

8. BÖLÜM / CHAPTER 8

COVID-19 Küresel Salgınında Virüs Spesifik Koruyucu Serum İmmünoglobulin G Antikor Taraması: Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deneyimi

Virus Specific Serum Immunoglobulin G Antibody Screening in COVID-19 Pandemia: Experience of Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine

Fatma Betül Öktelek¹ , Vuslat Yılmaz² , Şenol Işıldak² , Metin Yusuf Gelmez¹ , Nilgün Akdeniz¹ , Günnur Deniz¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

e-posta: gdeniz@istanbul.edu.tr

ORCID: F.B.Ö. 0000-0002-7994-5618; V.Y. 0000-0002-4809-2966; Ş.I. 0000-0002-2043-336X; M.Y.G. 0000-0002-5279-0855;

N.A. 0000-0002-6208-3193; G.D. 0000-0002-0721-6213

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda, COVID-19 küresel salgınında, aynı işyerinde çalışan kişilerdeki SARS-CoV-2 virüs spesifik antikor üretimi değerlendirildi ve asemptomatik bireylerde de koruyucu bağışık yanıtın gelişip gelişmeyeceği sorusuna cevap arandı.

Gereç ve Yöntem: Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitü (DETAE) personeli için virüs- spesifik immünoglobulin G (IgG) antikorlarının tespitine yönelik bir tarama gerçekleştirildi. Antikor varlığı, donörlerin serum örneklerinde, EUROIMMUN anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG kiti ile ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi.

Bulgular: Çalışmaya dahil olan asemptomatik 77 gönüllü personelin 7'sinde SARS-CoV-2 virüsüne karşı gelişen IgG tipi antikor saptanırken, bir kişinin antikor sonucu sınırdan olarak değerlendirildi. Antikor pozitifliği saptanan bireylerin 6'sı kadın 1'i erkek idi. Tüm personel arasında dört kişiye temas/öykü hikayesi bulunmaktaydı. Antikor pozitif olgulardan 1 ay sonra tekrar alınan serum örneklerinde de antikor düzeyinin zamana bağlı değişimi değerlendirildi. Farklı zamanlarda alınan serumlardaki antikor düzeyleri arasında istatistiksel bir fark bulunmadı.

Sonuç: Verilerimiz, asemptomatik bireylerde de virüs-spesifik antikor pozitifliği saptanmasının mümkün olabileceğini ve bunun da başarılı bir bağışıklık yanıtın göstergesi olduğunu desteklemektedir. Hastalığı geçirdiği bilinen ve immün plazma vericisi olmayan olgularda da antikor taramasının yapılması toplumsal bağışıklığın değerlendirilmesi bakımından da önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Anti-SARS-CoV-2, ELISA, COVID-19, IgG Antikor

ABSTRACT

Aim: We aimed to evaluate the virus-specific antibody response in the global pandemic of the SARS-CoV-2 virus, and to find out whether those who remain asymptomatic during the pandemic may develop a protective immune response or not.

Material and Methods: All Aziz Sancar Experimental Medicine Research Institute (DETAE) staff were included in the study. The presence of antibodies was determined in serum samples of donors using the ELISA method with the EUROIMMUN anti-SARS-CoV-2 ELISA immunoglobulin G (IgG) kit.

Results: Seven of 77 asymptomatic volunteers included in the study were positive for the SARS-CoV-2 virus specific antibody. One donor's antibody result was considered to be borderline. Six of the donors with positive antibodies were females. Among all the staff, four people had a contact history of COVID-19. In serum samples taken 1 month after antibody positive cases, the time-dependent change of the antibody level was evaluated. There was no statistical difference between antibody levels in serum taken at different times.

Conclusion: Virus-specific antibody detection may also be possible in an asymptomatic individual and an indicator of successful immune response. Antibody screening will also be important in the evaluation of social immunity in patients who are known to have the disease and who were not immune plasma donors.

Keywords: Anti-SARS-CoV-2, ELISA, COVID-19, IgG Antibody

EXTENDED ABSTRACT

SARS-CoV-2 appears to be more contagious when compared to the severe acute respiratory syndrome coronavirus. Also, patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) show a variety of clinical symptoms from those observed in SARS-CoV-2 patients. We aimed to evaluate the virus-specific antibody response in the global pandemic of the SARS-CoV-2 virus, and to find out whether those who remain asymptomatic during the pandemic may develop a protective immune response or not.

To assess SARS-CoV-2 seroprevalence in the population of Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine (DETAE) staff and to assess longitudinal changes in SARS-CoV-2 specific S1 IgG levels within the first month, 10 mL of peripheral blood samples were taken from individuals (n = 77). Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and the serum samples were portioned and stored at -20°C until the day of the study. The presence of antibodies was determined in serum samples of donors using the ELISA method with the EUROIMMUN anti-SARS-CoV-2 ELISA immunoglobulin G (IgG) kit. The ratio/index value for the results was calculated (serum OD / calibrator OD). Serum samples were evaluated, and the ratio was considered negative if < 0.8 , borderline if $\geq 0.8 - < 1.1$ and positive if ≥ 1.1 . The significance of the antibody change one month later was calculated by paired t-test.

Seven of 77 asymptomatic volunteers included in the study were IgG positive for the SARS-CoV-2 virus specific antibody. One donor's IgG level was considered to be borderline. Six of the donors with positive antibodies were females. Among all the staff, four people had a contact history of COVID-19. In serum samples taken 1 month after IgG positive cases, the time-dependent change of the antibody level was evaluated. There was no statistical difference between antibody levels in serum taken at different times. According to our findings, the rate of people who had the disease asymptotically was found to be 6.85%. This ratio of IgG is showing that in our population social immunity is still low.

Profiling the antibody response during SARS-CoV-2 infection can help us better understand the viral-host interaction and the immunopathological mechanisms of the disease. Virus-specific antibody detection may also be possible in an asymptomatic individual and an indicator of successful immune response. Antibody screening will also be important in the evaluation of social immunity in patients who are known to have the disease and who were not immune plasma donors.

GİRİŞ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), 2019 yılının sonunda Çin'de ortaya çıkmış olup hızla gelişerek dünya genelinde küresel salgına neden olmuştur. SARS-CoV-2'nin neden olduğu yeni koronavirüs hastalığının (COVID-19) klinik semptomları oldukça değişkenlik göstermekle birlikte hafif semptomdan şiddetli pnömoniye, solunum sıkıntısı sendromuna veya ölüme neden olabilmektedir (1). Birçok kişinin virüsü herhangi bir semptom göstermeden taşıyabildiği de belirlenmiştir (2).

Bir RNA virüsü olan SARS-CoV-2, bütün diğer virüsler gibi hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanarak hücre içine alınır. SARS-CoV-2'nin epitel hücresindeki reseptörü Anjiotensin Converting Enzim-2 (ACE2) iken lenfositlerde hem ACE2 hem de CD147'dir. Virüs genomunun konak hücresindeki replikasyonu ve virüs nükleokapsitinde yer alan spike (S), zarf (envelop, E) ve matris (M) proteinlerinin yapılmasından sonra virüs hücreden dışarı çıkar. Hücre içinde miktarı artan virüsün bir kısmı epitel hücresini patlatarak lizise uğratar ve epitel bariyerin bozulmasına sebep olur (3). Bu sırada dendritik hücreler (DH) virüs antijenlerini alıp CD4⁺ yardımcı T hücrelerine sunar ve CD4⁺ T hücreleri de makrofajları aktif hale getirebilir veya B hücresine yardım ederek virüse spesifik antikor yapımına (IgG ve IgA) sebep olabilir. Yine eş zamanlı olarak DH'ler, CD8⁺ sitotoksik T hücrelerine de bu antijenleri sunabilir. Böylece CD8⁺ T hücreleri, enfekte epitel hücre yüzeyindeki virüs antijenlerini tanıyıp enfekte epiteli ortadan kaldıracaktır. Hastalığı atlatan kişiler arasında diğer tüm virüslere karşı standart olarak verilen ideal immün yanıt sayesinde hastalıkla başa çıkabilmektedirler (4).

İmmünoglobulinler (Ig) kan, mukoza ve çeşitli vücut sıvılarında bulunan glikoprotein yapıda moleküllerdir. Mikroorganizmaların nötralizasyonunda, kompleman sisteminin aktivasyonunda, etkin fagositozda ve antikora bağlı hücrel sitotoksikite de görevlidirler. Yapısal olarak antijen bağlayıcı parça (Fab) ve kristalize parça (Fc) kısımlarından oluşan antikor molekülü, Fab kısmı ile antijenik moleküle yüksek afinite ile bağlanabilmektedir.

M, D, G, A ve E olmak üzere beş farklı izotipte bulunan Ig moleküllerinden IgM, naif B lenfositler yüzeyindeki B hücre reseptörü olarak görev alır ve aynı zamanda antijene karşı üretilen ilk antikordur. IgM kompleman sisteminin aktive edebilir, kan ve hücre dışı sıvıda en çok bulunan izotiptir. IgD, B lenfosit yüzeyinde yer alır ve sinyal iletiminde rol oynar. IgG patojenlerin kolayca fagosite edilebilmesi için etkili bir şekilde opsonizasyon sağlar. IgG, enfeksiyon veya aşılardan sonra uzun süreli bağışıklıktan sorumludur. IgG antikorları, bir enfeksiyon sonrasında yıllarca varlığını sürdürebilir, ancak aktif bir enfeksiyonu göstermek için belirteç olarak genellikle kullanılmaz (5). IgG pozitifliği kişinin hastalığı geçirdiğini göstermekle birlikte iki hafta ara ile artan IgG düzeyi akut enfeksiyonu da gösterebilir.

IgA barsak ve solunum yolları mukus salgılarında ve epitel yüzeyinde bulunur ve opsonizasyon etkisi düşük bir Ig tipidir. IgE antikorları kanda veya hücre dışı sıvılarda çok düşük seviyelerde bulunur. Mast hücreleri üzerindeki reseptöre yüksek aviditeyle bağlanırlar ve bu bağlanma sonucunda mast hücreleri kimyasal mediyatörleri serbest bırakır ve öksürük, hışırtı, kusma gibi reaksiyonları indükler (6).

COVID-19 semptomlarının başlamasıyla birlikte IgM, semptomların ilerlemesiyle birlikte de IgG tipinde koruyucu antikorlar meydana gelmektedir. Serumda antikorların saptanması, kişinin asemptomatik, atipik veya hafif enfeksiyonu hakkında bilgi vermektedir. Çoğu zaman bu kişilerde nazofaringeal sürüntüde SARS-CoV-2 RNA'sı tespit edilemediğinden, virüs antijenine karşı geliştirilen spesifik antikorların tespit edilmesi enfeksiyonun yaygınlığının tespiti için önemlidir (7).

Çalışmamızda Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitü (DETAE) personeline, anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) kiti kullanılarak virüs spesifik antikor varlığına yönelik bir tarama yapılmış, aynı ortamda çalışan kişilerin küresel salgın döneminde immün bağışık olup olmadıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklem Bilgileri

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE çalışanları dahil edildi. Bireylerden (n=77) 10 mL periferik kan örneği alındı. Kan örnekleri 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve elde edilen serum porsiyonlanarak çalışmanın yapılacağı güne kadar -20°C'de saklandı. Çalışma için yerel etik kurul onayı (İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu, 11/05/2020-81367) alındı ve çalışmaya dahil olan gönüllüler 'bilgilendirilmiş gönüllü onam formu'nu okuyarak imzaladı.

Serum IgG tipi antikor tayini

Elde edilen serum örneklerinde anti-SARS-CoV-2'ye spesifik IgG antikorunun varlığı, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile değerlendirildi. Geçirilmiş SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tanısını desteklemek için, serumda SARS-CoV-2'ye karşı gelişen IgG sınıfı immünoglobulinlerin varlığı semi-kantitatif olarak belirlendi.

Kullanılan EUROIMMUN anti-SARS-CoV-2 kitinde (Medizinische Labordiagnostika AG, Almanya) SARS-CoV-2'nin rekombinant yapısal proteini S1 domaini ile kaplı 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanıldı (Lot: E200429AG, Son kul. tarihi: 28.10.20). Çalışmaya başlamadan önce serumların ve kitin oda ısısına gelmesi sağlandı. Serumlar, kitin içindeki örnek tamponu ile 1:101 oranında sulandırıldı. Protokole göre kuyulara kalibratör, pozitif ve negatif kontroller ile sulandırılmış serum örnekleri eklendi, ardından +37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyular boşaltılarak yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kuyuların her birine enzim konjugat (peroksidaz işaretli anti-human IgG) eklendi ve kuyuların ışık almaması sağlanarak, +37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyular boşaltılarak üç kez yıkama tamponu ile yıkandı ve kromojen/substrat çözeltisi eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Kuyulara yıkama yapılmadan stop solüsyonu eklendi. Renk yoğunluğunun fotometrik ölçümü (optik dansite/OD), 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu, 620 nm-650 nm) spektrofotometre cihazı ile (EL_x800, Bio-tek Instruments, INC.) gerçekleştirildi. Ölçümden önce, çözeltinin homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak için mikropalak hafifçe karıştırıldı.

Sonuçlar için oran/indeks değeri hesaplandı (serum OD / kalibratör OD). Elde edilen oran, <0,8 ise negatif, ≥0,8 - <1,1 ise sınır ve ≥1,1 ise pozitif olarak kabul edildi.

İstatistiksel Analiz

Antikoru pozitif çıkan olgularda bir ay sonraki değişimin anlamlı olup olmadığı paired t- testi ile değerlendirildi. Analizler ve grafik GraphPad Prism 5 programı kullanılarak yapıldı.

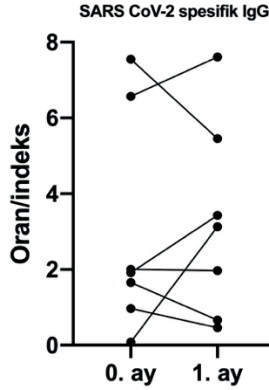
BULGULAR

Çalışmaya katılan donörlerin cinsiyet ve yaş ortalaması, ateş, öksürük, diare, koku-tat kaybı ve ek hastalık bilgileri Tablo 1'de gösterilmiştir. Test sonucu pozitif çıkan kişilerin verileri detaylı olarak Tablo 2'de belirtilmiştir.

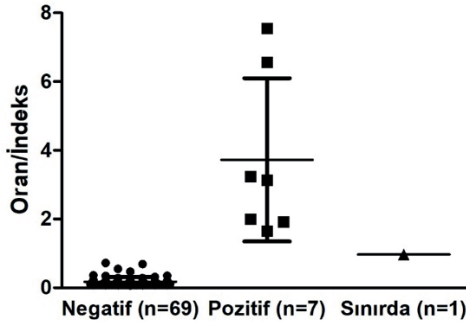
Çalışmada IgG antikor sonucu pozitif ve sınırdaki olarak saptanan personelin (n=7, antikor pozitif olan bir personelin serum örneğine ulaşım sağlanamamıştır, bu nedenle birinci ay antikor seviyesine bakılamamıştır) bir ay sonra alınan serum örneklerinde antikor seviyeleri tekrar edilmiştir. Yapılan değerlendirmede, 2 donörde antikor düzeyinin düştüğü, 2 donörde arttığı ve 1 donörde de belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sınırdaki değer olduğu belirtilen donörün (CVD-42) 1 ay sonraki serum örneğinde antikor varlığı tespit edilmemiştir. Ancak kişi Kasım 2019'da (henüz Türkiye de COVID-19 vakası görülmemiş iken) şiddetli grip geçirdiğini belirtmiştir.

Çalışmaya alınan 77 olgudan temas öyküsü olan 4 kişi dışında, toplamda 73 kişide sadece 5 kişide antikor pozitifliği saptanmıştır. Hastalığı herhangi bir klinik belirti göstermeden asemptomatik olarak geçiren kişilerin oranı %6,85 olarak bulunmuştur.

Farklı zamanlarda alınan serumlarda, antikor düzeyleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 1). Çalışmaya dahil edilen tüm personelin oran/indeks değeri hesaplanarak, serum OD/kalibratör OD değerleri grafiğe aktarılmıştır (Şekil 2).



Şekil 1. Antikor pozitifliği (6 olgu) ve sınırdaki pozitiflik (bir olgu) saptanan SARS-CoV-2 spesifik IgG düzeylerinin zamana bağlı değişimi



Şekil 2. Çalışmaya katılan tüm personelin ELISA IgG serum OD/kalibratör OD sonuçları
OD: optik dansite

TARTIŞMA

Şiddetli akut solunum sendromu (SARS) ve Orta Doğu solunum sendromu (MERS) üzerinde yapılan çalışmalar, semptom başladıktan 2 hafta sonra hastaların %80-100'ünde virüse özgü antikorların tespit edilebilir olduğunu göstermiştir (8).

Seroprevalans çalışmaları, yakın zamanda veya geçmişte enfeksiyon geçirmiş kişilerin oranı ile ilgili bilgi sağlayabilmektedir. Enfeksiyon prevalansının izlenmesinin (semptomların geçmişi ne olursa olsun), hastane personeli arasındaki maruziyet düzeyini değerlendirmek ve yüksek riskli bölümleri belirlemek için yararlı olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, sağlık çalışanları arasında geçmiş enfeksiyon bilgisi, gereksiz karantinalardan kaçınmak ve sağlık kaynaklarının planlaması için de faydalı olabileceği öngörülmektedir.

IgG tipi antikor pozitifliği hastalığın geçirildiğini göstermekle birlikte iki hafta ara ile artan IgG düzeyi akut enfeksiyonu da gösterebilir. Bu nedenle kişinin hastalığı başkalarına bulaştırma ihtimali söz konusudur. Bu durumda, kişinin virüsü yayma ihtimalini en aza indirmek için toplumdan en az 14 gün izole kalması önerilmektedir (9).

Çalışmamızda sadece SARS-CoV-2 virüsünün S proteinine özgü IgG düzeyleri analiz edilmiş olup virüsün zarf ve nükleokapsid bölgelerine karşı oluşan antikor yanıtları analiz edilmemiştir. Güncel çalışmalar SARS-CoV-2'ye karşı primer yanıtların IgG ve IgM tipinde olsa da, mukozal ve sistemik IgA tipi antikorların da hastalığın patogeneğinde önemli rolü olabileceğini göstermektedir (10). Çalışmamızda temas/öykü hikayesi olan 4 gönüllüden sadece 2'sinde IgG tipinde antikor saptanırken iki kişi antikor negatif olarak bulunmuştur. Temas/öykü hikayesi olup IgG tipi antikor düzeyi negatif saptanan kişilerde diğer virüs belirteçlerine özgü IgG tiplerinin ve IgA antikor düzeylerinin analiz edilmesi prevalans çalışmalarında daha kesin veriler elde edilmesini sağlayacaktır.

SARS-CoV-2 prevalansını belirlemeye yönelik çalışmalardaki veriler farklı olmakla birlikte, Havers ve ark. geniş olgu gruplarında yaptıkları çalışmada San Francisco'da anti-SARS-CoV-2 IgG pozitifliğinin %1 olarak, New York'da ise %6,9 olarak saptamışlardır. A.B.D. Hastalık ve Korunma Merkezi (CDC)'nin A.B.D. deki 10 eyalette yaptığı prevalans çalışmasında, dağılımları %1,1-6,9 arasında (Connecticut'ta %4,9, Utah'da %2,2, Louisiana'da %5,8) saptamıştır (11). Çalışmamızda hastalığı asemptomatik olarak geçiren kişilerin oranı benzer şekilde %6,85 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bu veriler salgının başlarında hastalığı asemptomatik olarak geçiren kişi sayısının fazla olduğunu öne süren görüşlerin doğru olmadığını, toplumsal bağışıklığın hala çok düşük olduğunu göstermektedir. Özellikle asemptomatik enfeksiyon oranını ortaya çıkarmak ve morbidite/mortalite hakkında tahminler elde etmek için serolojik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu tür analizler aşı denemelerinin sonuçlarının değerlendirilmesi ve terapötik antikorların geliştirilmesi için de yol göstericidir (12).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) tabanlı viral RNA tespiti hastalığın tanısında önem arz etmekte ve SARS-CoV2 enfeksiyonunu etkili bir şekilde doğrulamaktadır. Verilerimiz ise, asemptomatik bireylerde de SARS-CoV-2 virüsüne spesifik antikor saptanmasının önemli olabileceğini göstermektedir. Küresel salgın sırasında hastalık semptomlarının görülmemesi başarılı bir immün yanıt gelişebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu kişilerin sayısının oldukça az olacağı aşıkardır. Hastalığı geçirdiği bilinen ve immün plazma vericisi olmayan olgularda da antikor taraması yapılması toplumsal bağışıklığın değerlendirilmesi bakımından önemli olacaktır.

Teşekkür

Çalışmaya gönüllü katılan Aziz Sancar DETAE çalışanlarına ve anti-SARS-CoV-2 kitlerini sağlayan EUROIMMUN, Türkiye firmasına çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR / REFERENCES

1. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; 382(18): 1708-20.
2. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(10): 2000180. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180
3. Juno JA, Tan HX, Lee WS, Reynaldi A, Kelly HG, Wragg K, et al. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26(9): 1428-34.
4. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011; 35(2): 161-8.
5. Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell.* 2018; 9(1): 63-73.
6. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2Suppl 2): S73-80.
7. Petherick A. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet.* 2020; 395(10230): 1101-2.
8. Meyer B, Drosten C, Muller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res.* 2014; 194: 175-83.
9. Jacofsky D, Jacofsky EM, Jacofsky M. Understanding Antibody Testing for COVID-19. *J Arthroplasty.* 2020; 35(7S): S74-S81.
10. Yu HQ, Sun BQ, Fang ZF, Zhao JC, Liu XY, Li YM, et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *Eur Respir J.* 2020 Aug; 56(2): 2001526. doi: 10.1183/13993003.01526-2020
11. Havers FP, Reed C, Lim T, Montgomery JM, Klena JD, Hall AJ, et al. Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV-2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Intern Med.* 2020. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.4130
12. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol.* 2020; 58 (6): e00512-20. doi: 10.1128/JCM.00512-20