 2021; 4: e2137257.
10. Sah P, Fitzpatrick MC, Zimmer CF, et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci* 2021; 118: e2109229118.
11. Menni C, Valdes AM, Polidori L, et al. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. *Lancet* 2022; 399: 1618-24.
12. Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. *Nature Rev Genet* 2021; 22: 415-26.
13. Monod M, Blenkinsop A, Xi X, et al. Age groups that sustain re-surgency COVID-19 epidemics in the United States. *Science* 2021; 371: 6536.
14. Zimmermann P, Curtis N. Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. *Arch Dis Childhood* 2020:archdischild-2020-320338. doi:10.1136/archdischild-2020-320338.
15. Bhattacharyya R, Kundu R, Bhaduri R, et al. Incorporating false negative tests in epidemiological models for SARS-CoV-2 transmission and reconciling with seroprevalence estimates. *Sci Rep* 2021; 11: 9748.
16. Lekpa FK, Njonou SRS, Balti E, et al. Negative antigen RDT and RT-PCR results do not rule out COVID-19 if clinical suspicion is strong. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: 1209.
17. Zhang Z, Bi Q, Fang S, et al. Insight into the practical performance of RT-PCR testing for SARS-CoV-2 using serological data: a cohort study. *Lancet Microbe* 2021; 2: e79-87.
18. Surkova E, Nikolayevskyy V, Drobniewski F. False-positive COVID-19 results: hidden problems and costs. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 1167-8.
19. Burki TK. The role of antiviral treatment in the COVID-19 pandemic. *Lancet Respir Med* 2022; 10: e18.
20. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early remdesivir to prevent progression to severe Covid-19 in outpatients. *N Engl J Med* 2022; 386: 305-15.
21. Wen W, Chen C, Tang J, et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19: a meta-analysis. *Ann Med* 2022; 54: 516-23.
22. Piralla A, Ricchi M, Cusi MG, et al. Residual SARS-CoV-2 RNA in nasal swabs of convalescent COVID-19 patients: is prolonged quarantine always justified? *Int J Infect Dis* 2021; 102: 299-302.
23. Fan H, Lou F, Fan J, et al. The emergence of powerful oral anti-COVID-19 drugs in the post-vaccine era. *Lancet Microbe* 2022; 3: e91,
24. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, et al. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19. *N Engl J Med* 2022; 386: 1397-408.
25. Puhach O, Adea K, Hulo N, et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated patients infected with SARS-CoV-2 WT, Delta and Omicron. *medRxiv* 2022. doi:10.1101/2022.01.10.22269010.
26. Cevik M, Tate M, Lloyd O, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* 2021; 2: e13-22.
27. Badu K, Oyebola K, Zahouli JZB, et al. SARS-CoV-2 viral shedding and transmission dynamics: implications of WHO COVID-19 discharge guidelines. *Front Med* 2021; 8: 648660.
28. COVID-19 Modeling. Johns Hopkins Berman Institute of Bioethics. <https://bioethics.jhu.edu/research-and-outreach/covid-19-bioethics-expert-insights/resources-for-addressing-key-ethical-areas/grappling-with-the-ethics-of-social-distancing/covid-19-modeling/>

29. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 – preliminary report. *N Engl J Med* 2021; 384: 693-704.
30. Corticosteroids. COVID-19 Treatment Guidelines. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/immunomodulators/corticosteroids/>
31. FDA In Brief: FDA warns that fluoroquinolone antibiotics can cause aortic aneurysm in certain patients. FDA. Published online December 20, 2019. <https://www.fda.gov/news-events/fda-brief/fda-brief-fda-warns-fluoroquinolone-antibiotics-can-cause-aortic-aneurysm-certain-patients>
32. Cong W, Poude AN, Alhusein N, et al. Antimicrobial use in COVID-19 patients in the first phase of the SARS-CoV-2 pandemic: a scoping. *Antibiotics* 2021; 10: 745.
33. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature* 2021; 600: 472-7.
34. Biji A, Khatun O, Swaraj S, et al. Identification of COVID-19 prognostic markers and therapeutic targets through meta-analysis and validation of Omics data from nasopharyngeal samples. *EBioMedicine* 2021; 70: 103525.
35. Nicholson CJ, Wooster L, Sigurssdottir HH, et al. Estimating risk of mechanical ventilation and in-hospital mortality among adult COVID-19 patients admitted to Mass General Brigham: the VICE and DICE scores. *EClinicalMedicine* 2021; 33: 100765.
36. Platten M, Hoffmann D, Grosser R, et al. SARS-CoV-2, CT-values, and infectivity – conclusions to be drawn from side observations. *Viruses* 2021; 13: 1459.
37. Layfield LJ, Camp S, Bowers K, Miller DC. SARS-CoV-2 detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction testing: analysis of false positive results and recommendations for quality control measures. *Pathol Res Pract* 2021; 225: 153579.
38. Okoye GA, Kamara HI, Strobeck M, et al. Diagnostic accuracy of a rapid diagnostic test for the early detection of COVID-19. *J Clin Virol* 2022; 147: 105023.
39. Rhoads D, Peaper DR, She RC, et al. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: caution must be used in interpreting the cycle threshold (Ct) value. *Clin Infect Dis* 2020; 72: e685-6.
40. An Overview of Cycle Threshold Values and Their Role in SARS-CoV-2 Real-Time PCR Test Interpretation 1 FOCUS on an Overview of Cycle Threshold Values and Their Role in SARS-CoV-2 Real-Time PCR Test Interpretation.; 2020. <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/main/2020/09/cycle-threshold-values-sars-cov2-pcr.pdf?la=en>
41. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. www.who.int. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>
42. Gueudin M, Leoz M, Lemée V, et al. A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 831-6.
43. Tretyn A, Szczepanek J, Skorupa M, et al. Differences in the concentration of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies post-COVID-19 recovery or post-vaccination. *Cells* 2021; 10: 1952.
44. Marx V. Scientists set out to connect the dots on long COVID. *Nature Methods* 2021; 18: 449-53.
45. Soriano JB, Murthy S, Marshall JC, et al. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis* 2022; 22: e102-7.
46. Zhang L, Richards A, Barrasa MI, et al. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118: e2105968118.
47. Maccio U, Zinkernagel AS, Schuepbach R, et al. Long-term persisting SARS-CoV-2 RNA and pathological findings: lessons learnt from a series of 35 COVID-19 autopsies. *Front Med* 2022; 9: 778489.
48. Wu H, Liao S, Wang Y, et al. Molecular evidence suggesting the persistence of residual SARS-CoV-2 and immune responses in the placentas of pregnant patients recovered from COVID-19. *Cell Proliferation* 2021; 54: e13091.
49. To KKW, Hung IFN, Ip JD, et al. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin Infect Dis* 2021; 73: e2946-51.
50. Agarwal V, Venkatakrishnan AJ, Puranik A, et al. Long-term SARS-CoV-2 RNA shedding and its temporal association to IgG seropositivity. *Cell Death Discov* 2020; 6: 138.
51. Douaud G, Lee S, Alfaro-Almagro F, et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* 2022; 604: 697-707.
52. Xie Y, Xu E, Bowe B, Al-Aly Z. Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nat Med* 2022 doi:10.1038/s41591-022-01689-3.
53. Lim S, Bae JH, Kwon HS, Nauck MA. COVID-19 and diabetes mellitus: from pathophysiology to clinical management. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 11-30.
54. Thein TL, Ang LW, Young BE, et al. Differentiating coronavirus disease 2019 (COVID-19) from influenza and dengue. *Sci Rep* 2021; 11: 19713.
55. Sharma R, Agarwal M, Gupta M, et al. Clinical characteristics and differential clinical diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). In: *Medical Virology From Pathogenesis to Disease Control*. Springer 2020: 55-70.
56. Swets MC, Russell CD, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. *Lancet* 2022; 339: 1463-64.
57. Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, et al. Clinical validation of a multiplex PCR-based detection assay using saliva or nasopharyngeal samples for SARS-Cov-2, influenza A and B. *Sci Rep* 2022; 12: 3480.
58. Malin JJ, Suárez I, Priesner V, et al. Remdesivir against COVID-19 and other viral diseases. *Clin Microbiol Rev* 2020; 34. doi:10.1128/CMR.00162-20.
59. Lv DF, Ying QM, He YW, et al. Differential diagnosis of coronavirus disease 2019 pneumonia or influenza A pneumonia by clinical characteristics and laboratory findings. *J Clin Lab Anal* 2021; 35: e23685.
60. Guarnera A, Podda P, Santini E, et al. Differential diagnoses of COVID-19 pneumonia: the current challenge for the radiologist – a pictorial essay. *Insights Imaging* 2021; 12: 34.
61. Fistera D, Härtl A, Pabst D, et al. What about the others: differential diagnosis of COVID-19 in a German emergency department. *BMC Infect Dis* 2021; 21: 969.
62. Liu W, Russell RM, Bibollet-Ruche F, et al. Predictors of nonse-roconversion after SARS-CoV-2 infection. *Emerg Infect Dis* 2021; 27: 2454-58.
63. Petersen LR, Sami S, Vuong N, et al. Lack of antibodies to severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in a large cohort of previously infected persons. *Clin Infect Dis* 2020; 73: e3066-73.
64. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; 26: 845-8.

65. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 2022; 23: 186-93.
66. Niessl J, Sekine T, Buggert M. T cell immunity to SARS-CoV-2. *Semin Immunol* 2021; 55: 101505.
67. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020; 584: 457-62.
68. Tutukina M, Kaznadzey A, Kireeva M, Mazo I. IgG antibodies develop to spike but not to the nucleocapsid viral protein in many asymptomatic and light COVID-19 cases. *Viruses* 2021; 13: 1945.
69. Jörrißen P, Schütz P, Weiland M, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 membrane protein in patients of the acute and convalescent phase of COVID-19. *Front Immunol* 2021; 12: 679841.
70. Rieske P. Vaccine against COVID-19 or against SARS-CoV-2 infection? *Pol J Allergol* 2020; 7: 131-45.
71. Lin DY, Gu Y, Wheeler B, et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines over a 9-month period in North Carolina. *N Engl J Med* 2022; 386: 933-41.
72. Zalecenia Postępowania Diagnostycznego W Sytuacji Zmniejszenia Zagrożenia Epidemicznego Związane Z COVID-19 Wersja 1.0 Agencja Oceny Technologii Medycznych I Taryfikacji. Accessed April 12, 2022. https://www.prawo.pl/gfx/prawopl/userfiles/_public/zdrowie/dokumenty/stanowiska_covid_marzec_2022/aotmit_sstrategia_w_sytuacji_zmniejszenia_zagrozenia_epidemicznego_covid-19_2022.03.22.pdf
73. Allen H, Tessier E, Turner C, et al. Comparative transmission of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) variants and the impact of vaccination: national cohort study, England. *MedRxiv* 2022. doi:10.1101/2022.02.15.22271001.
74. Davies MA, Kassanjee R, Rousseau P, et al. Outcomes of laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection in the Omicron-driven fourth wave compared with previous waves in the Western Cape Province, South Africa. *MedRxiv* 2022. doi:10.1101/2022.01.12.22269148.
75. Kojima N, Klausner JD. Protective immunity after recovery from SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis* 2021; 22: 12-4.
76. Madhi AS, Ihekweazu C, Rees H, Pollard AJ. Decoupling of omicron variant infections and severe COVID-19. *Lancet* 2022; 399: 1047-8.
77. Rahav G, Lustig Y, Lavee J, et al. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in immunocompromised patients: a prospective cohort study. *EclinicalMedicine* 2021; 41: 101158.
78. Li P, de Vries AC, Kamar N, et al. Monitoring and managing SARS-CoV-2 evolution in immunocompromised populations. *Lancet Microbe* 2022; 3: E325-6.
79. Kühn MJ, Abele D, Binder S, et al. Regional opening strategies with commuter testing and containment of new SARS-CoV-2 variants in Germany. *BMC Infect Dis* 2022; 22: 333.
80. Peng Q, Zhou R, Wang Y, et al. Waning immune responses against SARS-CoV-2 variants of concern among vaccinees in Hong Kong. *eBioMedicine* 2022; 77: 103904.