

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2866.

PESTI ADRIÁN ISTVÁN

Sejt-, extracelluláris mátrix, rostrendszer változások szív- és érrendszeri és egyes daganatos megbetegedésekben. Kísérletes és diagnosztikus pathomorfológiai vizsgálatok című program

Programvezető: Dr.Kiss András, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Kiss András, egyetemi tanár

COVID-19 patológiai elemzése, különös tekintettel a májelváltozásokra

Doktori értekezés

Pesti Adrián István

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss András, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Horváth Tünde, Ph.D., főorvos

Dr. Pápay Judit, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Sápi Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Tag: Dr. Juriga Dávid, Ph.D., tudományos segédmunkatárs

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Gyártók jegyzéke	7
1. Bevezetés	8
1.1 A COVID-19 jellegzetességei, epidemiológiája	8
1.2 SARS-CoV-2 vírus jellegzetességei, kimutatása	11
1.2.1 SARS-CoV-2 vírus jellegzetességei.....	11
1.2.1.1 SARS-CoV-2 vírus.....	11
1.2.1.2 SARS-CoV-2 vírus receptorok	13
1.2.1.3 SARS-CoV-2 vírus replikációja.....	13
1.2.2 SARS-CoV-2 vírus kimutatása	14
1.2.2.1 Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR).....	14
1.2.2.2 Immunhisztokémia	14
1.2.2.3 <i>In situ</i> hibridizáció.....	15
1.2.2.4 Elektronmikroszkópia	15
2. Célkitűzések	16
3. Módszerek	17
3.1 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási elemzése.....	17
3.2 Hisztológia.....	19
3.3 SARS-CoV-2 kimutatási módszerek.....	21
3.3.1 Immunhisztokémia	21
3.3.2 <i>In situ</i> hibridizáció (RNAscope®)	23
3.3.3 RT-PCR.....	24
3.4 Digitális képalkotás	25
3.5 Minták kiértékelése	25
3.6 Országos patológiai körvizsgálat.....	28

3.7	Alkalmazott elemzési, statisztikai módszerek.....	30
4.	Eredmények.....	31
4.1	A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási adatainak elemzése, kiemelve az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, ezek összefüggését a halálokkal és társbetegségekkel.....	31
4.1.1	A SARS-CoV-2 fertőzött, elhunyt boncoltak demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatainak elemzése a COVID-19 pandémia egyes hullámaiban (kor, nem, társbetegségek, laboratóriumi eredmények).....	31
4.1.2	A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak kórbonctani mintáiban észlelt hisztológiai elváltozások szemikvantitatív értékelése.....	36
4.1.2.1	A tüdő hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése.....	36
4.1.2.2	A szív hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése.....	37
4.1.2.3	A vese hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése.....	38
4.1.2.4	A máj hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése.....	39
4.1.3	A SARS-CoV-2, mint haláloki tényező szerepének vizsgálata a fertőzöttekben, a társbetegségek figyelembevételével.....	40
4.1.4	Az egyes szervekben észlelt hisztológiai elváltozások súlyossági fokozatának elemzése, összefüggése a tüdőben észlelt patológiai kép súlyosságával és a SARS-CoV-2 fertőzés halálokból betöltött szerepével.....	44
4.1.5	A májban észlelt hisztológiai elváltozások SARS-CoV-2 fertőzésben.....	44
4.1.6	Egyes sejttípusok identifikálására használt IHC reakciók.....	47
4.2	A SARS-CoV-2 egyes protein és RNS komponenseinek kimutatása a fertőzöttek boncolási anyagában immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel...	48
4.2.1	A SARS-CoV-2 vírus komponenseinek detektálása különböző szövetekben és sejtekben.....	48
4.2.1.1	Immunhisztokémia.....	48
4.2.1.2	<i>In situ</i> hibridizáció.....	56
4.2.1.3	RT-PCR.....	57

4.2.2 SARS-CoV-2 vírus immunhisztokémiai kimutatására vonatkozó országos körvizsgálat	57
5. Megbeszélés	60
6. Következtetések, új eredmények	67
7. Összefoglalás	69
8. Summary	70
9. Irodalomjegyzék	71
10. Saját publikációk jegyzéke	85
10.1 Disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények	85
10.2 Disszertációtól független saját közlemények	85
11. Köszönetnyilvánítás	87

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol név	Magyar név
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme-2	Angiotenzin-konvertáló enzim-2
ANOVA	Analysis of Variance	Varianciaanalízis
ALP	Alkaline Phosphatase	Alkalikus foszfatáz
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	Akut légzési distressz szindróma
BMI	Body Mass Index	Testtömeg index
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ
COVID-19	Coronavirus Disease 2019	Koronavírus Betegség 2019
CRP	C-Reactive Protein	C-reaktív protein
Ct	Cycle Threshold	Detektálásiciklus-küszöbérték
DAB	Diaminobenzidine	Diaminobenzidin
DAD	Diffuse Alveolar Damage	Diffúz alveoláris károsodás
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate	Deoxinukleotid-trifoszfát
DPCCK	Central Hospital of Southern Pest – National Institute of Hematology and Infectious Diseases	Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded	Formalin fixált paraffinba ágyazott
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase	Gamma-glutamil transzferáz
HRP	Horseradish Peroxidase	Torma peroxidáz
IHC	Immunohistochemical reaction	Immunhisztokémiai reakció
ISH	In Situ Hybridization	<i>In Situ</i> hibridizáció
NP	Nucleocapsid Protein	Nukleokapszid fehérje
NTC	No Template Control	Templát nélküli kontroll
ORF	Open Reading Frame	Nyitott olvasási keret
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polimeráz-lánreakció
PIBOI	Department of Pathology, Forensic and Insurance Medicine	Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet
PM	Pathologist Workgroup	Patológus Munkacsoport
PMI	Post-Mortem Interval	<i>Post mortem</i> intervallum

Rövidítés	Angol név	Magyar név
RAS	Renin-Angiotensin System	Renin-angiotenzin Rendszer
RBC	Red Blood Cell	Vörösvérsejt
RNS	Ribonucleic Acid	Ribonukleinsav
RP	Human RNase P	Humán RNáz P
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Reverz Transzkripció Polimeráz-lánreakció
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2	Súlyos Akut Légzőszervi Szindróma Koronavírus-2
SE	Semmelweis University	Semmelweis Egyetem
SEF	Sinusoidal ectasia, Endothelial damage, Fibrin accumulation	Sinusoidealis ektázia, Endothel károsodás, Fibrin akkumuláció
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2	Transzmembrán szerin proteáz 2
TP	Total Pulmonary Histo-score	Totál pulmonális hiszto-score
TUKEB	Scientific and Research Ethics Committee of the Medical Research Council	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
UNG	Uracil-DNA Glycosylase	Uracil-DNS glikoziláz
USA	United States of America	Amerikai Egyesült Államok
WHO	World Health Organization	Egészségügyi Világszervezet

Gyártók jegyzéke

Gyártó rövid neve	Gyártó teljes neve	Gyártó székhelye
3D Histech	3D Histech Kft.	Budapest, Magyarország
Abcam	Abcam PLC	Cambridge, Egyesült Királyság
ACD Bio	Advanced Cell Diagnostics, Inc.	Newark, Kalifornia, USA
Aptaca	Nuova Aptaca SRL	Canelli, Olaszország
Bio Optica	Bio Optica Milano S.p.A.	Milánó, Olaszország
Biocare Medical	Biocare Medical LLC	Pacheco, Kalifornia, USA
CST	Cell Signaling Technology Inc.	Danvers, Massachusetts, USA
Dako	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, Kalifornia, USA
DB	DB Biotech a.s.	Kosice, Szlovákia
IBM	International Business Machines Corporation	Armonk, New York, USA
IDT	Integrated DNA Technologies Inc.	Coralville, Iowa, USA
Leica	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nußloch, Németország
Marienfeld	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Németország
Matsunami	Matsunami Glass IND. LTD.	Oszaka, Japán
Molar	Molar Chemicals Kft.	Halásztelek, Magyarország
MS	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Qiagen	Qiagen N.V.	Venlo, Hollandia
Roche	Roche Diagnostics Inc.	Indianapolis, Indiana, USA
Sino	Sino Biological Inc.	Peking, Kína
The R Foundation	The R Foundation for Statistical Computing	Bécs, Ausztria
Thermo	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
TIBCO	TIBCO Software Inc.	Palo Alto, Kalifornia, USA
Ventana	Ventana Medical Systems Inc.	Tucson, Arizona, USA
VWR	VWR International Kft.	Debrecen, Magyarország

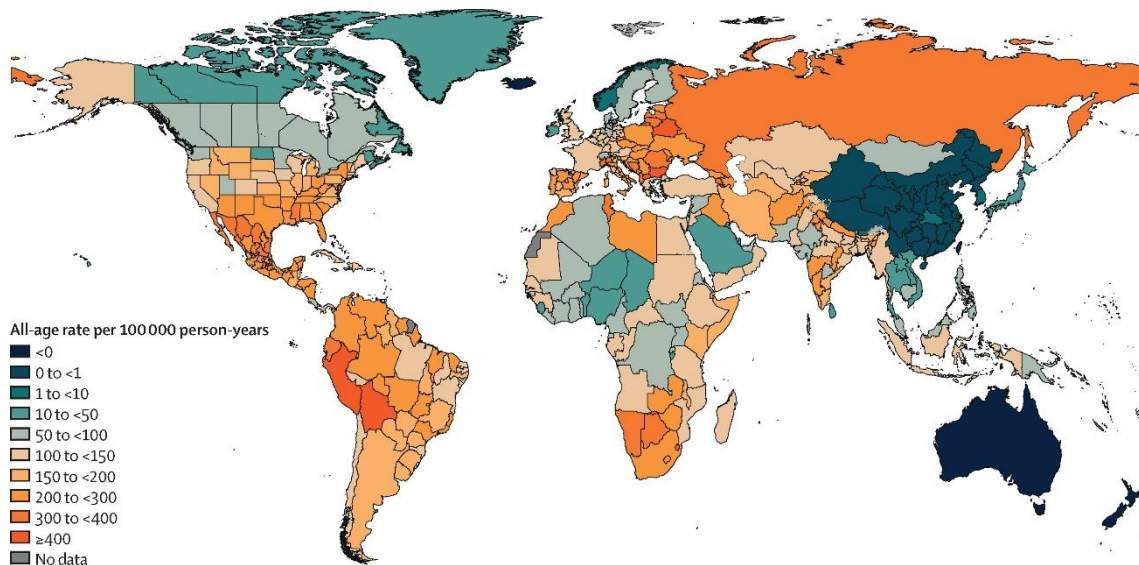
1. Bevezetés

1.1 A COVID-19 jellegzetességei, epidemiológiája

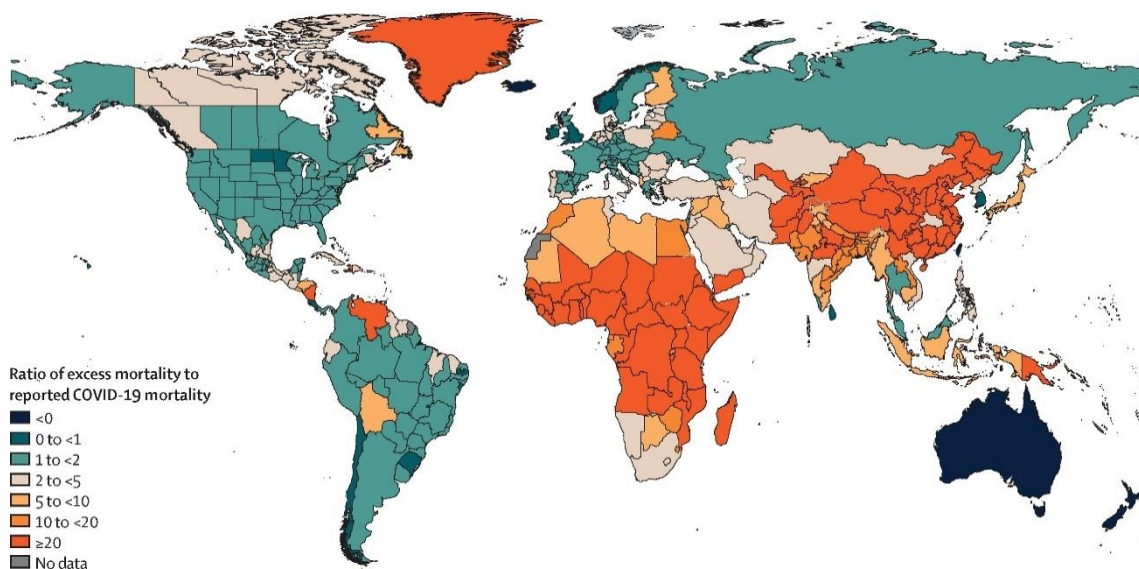
Kína Hubei tartományában található Wuhan város Egészségügyi Bizottsága 2019. december 31-én ismeretlen eredetű tüdőgyulladásos betegekről tett bejelentést. Közzétették, hogy a koronavírusok új törzsét izolálták, melyet később SARS-CoV-2-nek (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) neveztek el (1). Bizonyítást nyert, hogy ezen vírus tekinthető a COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) kórokozójának, amely megbetegedést 2020. március 11-én az Egészségügyi Világszervezet (WHO) pandémiává nyilvánított, a járvány rohamos ütemben történő eszkalációja miatt (2).

A WHO adatai szerint (<https://covid19.who.int>) 2023. február 8-ig, a COVID-19 több, mint 755 millió megbetegedést okozott világszerte és 6,8 millió beteg halt meg a fertőzés következtében. Magyarországon 2020. március 4-én igazolták az első COVID-19 megbetegedést, majd az első SARS-CoV-2 okozta haláleset 2020. március 15-én következett be (3). A szintén 2023. február 8-i WHO adatok szerint (<https://covid19.who.int>), melyek alapja a hazai adatbázis (<https://koronavirus.gov.hu>) Magyarországon a COVID-19 közel 2,2 millió beteget érintett és több, mint 48 ezer halálos áldozatot követelt a SARS-CoV-2 vírusfertőzés.

A COVID-19 pandémia következtében elhunytak számának pontos meghatározása problémás lehet, ezért informatív az ún. többlethalálozás értékelése, azaz egy adott periódusban elhunytak számának a korábbi évben/időszakasban elhunytak számához való viszonyítása (1. ábra) (4, 5). A közölt többlethalálozás összevetése az egyes országok által ismertett halálozás arányával, az adott ország bejelentési rendszerének („*reporting systems*”) megbízhatóságát is tükrözi (2. ábra).



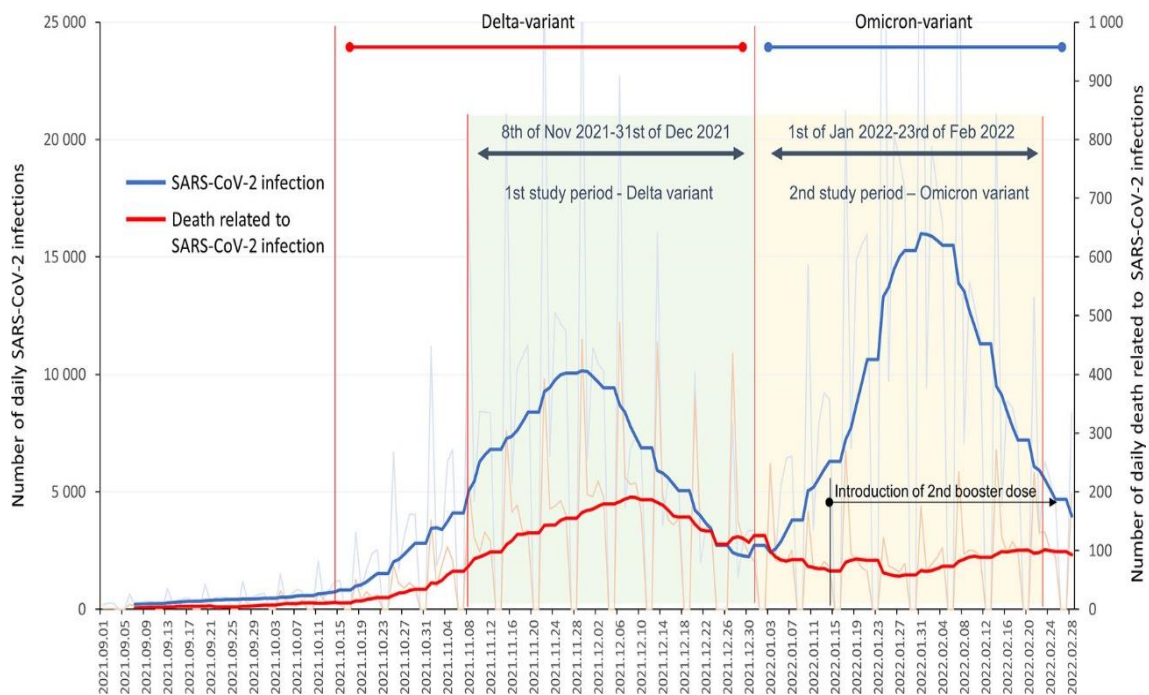
1. ábra A COVID-19 pandémia okozta többlethalálozás globális eloszlása a 2020-21-es kumulatív időszakra vonatkozóan (4).



2. ábra A COVID-19 pandémia okozta becsült többlethalálozás és a bejelentett COVID-19 halálozás arányának globális eloszlása a 2020-21-es kumulatív időszakra vonatkozóan (4).

A halálozást a különböző SARS-CoV-2 variánsokkal való fertőződés is befolyásolja, mint erre hazai adatok is rámutattak (3. ábra). Az Alfa nevet viselő variánst elsőként az Egyesült Királyságban mutatták ki 2020. szeptemberében. A második hullámban jelentős szerepet játszó Béta variáns 2020. májusában először Dél-Afrikában jelent meg. A tanulmányból, valamint az ábrából is kirajzolódik, hogy bár az Omikron (2021. november, Dél-Afrika) variáns fertőzőképessége magasabb, ugyanakkor a Delta (2020. október, India) variánshoz képest jelentősen kisebb arányban okoz súlyos végkifejletet a

fertőzötteknél. A tanulmány egyértelműen kimutatja, a vakcinák (minden gyártó) hatásosságát és a további ismétlődő oltások hasznát is (6).



3. ábra A SARS-CoV-2 variánsok halálozásra gyakorolt hatásai (6).

Már a pandémia elején nyilvánvalóvá vált, hogy a SARS-CoV-2 okozta fertőzés elsősorban és legsúlyosabban a tüdőt támadja. A kialakult úgynevezett akut légzési distressz szindróma (ARDS), a hyalin membrán betegség a légzőfelület jelentős beszűkülését okozza, mely az esetek jelentős részében a beteg halálához vezet (3, 7-15). Az esetek elemzése azonban rávilágított arra, hogy a tüdön kívül egyéb szervek is érintettek lehetnek, így a szív, idegrendszer, vese, máj stb., melyek megbetegedése a klinikai tünetek között is változó mértékben mutakozhat (9, 16-22). Nem volt ismert, és jelenleg is vitatott, hogy az egyes szervekben mutakozó elváltozások a SARS-CoV-2 közvetlen citopatogén hatásának, vagy másodlagosan, a tüdőben bekövetkező megbetegedés következményeinek tekinthetők-e. Kérdéses volt, hogy a szekunder tényezők között elsősorban az ún. „citokinvihar”, a súlyos hipoxia, a beteg kezelése kapcsán alkalmazott gyógyszerek mellékhatásai stb. szerepelnek-e, vagy a vírus a tüdön kívüli egyéb szervek sejtjeiben történő replikációja (9, 14, 23-25). Ennek eldöntésében alapvető a SARS-CoV-2 egyes komponenseinek, így a tüske- és nukleokapszid fehérjéknek immunhisztokémiával, valamint a vírus-ribonukleinsavnak (RNS) *in situ* hibridizációval történő kimutatása, melyekre munkánk során magunk is törekedtünk (26).

A pandémia elemzése során ismertté vált, hogy a COVID-19 legsúlyosabban az idősebb korosztályt, valamint egyes társbetegségekben szenvedőket érinti. Ennek egyértelmű bizonyítása, az okok elemzése ugyancsak világszerte a kutatások fókuszában állt és áll jelenleg is (27).

A COVID-19 pandémia indulását követően boncolási adatok csak korlátozottan álltak rendelkezésre világszerte, így a megbetegedés patomechanizmusának elemzése nehézségekbe ütközött (13). Hazánkban a járvány kezdeti szakaszában hatósági és igazságügyi boncolásokat lehetett csak végezni a SARS-CoV-2 fertőzésben elhunytakon, a későbbi hullámokban terjesztették ki a boncolások lehetőségét a patológiai osztályokra is, elsősorban a nem egyértelmű, tisztázatlan halálozások esetében. A Semmelweis Egyetem (SE) Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetében a járvány kezdetétől nagyszámú boncolásra került sor, a SE-en elhunytak mellett a Dél-pesti Centrumkórház (DPCK)-ban elhalálozottak boncolása is itt történt, a SE II. Sz. Patológiai Intézete munkatársainak bevonásával. Az együttműködés eredményeképpen a világon az egyik legnagyobb, egy centrumból származó boncolási anyag elemzésére kerülhetett sor, 100 (9), majd 150 (27) eset részletes analízise során.

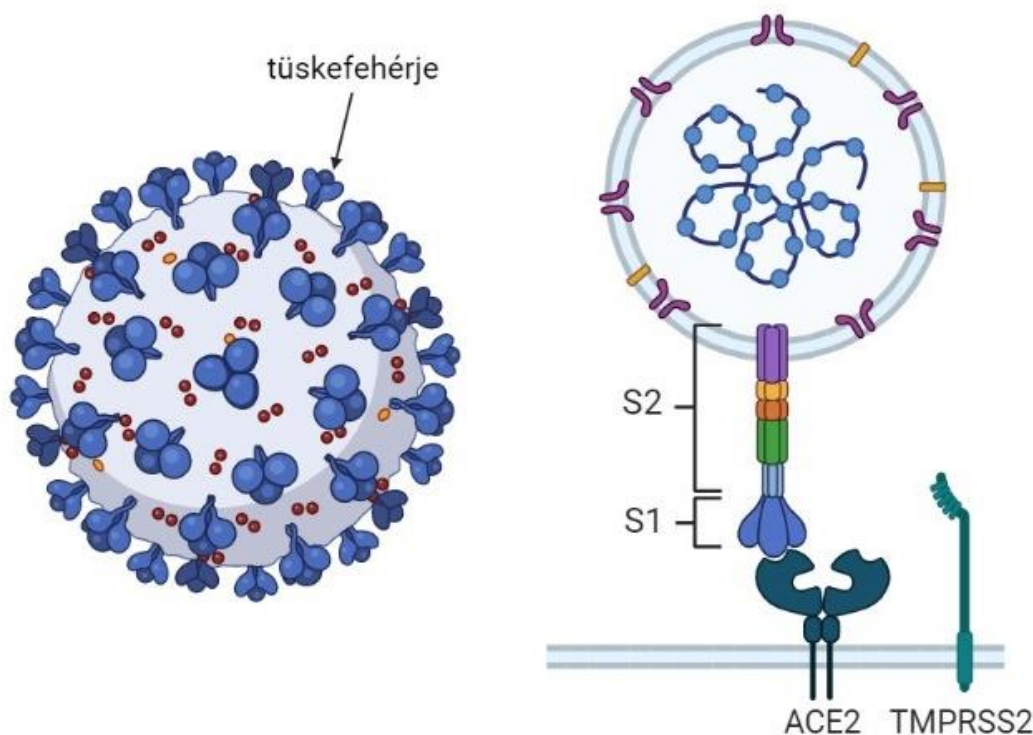
A boncolási anyagok tanulmányozása során alapvető volt a SARS-CoV-2 *in situ* kimutatása, standardizált, megbízható módszerek alkalmazása, mely vizsgálataink egyik alapját képezte.

1.2 SARS-CoV-2 vírus jellegzetességei, kimutatása

1.2.1 SARS-CoV-2 vírus jellegzetességei

1.2.1.1 SARS-CoV-2 vírus

A 2019-ben felfedezett SARS-CoV-2, a *Coronaviridae* család *Betacoronavirus* nemzettségéhez tartozik és egyszálú, pozitív szenz RNS-genommal rendelkezik (28). 50-200 nanométer átmérőjű, virionját lipid burok veszi körül. A koronavírusok négy struktúrfehérjével rendelkeznek, így a borítékfehérje (E), membránfehérje (M), nukleokapszid fehérje (N, NP), tüskefehérje (S, spike). Ez utóbbi 2 alegységből áll: az S1 alegység a sejtfelszíni receptorhoz kapcsolódik, míg az S2 a vírus és a sejt lipidrétegeinek egyesülését segíti (4. ábra) (29). A tüskefehérjék koronaszerű dinamikus felületet hoznak létre, melynek a fertőzés folyamatában van jelentős szerepe. Köszönhetően a vírus szerkezetének, az meglehetősen ellenálló mechanikai hatásokra (30).



4. ábra SARS-CoV-2 vírus sematikus külső megjelenése: vírus burok tüskefehérjékkel, valamint a vírus kapcsolódása az angiotenzin-konvertáló enzim-2 (ACE2) sejtfelszíni receptorhoz, ahonnan a vírus örökítő anyaga a transzmembrán szerin proteáz 2 (TMPRESS2) közreműködésével jut a sejtbe (saját szerkesztésű BioRender ábra).

A SARS-CoV-2 légúti megbetegedést okozó vírus, mely cseppfertőzéssel terjedhet akár 7-8 méteren belül is, főként köhögés, tüsszentés útján (31). A fertőzés főbb tünetei a láz, köhögés, nehézlégzés, fáradtság, torokfájdalom. A betegség lefolyása emberenként igen változó, a tünetmentestől egészen az akár halálos kimenetelűig. Terjedését megakadályozni főként gyakori fertőtlenítőszeres kézmosással (mivel a detergens felbontja a vírus külső lipid burkát), megfelelő maszk viselésével és távolságtartással lehet (32, 33).

SARS-CoV-2 fertőzés következtében a májban leggyakrabban a transzamináz szintjének emelkedése fordul elő. Szintén gyakori az aszpartát-aminotranszferáz (AST) és az alanin-aminotranszferáz (ALT) enzimek szintjének növekedése a májsejtek károsodásának köszönhetően. Előfordulhat még a Gamma-glutamil transzferáz (GGT) és a bilirubin emelkedés is. Az enzimek megemelkedett szintje a májszövet gyulladásának, illetve a májfunkciók romlásának is lehetnek jelei (22, 34, 35).

1.2.1.2 SARS-CoV-2 vírus receptorok

A SARS-CoV-2 vírus a humán angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) receptoron keresztül jut be a sejtekbe, ahogyan azt a 4. ábra és az 5. ábra szemlélteti. Az ACE2 receptor az erek falában, légutakban, szívben és epeutakban fordul elő nagyszámban. Az ACE2 receptor a SARS-CoV-2 mellett egyéb vírusok sejtbe jutásában is szerepet játszik. A sejtbe való bejutáshoz a SARS-CoV-2 vírus a tüskefehérjéjét (spike) használja, amely kapcsolódik az ACE2 receptorhoz. A kapcsolódás után egy másik, a sejtmembránban található celluláris enzim, a transzmembrán proteáz szerin 2 (TMPRSS2) hasítja a vírustüske fehérjét, ezzel szabaddá téve az S2 alegység fúziós doménját, mely így létrehozza a vírusburok és a sejt lipidmembránjának fúzióját, és a vírus sejtbe jutását.

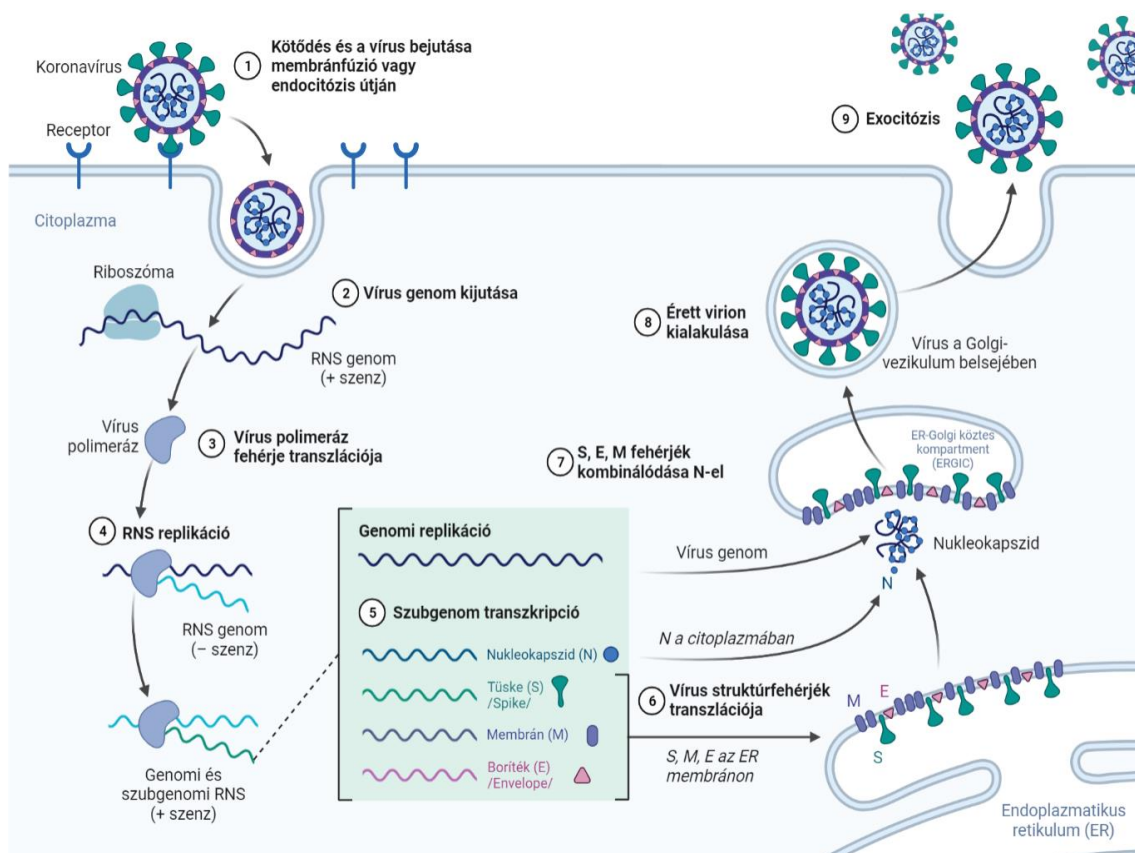
Az ACE2 receptorok nagy mennyisége és magas aktivitása növelheti a COVID-19 megbetegedés lefolyásának súlyosságát a tüdőben, a fennálló szív és érrendszeri betegség fokozott kockázatot jelent (28, 36-38).

1.2.1.3 SARS-CoV-2 vírus replikációja

Ahogyan az 5. ábra vázolja, a megfertőzött sejtekben a replikáció során a SARS-CoV-2 vírus először a teljes örökítőanyagát (RNS) másolja le (negatív szenz kópiák), igénybe véve a sejtek szintézis apparátusát. Innen történik a teljes genom sokszorozódása. A másolatok részben a virionok örökítőanyagát adják, részben pedig mRNS-ként transzlációs templátok lesznek az ORF1ab-szakasz (*Open Reading Frame*) lefordításához, a replikációs komplexek elkészítéséhez. A SARS-CoV-2 vírus replikációjához szükségesek a vírus RNS-polimeráz, a vírus proteáz és a vírus helikáz enzimek (28, 33).

A transzkripció során lehetséges, hogy a negatív templátszálak szegmentáltan íródjanak át, ez okozza, hogy a koronavírusok genetikai rekombinációra hajlamosak (39). A transzkripció mechanizmusának köszönhetően különböző hosszúságú mRNS-ek képződnek, tekintettel arra, hogy a templát szál 5' végéhez legközelebb a nukleokapszid fehérjét kódoló szakasz (N-gén) található, amely mindenképpen átírásra kerül (28). A keletkezett pozitív szenz szálak látszólag policisztronosak, gyakorlatban azonban monocisztronos mRNS-nek bizonyulnak. Ezekből adódik, hogy a detektálhatóságra, illetve annak érzékenységére, hatással lehet a transzkripció is, nem csak a replikáció. Az újonnan keletkezett vírusok elhagyják a gazdasejtet és újabb sejteket vesznek célba. A

vírusfertőzés szervezetben történő terjedésének akadályozására alkalmas módszer a replikáció gátlása (32, 36, 38, 40).



5. ábra SARS-CoV-2 vírus replikációja (saját fordítás, Benjamin Goldman-Isaelow és Ginny Fulfor BioRenderen közzétett ábrája alapján).

1.2.2 SARS-CoV-2 vírus kimutatása

1.2.2.1 Reverz transzkriptáz polimeráz lánreakció (RT-PCR)

A SARS-CoV-2 vírus jelenlétének kimutatása szövetekben többféle módszerrel lehetséges. A leggyakrabban használt (arany standard) módszer a RT-PCR vizsgálat, amely a vírus RNS-ét mutatja ki a mintában, egy meghatározott primer segítségével. A RT-PCR teszt szenzitív és specifikus módszer, képes kimutatni a vírus jelenlétét alacsony vírusszám esetén is. A módszer a natív vírusgenomon túl, a transzláció előtt álló mRNS-szakaszokat is detektálhatja. A klinikumban a terápiás döntések szempontjából is a RT-PCR vizsgálat eredménye a meghatározó (41).

1.2.2.2 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai reakció segítségével (IHC) a vírus fehérje egyes komponensei detektálhatók a szövetekben. Az IHC módszer mind érzékenységben, mind pedig

specificitásban elmarad a PCR-hez képest, nagy előnye viszont, hogy segítségével lokalizálható a szöveteken belül a vírus előfordulása (42-44).

1.2.2.3 *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizáció (ISH) során a vírus nukleinsav (RNS vagy DNS) adott szakaszához egy megfelelő, komplementer próba kapcsolódik. A próbához kötött jelerősítő struktúrához fluoreszcens molekulák vagy kromogén enzimek kapcsolhatóak, ezzel lehetővé téve a keresett szakasz detektálását. A módszer kellően szelektív és érzékeny, kis vírusszám kimutatására is alkalmas, valamint lehetőséget ad a vírus nukleinsav szöveti lokalizációjának vizualizációjára is (42, 45, 46).

1.2.2.4 Elektronmikroszkópia

További módszer a vírus detektálására és azonosítására az elektronmikroszkópos (EM) vizsgálat. Kivitelezése a fenti módszerektől eltérően, ahol alapvetően a rutin módon kezelt anyagokból történik a vírus alkotórészeinek a kimutatása, az EM speciális mintaelőkészítést igényel. Előnye, hogy az EM képes a vírus morfológiájának sejten belüli vizualizálására, elhelyezkedésének és egyéb sejtalkotórészhez való viszonyának a demonstrálására (47).

2. Célkitűzések

A COVID-19 járvány során elhunytak vizsgálata számos kérdést vetett fel, melyek megválaszolása érdekében magunk, a Semmelweis Egyetem Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet COVID-19 munkacsoportjának tagjaiként, vizsgálatokat végeztünk, az alábbi **célkitűzésekkel**, melyeket alapvetően **két csoportra** osztottunk:

I. A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási adatainak elemzése, kiemelve az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, ezek összefüggését a halálokkal és társbetegségekkel:

1. A SARS-CoV-2 fertőzött, elhunyt boncoltak demográfiai jellemzőinek, így a kor, a nem és a társbetegségek SARS-CoV-2 fertőzéssel való összefüggésének elemzése a COVID-19 pandémia egyes hullámaiban.
2. A SARS-CoV-2, mint halálóki tényező szerepének a vizsgálata a fertőzöttekben, a társbetegségek figyelembevételével.
3. Az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyossági fokozatának statisztikai elemzése, összefüggése a tüdőben észlelt patológiai kép súlyosságával és a SARS-CoV-2 fertőzés halálookban betöltött szerepével.

II. A SARS-CoV-2 egyes protein és RNS komponenseinek kimutatása a fertőzöttek boncolási anyagában hisztológiai, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel:

1. A SARS-CoV-2 vírus komponenseinek detektálása különböző szövetekben és sejtekben.
2. SARS-CoV-2 vírus immunhisztokémiai kimutatására vonatkozó országos körvizsgálat szervezése.
3. A szervi elváltozások primer (citopatogén) vagy szekunder jellegének összefüggése a vírus kimutathatóságával, fókuszálva a májra.

3. Módszerek

3.1 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási elemzése

Kutatásunk első szakaszában 100 olyan elhunytat vizsgáltunk a Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani, valamint a II. Sz. Patológiai Intézetében, akik a DPCK-ban álltak kezelés alatt és hunytak el a COVID-19 első (2020. július 31-ig) és második hulláma során, 2020.06.11. és 2020.12.27. között. Az elhunytak SARS-CoV-2 fertőzöttségét még életükben, nazofaringeális úton vett mintából, reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) igazolták (lásd később). A részletes klinikai adatok, laboratóriumi paraméterek a kórboncolások megkezdésekor a DPCK és az SE kórházinformatikai rendszereiből kinyerve, rendelkezésre álltak. A boncolások eredményeit a klinikus kollégák (Dr. Kiss-Dala Noémi, Dr. Lakatos Botond, Dr. Szlávik János, Prof. Vályi-Nagy István) és az időközben a Semmelweis Egyetem két intézetében megalapított COVID-19 Patológus Munkacsoport (PM) tagjaival heti rendszerességgel tartott Zoom-konferencián elemeztük, megvitattuk és meghatároztuk a végrehajtandó eljárások sorrendjét, szükségességét.

Ezen szakaszban a kórboncolásokat, egységes dokumentációs és mintavételezési protokollt követve, Dr. Danics Krisztina tanársegéd asszony végezte, szigorú biztonságossági protokollok és izolálási feltételek betartásával, elkülönített bonctermi részlegben. A boncolások során a szervi elváltozásokról igen részletes fotódokumentáció készült, melyek az egyes esetek elemzése során az elemző klinikopatológus csapat rendelkezésére álltak.

A kutatás második szakaszában a boncolásra kerülők, illetve mintáik a DPCK-ban elhunytak mellett a SE klinikáin, elsősorban a COVID-19 fertőzötteket ellátó intenzív terápiás osztályokon elhunyt személyektől is származtak. A boncolások végzésébe a II. Sz. Patológiai Intézet munkatársai is bekapcsolódtak Dr. Glasz Tibor docens úr, Dr. Lotz Gábor docens úr és Dr. Várkonyi Tibor tanársegéd úr felügyeletével. A boncolási eredmények elemzése, a korábbiakhoz hasonlóan, heti Zoom-egyeztetéseken került klinikopatológiai megbeszélésre és értékelésre, majd statisztikai elemzésre. Az utóbbi munkát, beleértve az adatbeviteli lapok szerkesztését, adatbevitel karbantartását, a

patológusok által adott számszerűsített értékelés statisztikai elemzését magam végeztem el.

A mintavételezési protokoll meghatározása, így a kivágandó blokkok helye, száma, a COVID-19 PM véleménye alapján történt. A mintavételezési lokációkat az 1. táblázat tartalmazza. A minták száma esetenként átlagosan 40 (20-60 között) volt, mely speciális elváltozás észlelése esetén (pl. daganat) nagyobb mintaszámot is jelenthetett. A protokollban egy alkalommal történt változtatás 2021.03.08-ai hatállyal: a kezdeti tapasztalatokat, eredményeket figyelembe véve ezen dátumtól kezdve a táblázatban csillaggal jelölt helyekről nem történt kivágás.

1. táblázat Mintavételezés helye, a minták száma.

szerv	régió; blokk szám
szív	kamra: jobb, bal; 2
	kamrai sövény*; 1
	koszorúverőér: bal, jobb*; 2
légső	középső rész; 1
tüdő	jobb főhörgő*; 1
	jobb lebeny: felső, középső, alsó; 3
	jobb hilus – hörgő*; 1
	bal főhörgő*; 1
	bal lebeny: felső, alsó; 2
	bal hilus – hörgő*; 1
nyelv	gyök; 1
nyelőcső	középső rész; 1
gyomor	antrum-corpus határa; 1
vékonybél	ileum, jejunum; 2
vastagbél	coecum, sigma, appendix; 3
lép	lép; 1
hasnyálmirigy	fej; 1
	test, farok*; 2
máj	bal, jobb lebeny; 2
pajzsmirigy	jobb; 1
	bal*; 1
vese	bal, jobb; 2
mellékvese	bal, jobb; 2
orr	ormelléküreg; 1
prostata / uterus	prostata / uterus test*; 1
ovarium	jobb ovarium*; 1
portio	portio*; 1
agy	külön protokoll szerint; 30

* a jelölt régiókból 2021.03.08. után nem történt mintavétel

A halál beálltát követően, a törvényi előírások figyelembevételével, igyekeztünk a boncolások lehető legrövidebb időn belüli megkezdésére. A „post mortem intervallumot” (PMI) minden esetben gondosan rögzítettük. Néhány esetben úgynevezett „rapid” kórboncolások végzésére is sor kerülhetett, azaz a boncolást, a megfelelő klinikai adatok, dokumentáció és epikrízis birtokában a halált követő 6 órán belül meg lehetett kezdeni.

A SARS-CoV-2 vírus kimutatásához az elhunytak (kór)boncolása során készült formalin fixált, paraffinba ágyazott szöveteket használtuk.

A későbbiekben a SARS-CoV-2 vírus májban okozott hatásainak vizsgálatához 20 olyan esetet választottunk ki, ahol a boncolás a halál időpontjától számított 48 órán belül megkezdődött.

A vizsgálatok megfeleltek a Helsinkai Deklaráció irányelveinek, az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB) a IV/3961-2/2020/EKU (hosszabbítási engedély: BMEÜ/4354-1/2022/EKU), a IV/938-1/2022/EKU, valamint a IV/939-1/2022/EKU azonosító számú határozataiban hozzájárult elvégzésükhöz.

3.2 Hisztológia

A kórbonctani vizsgálat során kimetszett mintákat a további feldolgozás érdekében 4%-os pufferolt (pH=7,4) formaldehyd oldatba (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) – ami 10%-os formalinnak felel meg – helyeztük, majd a minták Intézetünk rutin szövettani laboratóriumába kerültek, ahol a rutin eljárásoknál alkalmazott protokoll szerint történt a szövetek feldolgozása (Excelsior AS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

A minták paraffinba (Bio Optica Milano S.p.A., Milánó, Olaszország) való ágyazása a HistoCore Arcadia C és H (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Németország) készülékek segítségével történt. Az így elkészített „formalin fixált paraffinba ágyazott” (Formalin Fixed Paraffin Embedded; FFPE) szövettani blokkokból 3-4 mikrométer vastag metszeteket készítettünk Leica RM2235 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Németország) félautomata mikrotommal.

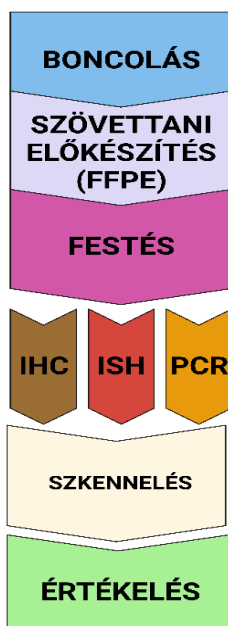
Azokat a metszeteket, amelyeken a hagyományos szövettani festési eljárásokat terveztünk végezni, Marienfeld Superior (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Németország) típusú üveg tárgylemezre úsztattuk. TOMO (Matsunami

Glass IND. LTD, Oszaka, Japán) gyártmányú adhezív tárgylemezekre preparáltuk azokat a mintákat melyeken immunhisztokémiai (IHC) reakciókat terveztünk elvégezni. Az Aptaca (Nuova Aptaca SRL, Canelli, Olaszország) által készített bevont tárgylemezekre úsztattuk a vízről azokat a lehúzásokat, melyeken a továbbiakban *in situ* hibridizációs (ISH) technikát alkalmaztunk.

A tárgylemezen lévő mintát 53 °C-os vízfürdő segítségével simítottuk ki, rögzítettük. A hagyományos festési eljárásokhoz készített mintáknál 10 perc 70 °C-os, szárítószekrénybe helyezéssel, míg az immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz készített anyagok esetében fél perces, 60 °C-os fűtőlapon történő melegítéssel erősítettük meg a lemezhez való tapadást. Az utóbbi mintákat további feldolgozásukig 4 °C-on, hűtőszekrényben tároltuk.

A hematoxin-eozin (HE), perjódsv-Schiff (PAS) és diasztáz emésztés utáni perjódsv-Schiff (ePAS) festésekhez a metszeteket hűtőből kivéve Leica ST5020 típusú festő automatába (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Németország) helyeztük.

A megfestett metszeteket Leica CV5030 típusú fedő automata (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Németország) fedte le, Schott D 263 (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Németország) fedőlemezzel. A fedéshez felhasznált xilol bázisú fedőanyag Surgipath Micromount (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, Németország) megnevezésű volt. A szövettani feldolgozás folyamatát a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra A minták feldolgozásának vázlatos összefoglalása (saját készítésű ábra).

3.3 SARS-CoV-2 kimutatási módszerek

A továbbiakban az általunk, a kutatás során alkalmazott módszerek rövid leírására szorítkozunk. A vírus egyes alkotórészeinek (proteinek, RNS) kimutatására immunhisztokémiai (IHC), RT-PCR és *in situ* hibridizációs (ISH) technikákat alkalmaztunk.

3.3.1 Immunhisztokémia

A hagyományos festési technikákkal készült metszetek áttekintését követően a megfelelő minőségű mintákon IHC reakciókat végeztünk. Az egyes immunhisztokémiai reakciókhoz tartozó protokollok különbségeit kivonatosan a 2. táblázat ismerteti. A reakciókat Ventana márkájú BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA) típusú immunhisztokémiai automatákon futtattuk. A reakciók kivitelezései a rutin diagnosztikában megszokott módon, a gyártói ajánlásnak megfelelően, gyártói kitek felhasználásaival történt, a primer antitesteket különböző hígításban alkalmazva, ahol ez indokolt volt, elsősorban a SARS-CoV-2 IHC reakciók esetében.

2. táblázat Az egyes immunhisztokémiai reakciókhoz tartozó protokollok kivonata.

Protokoll száma	Sejt kondicionálás, feltárás	Inkubálás	Háttérfestés	Kékítés (Bluing)
738	95 °C; 8 + 52 perc	35 °C; 48 perc	4 perc	4 perc
739	95 °C; 8 + 52 perc	36 °C; 48 perc	4 perc	4 perc
880	95 °C; 8 + 36 perc	42 °C; 32 perc	12 perc	8 perc
911	95 °C; 4 + 40 perc	36 °C; 40 perc	12 perc	8 perc
913	95 °C; 4 + 40 perc	35 °C; 48 perc	12 perc	8 perc

A reakciókhoz manuálisan adagolt (titrálás) primer antitestek jellemzőit a 3. táblázat tartalmazza. A megfelelő antitesthígítást a vizsgálatok megkezdése előtt állapítottuk meg, melynek szempontja a reakció intenzitása és a háttér értékelése volt. *Pozitív* kontrollként RT-PCR-rel igazolt, SARS-CoV-2 fertőzött mintákat használtunk. Az elváltozások jellegét tekintve a pozitív kontroll a tüdőből, majd a későbbiekben a SARS-CoV-2 pozitív placentákból került ki. A placenta minták használata mellett szólt a homogénebb

immunhisztokémiai reakció megjelenése, valamint, hogy nem *post mortem* anyag, így a szövet kevésbé autolizált. *Negatív* kontrollként a primer antitest kihagyása, valamint RT-PCR-rel negatívnak bizonyult, a pandémia előtti (2018-2019) boncolásokból származó (tüdő) minták, valamint placentarészek kerültek felhasználásra.

Másodlagos antitestként a primer antitest ellen termelt specifikus antitestet használtunk (3. táblázat).

Az IHC reakciónál kétféle detektálási módszert vettünk igénybe. A minták többségénél torna peroxidáz (HRP) enzimet és diaminobenzidin (DAB) kromogént használtunk: 880, 911, 913 számú protokollok (2. táblázat). Míg a máj metszeteknél annak érdekében, hogy az esetlegesen jelenlévő barnás színű lipofuszin ne zavarja meg az értékelést, alkalikus foszfatáz (ALP) enzimet és *Fast Red* kromogént alkalmaztunk: 738, 739 számú protokollok (2. táblázat).

3. táblázat Az immunhisztokémiai reakciók során felhasznált antitestek adatai.

Célantigén	Antitestklón faj	Gyártó *	Katalógus szám	Hígítási arány	Protokoll száma
CD31	JC70A egér monoklonális	Dako	M0823	1:300	880
CD34	QEnd/10 egér monoklonális	Leica	NCL-L- END	1:300	880
CD68	KP1 egér monoklonális	Dako	M0814	1:4000	880
CK7	OV-TL 12/30 egér monoklonális	Dako	M7018	1:3500	880
CLAUDIN-5	EPR7583 nyúl monoklonális	Abcam	ab131259	1:200	880
FACTOR VIII	F8/86 egér monoklonális	Dako	M0616	1:100	880
SARS-CoV-2 NUKLEOKAPSID (NP)	05 egér monoklonális	Sino	40143- MM05	1:1000	739, 911
SARS-CoV-2 TÜSKEFEHÉRJE (SPIKE)	E5S3V nyúl monoklonális	CST	99423	1:500	738, 913

*A gyártók pontos adatai az *Értekezés* elején (7. oldal) kerültek részletesen felsorolásra.

3.3.2 *In situ* hibridizáció (RNAscope®)

Az *in situ* hibridizációs technika alapját a nukleinsav bázispárok kapcsolata adja. A vizsgálatokat az RNAscope® 2.5 Assay és RNAscope® 2.5 HD Detection Reagent – RED kitékkel (Advanced Cell Diagnostics Inc. (ACD), Newark, CA, USA) végeztük, a 322452 és 322360-USM számú felhasználói utasítások alapján. A felhasznált hibridizációs próbákat szintén az ACD gyártotta a 848561 katalógus számon (bp 21631-23303). Az alábbiakban a gyártói útmutatóhoz képest rövidítve, a főbb lépéseket kiemelve következik a reakció leírása.

A hűtőből elővett minták deparaffinálásának első lépéseként 5 percre analitikai tisztaságú xilolba (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) tettük a lemezeket, majd kivétel után áttettük újabb 5 percre friss xilolba (kétszer váltott xilol). Ezek után a lemezeket kétszer egymás után 1 percre tiszta abszolút etanolba (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) merítettük és mozgattuk, szűrőpapírra tettük, majd 5 percig szobahőmérsékleten száradni hagytuk.

A minták protokoll szerinti előkezelése 10 perc hidrogén peroxiddal történő inkubálás után desztillált vizes mosással történt. A desztillált vízben kondicionált, majd hígított (1X) feltáró reagensbe merített metszeteket tartalmazó edényt 99 °C-os vízfürdőbe tettük 20 percre (korábbi tapasztalataink alapján alkalmaztuk ezt a 15 perces gyártói ajánláshoz képest 5 perccel hosszabb feltárást). Újabb desztillált vizes mosást követően 3 percig abszolút etanolba tartottuk, majd 60 °C-on szárítottuk a mintákat. A száraz tárgylemezeket hidrofób tollal rajzoltuk körbe a szöveteket. Proteáz enzim hozzáadásával, majd nedves kamrában 30 percig tartó 40 °C-on inkubálással folytattuk a munkát, az ezt követő desztillált vizes mosással lezárult az előkezelések sora.

A mosó puffer hígítása, reagensok összemérés után a 40 °C-ra előmelegített metszetekhez hozzáadtuk a szintén 40 °C-os próbákat, majd ugyanezen a hőmérsékleten 2 órát speciális nedveskamrás sütőben inkubáltuk azokat, míg a hibridizáció lezajlott. Mosást követően megkezdjük a jel erősítő struktúra próbákhoz kapcsolását. Az amplifikációs fa létrehozásához hatszor ismételtük a soron következő reagens (AMP1-6) hozzáadása, 40 °C-on inkubálása: AMP-1, -3, -5 esetén 30 percig, AMP-2, -4, -6 esetén 15 percig, végül mosása lépéseket. A jel detektálásához szobahőmérsékleten hozzáadtuk az alkalikus foszfatáz enzim szubsztrátját és kromogénjét, 10 perc elteltével mostuk. A metszeteket 2 percig hematoxilinnal festettük végül 0,02%-os ammóniás csapvízzel

kékítettük. A metszetek száradása után alkoholmentes EcoMount (Biocare Medical LLC, Pacheco, CA, USA) fedőanyag segítségével fedtük őket.

A technika kapcsán megjegyzendő, hogy a gyártói ajánlás szerint a 16 óránál kevesebb vagy 32 óránál tovább tartó fixálás ronthatja az RNAscope® teljesítményét.

3.3.3 RT-PCR

Az FFPE blokkokból készített 3 db 5 µm vastagságú metszetek 1,5 ml-es, steril Eppendorf csövekbe kerültek. A ribonukleinsav izolálását RNeasy FFPE Kit (Qiagen N.V., Venlo, Hollandia) kittel végeztük, a gyártó által mellékelt HB-0375-006 számú protokoll szerint. Deparaffinálást követően, Proteináz K enzimekkel emésztettük a mintát. A lecentrifugált anyagban DNáz enzimek segítségével emésztettük a DNS-t, *Red Blood Cell* (RBC) puffer és etanol kíséretében. Az izoláló oszlopra pipettáztuk a minta oldatot, centrifugáltuk, mostuk, centrifugáltuk végül eluáltuk az oszlopról az RNS-t. Az izolátum minőségét, tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) spektrofotométerrel ellenőriztük. Megfelelőnek fogadtuk el azokat az izolátumokat, ahol 260 és 280 nanométeren mért abszorbancia értékek hányadosa 1.8 és 2.1 között volt.

Az izolált RNS további vizsgálata az amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) által kiadott CDC-006-00019 számú diagnosztikus panel protokollja alapján zajlott. A SARS-CoV-2 vírus detektálásához felhasznált primerek és próbák (N1, N2) a vírus nukleokapszid génjében találhatóak. Egy további primer-próba rendszert is használtunk, a humán RNáz P gén (RP) kimutatására, a folyamat kontrolljaként.

A primereket (N1, N2, RP) és a TaqMan® jelölt próbákat az Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, IA, USA) gyártó 10006770 katalógus számú, *SARS-CoV-2 Research Use Only qPCR Primer & Probe Kit* elnevezésű készlete tartalmazta. A reverz transzkriptáz enzimeket, deoxinukleotid-trifoszfát (dNTP), UNG-eket (Uracil-DNA Glycosylase), termo stabil DNS polimerázokat, ROX (karboxirodamin) festéket az A15300 katalógus számú *TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (4x)* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) kit foglalta magába.

A reakció *master mix* összeméréséhez n+2 (ahol n a vizsgálni kívánt minták száma) szer 1,5 µl primer-próba mixet; 8,5 µl nukleáz mentes vizet; 5,0 µl *TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix*-et használtunk. 96-lyukú *plate* adott *well*-jébe 15 µl reakció *master*

mix-et pipettáztunk, majd 5 µl RNS izolátumot mértünk, így a teljes térfogat 20 µl. A vizsgálandó minták, negatív (NTC, *No Template Control*) és pozitív kontrollok (reakció és extrakció) elhelyezése után a *plate*-et fedő fóliával lezártuk és a PCR készülékbe helyeztük.

A vizsgálat Light Cycler 480 II (Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, IN, USA) készüléken történt, az alábbi időtartam és hőmérséklet beállítások szerint. Első fázis: 2 perc, 25 °C; második fázis: 15 perc, 50 °C; harmadik fázis: 2 perc, 95 °C; negyedik fázis: 3 másodperc, 95 °C, majd 30 másodperc, 55 °C, a negyedik fázis 45 alkalommal volt ismételve. A kiértékelés során 40 ciklusnál (negyedik fázis) húztuk meg a jel detektálásiciklus-küszöbértékét (Ct, *Cycle Threshold*).

3.4 Digitális képalkotás

A leírt módokon elkészült metszeteket 3DHistech Pannoramic® 1000 (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) típusú metszetszkennelvel digitalizáltuk. A szkennelt képeket kezdetben 0,12 µm/képpont felbontással, majd későbbiekben, amikor bizonyossá vált, hogy ennél kisebb felbontás is megfelel a kiértékeléshez 0,24 µm/képpont felbontással készítettük. Ezek az értékek hozzávetőlegesen a hagyományos mikroszkópiában használt 80 szoros és 40 szeres nagyításnak megfelelő képet eredményeznek. A digitalizálás során manuális minta kijelöléssel dolgoztunk. A mintát egy síkban szkenneltük (*single layer*), az automatikusan meghatározott fő fókuszpontok távolságai 1500 µm és 3000 µm közé estek.

A digitalizált képeket rendszerezve, Intézetünk digitális archívumába (SlideCenter) töltöttük fel. A képek megjelenítésére, illetve jelölésére a SlideViewer (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) szoftvert használtuk.

3.5 Minták kiértékelése

A digitalizált szövettani metszeteket patológus szakorvosaink konzultációs csoportokban, közösen tekintették át. Az értékelés objektivizálására konszenzuson alapuló pontozási értékelési rendszert hoztunk létre, melyben az adott elváltozás, reakció jelenléte mellett annak súlyossági fokozatát is számszerűsítettük, az adott elváltozásnak megfelelő, előre meghatározott pontozási értékkel. A továbbiakban a számszerűsített eredmények rögzítésére online űrlapokat készítettünk Microsoft O365 Forms (Microsoft

Corporation, Redmond, WA, USA) szoftver segítségével, valamint a Microsoft O365 Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) programot használtuk. A szöveti szintű elváltozások részletes mennyiségi, minőségi (súlyossági fokozat) elemezhetőségének érdekében, négy szerv vonatkozásában külön értékelő űrlapot alkottunk, melynek értékelt és a későbbiekben az eredményekben bemutatott szempontjai az alábbiak voltak:

- Tüdő: trombózis/embólius, fibrin makro/mikrotrombus, DAD exudatív fázis, DAD proliferatív fázis, DAD fibrotikus fázis, vérzéses infarktus/vérzés alveolusokban, alveoláris ödéma, leukocita reakció, limfocita reakció, idegen test a légutakban
- Szív: intersticiális fibrózis, hullámos szívizomrostok (*wavy fibers*), akut iszkémiás miocita károsodás, szepszis
- Vese: globális glomerulosclerosis, arteriosclerosis, intersticiális fibrózis/tubuláris atrófia
- Máj: szteatózisz, pangás, centrolobuláris nekrozis, kolesztázis, krónikus gyulladás, fibrózis

Ezen felül minden űrlap tartalmazott még technikai jellegű információkra vonatkozó és egyéb megjegyzésekre lehetőséget adó mezőket.

A tüdő esetében a kiértékelés során létrehoztuk a teljes tüdő hisztológiai pontrendszerét, „Totál pulmonális hiszto-score” (TP) néven, melynek részelemei, súlyosság szerint 0-tól 3-ig pontozva a következők: fibrin mikrotrombusok, hyalin-membrán (DAD exudatív fázis), fibrózis alveolusfalakban és/vagy alveolustérben (DAD fibrotikus fázis), alveoláris ödéma, alveoláris vérzés, pneumocytá II hiperplázia, laphám metaplázia, alveoláris makrofágok, limfocitász infiltráció.

A májban a jellegzetes elváltozások leírására szintén létrehoztunk egy hisztológiai kiértékelési rendszert, ahol 0-tól 3-ig pontoztuk az egyes részelemeket, melyek a sinusoidális ektázia (S), endothelsejtek károsodása (E) és fibrin akkumuláció (F) voltak, a felsoroltak együttesen a **SEF-score** értéket adták.

Köszönhetően saját kutatásainknak, elemzéseinknek, valamint a DPCK csapatát erősítő adattudósok által végzett lekérdezéseknek, a medikai rendszerekből (DPCK és SE kórházinformatikai adatbázisai, valamint a Nemzeti COVID-19 Regiszter, Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő adatbázisa) széles körben tudtunk információkat kinyerni

a kórelőzményekre, társbetegségekre vonatkozóan. Ugyanakkor voltak elhunytak, akik esetében csak alapvető adatokkal rendelkezünk.

A DPCK és az SE adatbázisaiban elérhető laboratóriumi vizsgálatok szintén tág skálán mozogtak, mind a mintavételek számának, mind a vizsgált paramétereknek tekintetében. A kutatás első fázisában az alábbi paramétereket vettük számba (ahol elérhető volt): alkalikus foszfatáz, bilirubin, kreatin-kináz *myocardial band*, C-reaktív protein, D-Dimer, becsült glomeruláris filtrációs ráta (*estimated glomerular filtration rate from the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation*), ferritin, gamma glutamil transzferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alanin-aminotranszferáz, nagy érzékenységgű troponin, Interleukin-6, laktát dehidrogenáz, limfocita szám, neutrofil szám, N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid, nitrogén, kreatinin. Azokban az esetekben, ahol egy adott elhunythoz több időpontból származó eredmény is elérhető volt, a halál előtti 7 napban mért értékek mediánját használtuk, ahol ez nem volt lehetséges, ott a halál előtti utolsó elérhető adatot vettük figyelembe. A kutatás későbbi fázisában a korábbi eredmények tanulságai szerint az Eredmények fejezetben leírt módon szűkítettük a vizsgált paraméterek listáját.

A PM közösen végezte el a kórelőzmények, társbetegségek, laboratóriumi vizsgálatok eredményei, makroszkópos elváltozások és a szövettani pontértékek együttes figyelembevételével az elhunytak haláloki csoportokba sorolását. A PM által megalkotott haláloki kategóriák felsorolását, valamint a hozzájuk tartozó definíciókat az alábbi 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat Halálóki kategóriák definíciói SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak esetében (9).

KATEGÓRIA	KÖZVETLEN HALÁLOK	SARS-CoV-2 FERTŐZÖTTSÉG ÉS A HALÁLOK ÖSSZEFÜGGÉSE
1. kategória	Súlyos COVID-19 pneumónia: DAD, ARDS, pulmonális intravaszkuláris és intraalveoláris fibrin koaguláció.	“Erős” összefüggés a SARS-CoV-2 fertőzéssel, a társbetegségek nem súlyosak, súlyos pneumónia.
2. kategória	Súlyos meglévő társbetegség.	“Kiegészítő” összefüggés a SARS-CoV-2 fertőzéssel, COVID-19 pneumónia, mint társbetegség.
3. kategória	A halál egyéb okai, melyek nincsenek kapcsolatban a SARS-CoV-2 fertőzéssel.	“Gyenge” összefüggés a SARS-CoV-2 fertőzéssel, nincs COVID-19 pneumónia.

3.6 Országos patológiai körvizsgálat

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma javaslata alapján igyekeztünk a hazai forgalomban elérhető SARS-CoV-2 ellenes antitestek alkalmazhatóságát, a leginkább megfelelő antitest kiválasztását, a standard hígítás meghatározását és módszer véleményezését elvégezni.

A négy hazai orvosegyetem, így a Szegedi Tudományegyetem (SZTE), a Pécsi Tudományegyetem (PTE), a Debreceni Tudományegyetem (DTE), valamint a SE (Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, PIBOI) patológiai intézeteinek bevonásával végeztük a vizsgálatokat.

A SE PIBOI szervezésében RT-PCR-rel bizonyítottan SARS-CoV-2 pozitív tüdő és placenta mintákat, valamint igazoltan negatív (COVID-19 pandémia előtti) mintákat választottunk ki. A mintákat kódszámmal láttuk el, melyek azonosítása csak a vizsgálatvezető számára volt ismert. Ugyancsak a SE PIBOI által rendelt SARS-CoV-2 ellenes tüske és nukleokapszid ellenes antitestek 20-20 µl-nyi mennyiségét juttattuk el hűtve, a natív metszetekkel együtt a vizsgálóhelyekre. Emellett néhány vizsgálóhely az

általuk alkalmazott antitestekkel is elvégezte a reakciókat. A reakciókat minden intézetben Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA) automatákon végezték. A kipróbált primer antitestek adatait az alábbi 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A vizsgálóhelyeken (A, B, C, D). alkalmazott SARS-CoV-2 nukleokapszid- és tüskefehérje ellenes antitestekkel végzett immunhisztokémiai reakciók listája (26).

Antitest kódja	Antitest neve, gyártó*, katalógus szám	Eredet, klón	Hígítás	Vizsgáló hely kódja
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	egér, #05	1:1000	A
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	egér, #05	1:1000	B
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	egér, #05	1:1000	C
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	egér, #05	1:1000	D
NP 2	SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Ab, Thermo, MA1-7404	egér, B46F	1:100	B
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	nyúl, E5S3V	1:200	A
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	nyúl, E5S3V	1:500	B
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	nyúl, E5S3V	1:250	C
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	nyúl, E5S3V	1:500	C
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	nyúl, E5S3V	1:500	D
SPIKE 2	Anti-SARS-CoV-Spike, DB, DB 279	nyúl, Q25-L	1:500	B
SPIKE 3	SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 ab, Abcam, ab275759	nyúl, polklonális	1:2000	B

*A gyártók pontos adatai az Értekezés elején (7. oldal) kerültek részletesen felsorolásra.

A másodlagos antitestek az adott laboratóriumban rutinszerűen alkalmazott IHC reakciók végzésére használt antitestek voltak. A detektálás minden helyszínen DAB kromogént használva történt.

Az IHC reakciók elvégzése után a reakciót tartalmazó tárgylemezeket a vizsgálóhelyek a SE PIBOI-be küldték, ahol azokat a 3D Histech készülékével szkenneltük, a fent leírt módon. Az egyes vizsgálóhelyek belépési lehetőséget kaptak a SE SlideCenterbe. A látott reakciókat a vizsgálóhelyek hozzáértő képviselői értékelték: intenzitás és háttér vonatkozásában, egyeztetett módon. Az adható pontok mindkét kategóriában a 0-tól 3-ig terjedő skála egész számai voltak, melyeket összesítettünk. Értelemszerűen háttér esetében az alacsonyabb, míg intenzitás esetében a magasabb pontok jelezték a jobb reakciót.

3.7 Alkalmazott elemzési, statisztikai módszerek

A rögzített eredmények megjelenítése, ellenőrzése, áttekintése, statisztikai elemzésre előkészítése, valamint a statisztikai vizsgálatok egy része is a Microsoft O365 Excel szoftver segítségével történt. Az adatok elemzéséhez felhasználtuk még az IBM SPSS Statistics 28.0.1.0(142) verziójú (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), az R 4.0.2 kiadású (The R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria), valamint a Statistica 14.0.1.25 verziószámú (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) szoftvereket. A statisztikai vizsgálatok során a kialakított csoportok összefüggéseinek jellemzéséhez Cohen-féle kappá, Fleiss-féle kappá mutatókat, korrelációs együtthatókat, számoltunk. Az eloszlások vizsgálatához varianciaanalízist (ANOVA, Analysis of variance), Friedman-teszteket, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Khi-négyzet (kis mintaszámoknál Fisher-féle egzakt próbát) és t-próbákat alkalmaztunk. A normalitás vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk teszteket végeztünk. A beállított szignifikanciaszint 5% ($\alpha=0,05$) volt minden statisztikai vizsgálatunk esetében.

4. Eredmények

4.1 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak boncolási adatainak elemzése, kiemelve az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, ezek összefüggését a halálokkal és társbetegségekkel

4.1.1 A SARS-CoV-2 fertőzött, elhunyt boncoltak demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatainak elemzése a COVID-19 pandémia egyes hullámaiban (kor, nem, társbetegségek, laboratóriumi eredmények)

2020. márciusa és decembere között a 495 DPCCK-ban elhunyt SARS-CoV-2 pozitív beteg közül 100 egyén boncolására került sor a SE Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetben. A 100 elhunytból 21 a pandémia első hullámában, míg 79 a második hullámban vesztette életét. A klinikopatológiai és hisztológiai elemzés a II. Sz. Patológiai Intézet és a DPCCK munkatársaival együtt történt (lásd 3.1. fejezet). A legfontosabb demográfiai adatok a 6. táblázatban láthatók. A nemek eloszlása azonos (50 – 50) volt. Az átlagéletkor 74,7 év (szórás=13,1), a medián értéke 77 év, a legfiatalabb elhunyt 40, míg a legidősebb 103 éves volt. A hospitalizáció 1 – 116 nap, mely statisztikailag különbözött a pandémia két hulláma között, az „első hullámban” átlagosan 24, a „másodikban” 10 nap volt ($p < 0,001$).

Az 6. táblázatban felsoroltak szerint számos társbetegség fordult elő az elhunytakban, legnagyobb arányban a hipertónia, kardiovaszkuláris megbetegedés, diabetes stb. Ugyancsak kiemelendő a túlsúlyosak (34) és az elhízottak (36) nagy száma.

A haláloki kategóriákba sorolás definícióját a 4. táblázat, illetve a bővebb kifejtését a 4.1.3. alfejezet tartalmazza, ugyanakkor az eredmények minél szélesebb spektrumon történő értelmezhetőségének érdekében már az alábbiakban (7. táblázat) is szerepeltetjük ezt a felosztási módot. Ennek alapján az „erős” összefüggési kategóriába 57, a „kiegészítő” kategóriába 27 és a „gyenge” összefüggési csoportba 16 elhunytat soroltunk.

Az elvégzett laboratóriumi vizsgálatok elérhető értékeit a 7. táblázat tartalmazza. Összességében elmondható, hogy CRP (C-reaktív protein), D-dimer, ferritin és interleukin-6 emelkedés fordult elő leggyakrabban.

6. táblázat A kutatás első szakaszában boncolt 100 SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt demográfiai és klinikai adatai (9).

Boncolt elhunytak száma; n	100
Nő; n (%)	50 (50,0)
Férfi; n (%)	50 (50,0)
Kor, év; átlag (szórás)	74,73 (13,11)
Nők kora, év; átlag (szórás)	77,50 (13,08)
Férfiak kora, év; átlag (szórás)	71,96 (12,67)
Korcsoportok, év; n (%)	
<51	7 (7,0)
51-60	3 (3,0)
61-70	23 (23,0)
71-80	34 (34,0)
81-90	23 (23,0)
>90	10 (10,0)
Komorbiditások az anamnézisekben; n (%)	
Hipertónia	85 (85,0)
Szív- és érrendszeri betegség	71 (71,0)
Diabétesz	40 (40,0)
Cerebrovaszkuláris betegség	31 (31,0)
Légzőszervi megbetegedés	30 (30,0)
Malignus tumor	20 (20,0)
Vesebetegség	19 (19,0)
Központi idegrendszer megbetegedése	15 (15,0)
Májbetegség	6 (6,0)
Testtömeg-index (BMI), kg/m ² ; átlag (szórás)	28,93 (7,20)
Testtömeg-index (BMI) kategóriák; n (%)	
<18.5	1 (1,0)
18.5-24.9	29 (29,0)
25-29.9	34 (34,0)
>30	36 (36,0)
Kórházi ápolás időtartama, nap; átlag (szórás)	18,62 (22,03)
Kórházi ápolás időtartam-kategóriáinként, nap; n (%)	
<1	0 (0)
1-2	13 (13,0)
3-4	6 (6,0)
5-9	22 (22,0)
10-15	20 (20,0)
>15	39 (39,0)
Intenzív osztályon ápoltak száma; n (%)	63 (63,0)

7. táblázat 100 boncolt, SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt normál tartománytól eltérő laboratóriumi adatainak száma, haláloki kategóriák szerinti csoportosításban (9).

Vizsgált elhunytak összesen: n=100	Elhunytak száma elérhető laborértékekkel n	Elhunytak száma abnormális laborértékekkel n (%)*	Haláloki kategóriák COVID-19 asszociáltság mértéke alapján			p-érték**
			erős n (%)	kiegészítő n (%)	gyenge n (%)	
Elhunytak száma (n)			57	27	16	
Emelkedett ALP (%) Normál tartomány: 40-130 U/l	82	28 (34,1)	17 (32,7)	5 (29,4)	6 (46,2)	0,599
Emelkedett bilirubin (%) Normál tartomány: 5-21 µmol/l	81	15 (18,5)	10 (19,2)	0 (0,0)	5 (38,5)	0,029
Emelkedett CK-MB (%) Normál tartomány: <24 U/l	58	27 (46,6)	15 (36,6)	7 (58,3)	5 (100,0)	0,018
Emelkedett CRP (%) Normál tartomány: <10 mg/l	89	84 (94,4)	51 (94,4)	18 (90,0)	15 (100,0)	0,445
Emelkedett D-Dimer (%) Normál tartomány: <500 ng/ml	84	80 (95,2)	50 (96,2)	16 (88,9)	14 (100,0)	0,445
Csökkent eGFR (CKD-EPI) (%) Normál tartomány: > 60 ml/min/1.73m ²	89	49 (55,1)	31 (57,4)	10 (50,0)	8 (53,3)	0,841
Emelkedett ferritin (%) Normál tartomány: 15-300 ng/ml	80	69 (86,3)	44 (89,8)	14 (77,8)	11 (84,6)	0,441
Emelkedett GGT (%) Normál tartomány: 12-52 U/l	82	63 (76,8)	44 (84,6)	12 (70,6)	7 (53,8)	0,05
Emelkedett AST (%) Normál tartomány: 13-40 U/l	82	41 (50,0)	29 (55,8)	7 (41,2)	5 (38,5)	0,384
Emelkedett ALT (%) Normál tartomány: 7-40 U/l	82	27 (32,9)	18 (34,6)	5 (29,4)	4 (30,8)	0,91
Emelkedett hs-Troponin I (%) Normál tartomány: <0.03 ng/ml	75	45 (60,0)	27 (55,1)	9 (60,0)	9 (81,8)	0,263
Emelkedett Interleukin-6 (%) Normál tartomány: 0.64-10 pg/ml	75	69 (92,0)	46 (93,9)	13 (86,7)	10 (90,9)	0,66
Emelkedett LDH (%) Normál tartomány: 240-480 U/l	85	63 (74,1)	44 (83,0)	10 (55,6)	9 (64,3)	0,047
Csökkent limfocita (%) Normál tartomány: 1.5-4 G/l	91	74 (81,3)	44 (81,5)	19 (86,4)	11 (73,3)	0,607
Emelkedett neutrofil (%) Normál tartomány: 2-7.5 G/l	91	60 (65,9)	40 (74,1)	12 (54,5)	8 (53,3)	0,141
Emelkedett NT-proBNP (%) Normál tartomány: 35-125 pg/ml	57	56 (98,2)	40 (97,6)	11 (100,0)	5 (100,0)	0,82
Emelkedett nitrogén vizeletben (%) Normál tartomány: 3-8 mmol/l	89	66 (74,2)	46 (85,2)	13 (65,0)	7 (46,7)	0,006
Emelkedett kreatinin (%) Normál tartomány: 61.9-114,9 µmol/l	89	40 (44,9)	25 (46,3)	9 (45,0)	6 (40,0)	0,91

* *n (%)*: normál tartománytól eltérő laborértékkel rendelkező elhunytak száma (adott kategóriában a rendelkezésre álló értékek közül a normál tartománytól eltérők százalékos aránya).

** *p-érték*: a kategóriák közötti összefüggéseket mutatja (szingifikancia= $p < 0,05$; vastaggal jelölve).

ALP=alkalikus foszfatáz, CK-MB=kreatin-kináz myocardial band, CRP=C-reaktív protein, eGFR (CKD-EPI)=estimated glomerular filtration rate from the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation, GGT=gamma glutamil transzferáz, hs-Troponin=nagy érzékenyséű troponin, AST=aszpartát-aminotranszferáz, ALT=alanin-aminotranszferáz, LDH=laktát dehidrogenáz, NT-proBNP=N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid.

A vizsgálat második szakaszában további 50, azaz így már összesen 150 elhunyt adatait elemeztük, 2020. márciusa és 2022. márciusa között (8. táblázat). Nemek eloszlását tekintve az arány megváltozott 69 nő és 81 férfire. A 150 esetre bővült csoport átlagéletkora 69,9 évre (szórás=14,3) csökkent, a medián 71,5 évnél adódott, a legfiatalabb elhunyt 26, a legidősebb 103 éves volt. A Mann-Whitney-próba eredménye alapján életkor tekintetében szignifikáns különbség volt az eredeti (100 elhunyt) csoport és azt ezt bővítő 50 elhunyt adatait tartalmazó (átlagéletkor 61,0 év, medián 60,5 év, minimum 26 év, maximum 88 év) csoport között. Az 50 esettel kiegészítve az egyes halálkezelési kategóriák számai a következőképpen módosultak: „erős” kategóriában 79 elhunytat, ami a teljes vizsgálati kohorsz 52,67%-a; „kiegészítő” kategóriába 47 (31,33%); „gyenge” kategóriába 24 (16%) elhunytat soroltunk be.

A korábbi szakaszban bemutatott eredmények tanulságai alapján szelektált, releváns laboratóriumi paraméterek közül a CRP 96,1% volt emelkedett, ezt követte a GGT (75,8%), a csökkent limfocita szám (74,8%) és az emelkedett neutrofil szám (67,2%) (9. táblázat).

8. táblázat 150 SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt demográfiai és klinikai adatai (27).

Boncolt elhunytak száma; n	150
Nő; n (%)	69 (46,0)
Kor, év; átlag (szórás)	69,61 (14,31)
Nők kora, év; átlag (szórás)	72,88 (13,57)
Férfiak kora, év; átlag (szórás)	66,81 (14,41)
Korcsoportok, év; n (%)	
<51	17 (11,33)
51-60	18 (12,0)
61-70	39 (26,0)
71-80	41 (27,33)
81-90	26 (17,33)
>90	9 (6,0)
Komorbiditások az anamnézisekben; n (%)	
Hipertenzió	106 (70,67)
Szív- és érrendszeri betegség	82 (54,67)
Diabétesz	50 (33,33)
Cerebrovaszkuláris betegség	41 (27,33)
Légzőszervi megbetegedés	37 (24,67)
Malignus tumor	25 (16,67)
Vesebetegség	24 (16,00)
Központi idegrendszer megbetegedése	20 (13,33)
Májbetegség	10 (6,67)
Testtömeg-index (BMI), kg/m ² ; átlag (szórás)	27,98 (6,70)
Testtömeg-index (BMI) kategóriák; n (%)	
<18.5	3 (2,0)
18.5-24.9	58 (38,67)
25-29.9	41 (27,33)
>30	48 (32,0)
Kórházi ápolás időtartama, nap; átlag (szórás)	17.26 (16.66)
Kórházi ápolás időtartam-kategóriáinként, nap; n (%)	
<1	8 (5,33)
1-2	18 (12,0)
3-4	11 (7,33)
5-9	20 (13,33)
10-15	28 (18,67)
>15	65 (43,3)
Intenzív osztályon ápoltak száma; n (%)	83 (55,33)

9. táblázat 150 boncolt, SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt normál tartománytól eltérő laboratóriumi adatainak száma (27).

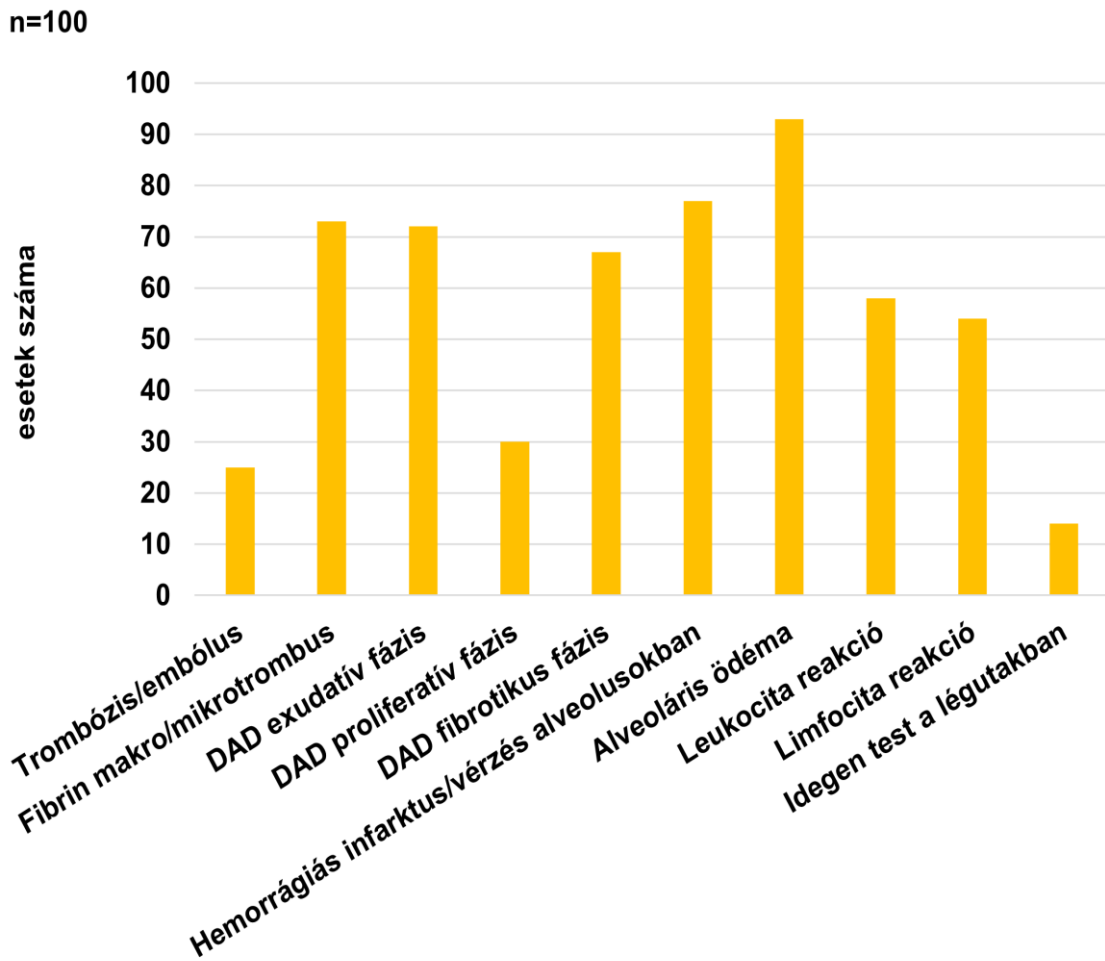
Vizsgált elhunytak összesen: n=150	Elhunytak száma elérhető laborértékkal n	Elhunytak száma abnormális laborértékkal n (%)
Emelkedett AST aktivitás Normál tartomány: 13-40 U/l	120	57 (47,5)
Emelkedett ALT aktivitás Normál tartomány: 7-40 U/l	120	51 (42,5)
Emelkedett ALP aktivitás Normál tartomány: 40-130 U/l	120	46 (38,3)
Emelkedett GGT aktivitás Normál tartomány: 12-52 U/l	120	91 (75,8)
Emelkedett bilirubin koncentráció Normál tartomány: 5-21 µmol/l	119	29 (24,4)
Emelkedett CRP koncentráció Normál tartomány: <10 mg/l	129	124 (96,1)
Csökkent limfocita szám Normál tartomány: 1.5-4 G/l	131	98 (74,8)
Emelkedett neutrofil szám Normál tartomány: 2-7.5 G/l	131	88 (67,2)

AST=aszpartát-aminotranszferáz, ALT=alanin-aminotranszferáz, ALP=alkalikus foszfatáz, GGT=gamma glutamil transzferáz, CRP=C-reaktív protein

4.1.2 A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak kórbonctani mintáiban észlelt hisztológiai elváltozások szemikvantitatív értékelése

4.1.2.1 A tüdő hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése

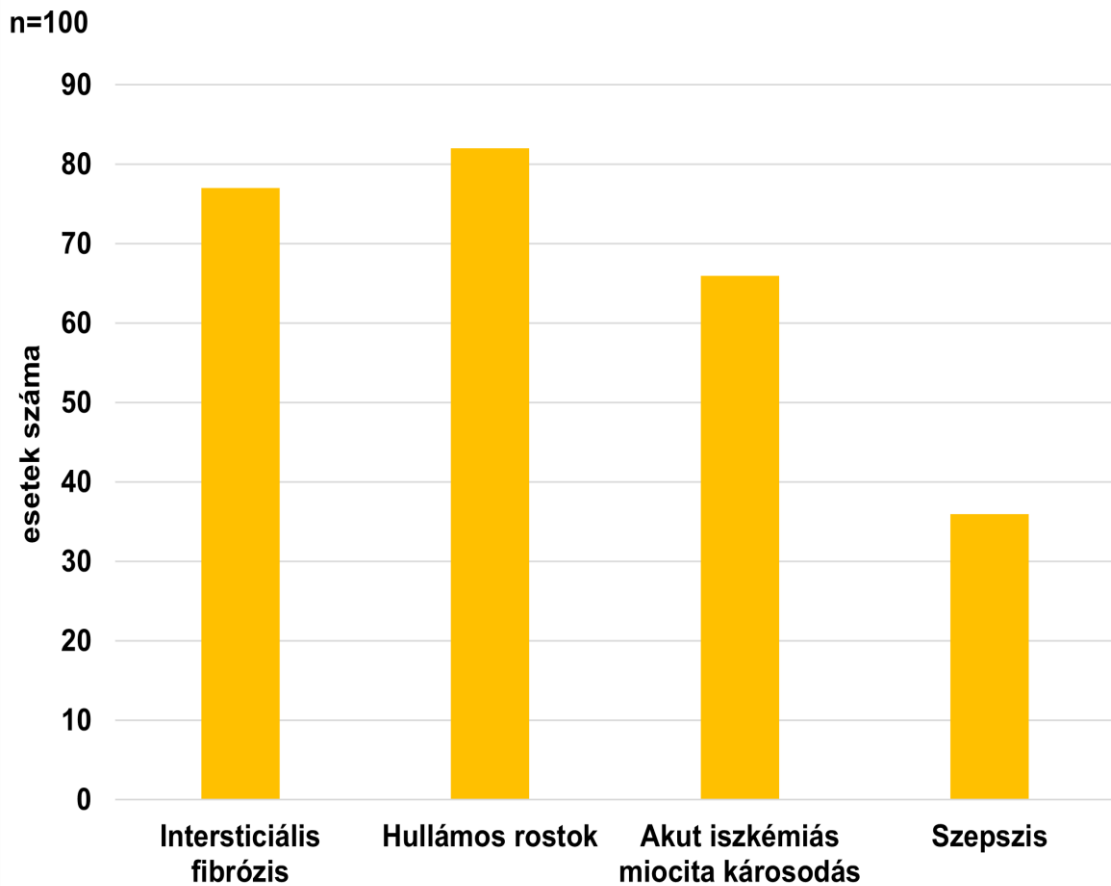
A patológus szakorvosok által értékelt súlyossági pontértékek alapján legnagyobb arányban az alveolaris ödéma, az infarktus és vérzés, a DAD (diffúz alveolaris károsodás exudatív és proliferatív fázisa) fordult elő, a limfocita és leukocita reakció mellett (7. ábra).



7. ábra A tüdőelváltozások megoszlása a 100 SARS-CoV-2 fertőzött elhunytban (9).

4.1.2.2 A szív hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése

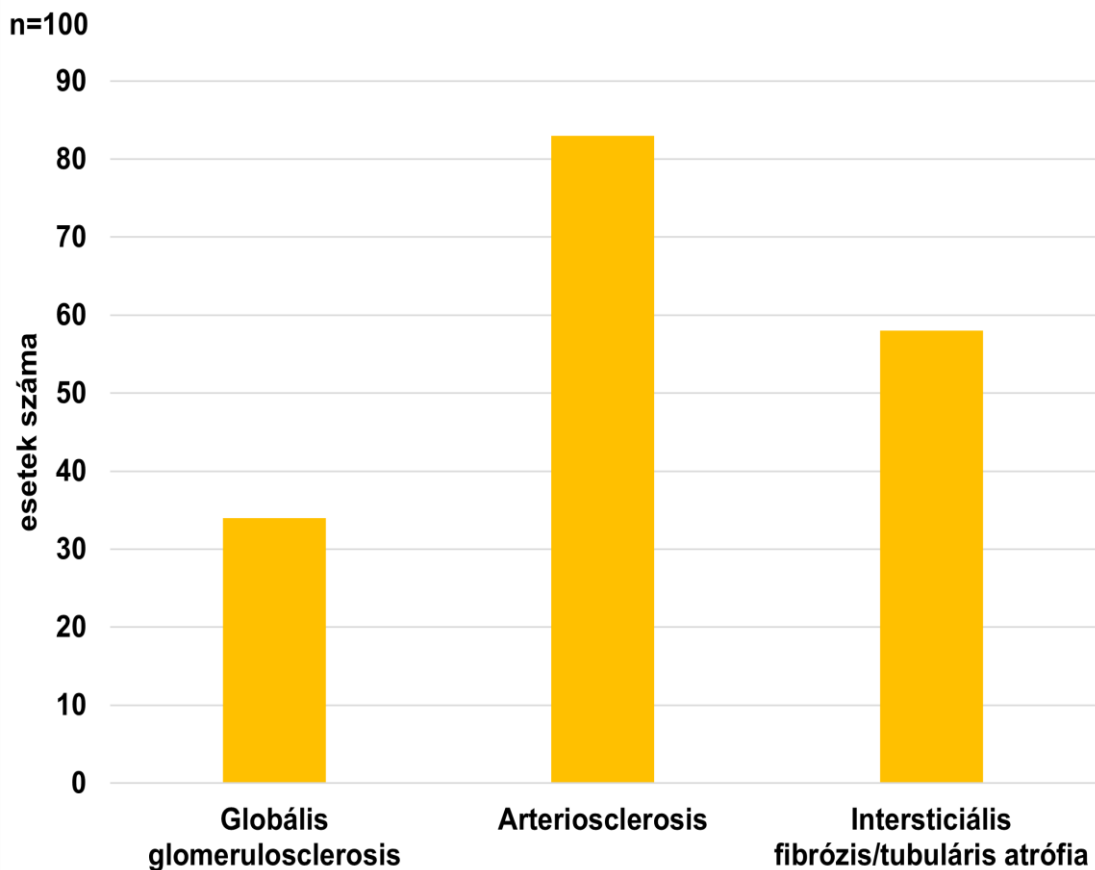
A szívben észlelt elváltozások közül az ún. hullámos rostok (*wavy fibers*), intersticiális fibrózis, akut myocardialis iszkémiás károsodás és szepszis fordult elő legnagyobb arányban (8. ábra).



8. ábra A szívelváltozások megoszlása a 100 SARS-CoV-2 fertőzött elhunytban (9).

4.1.2.3 A vese hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése

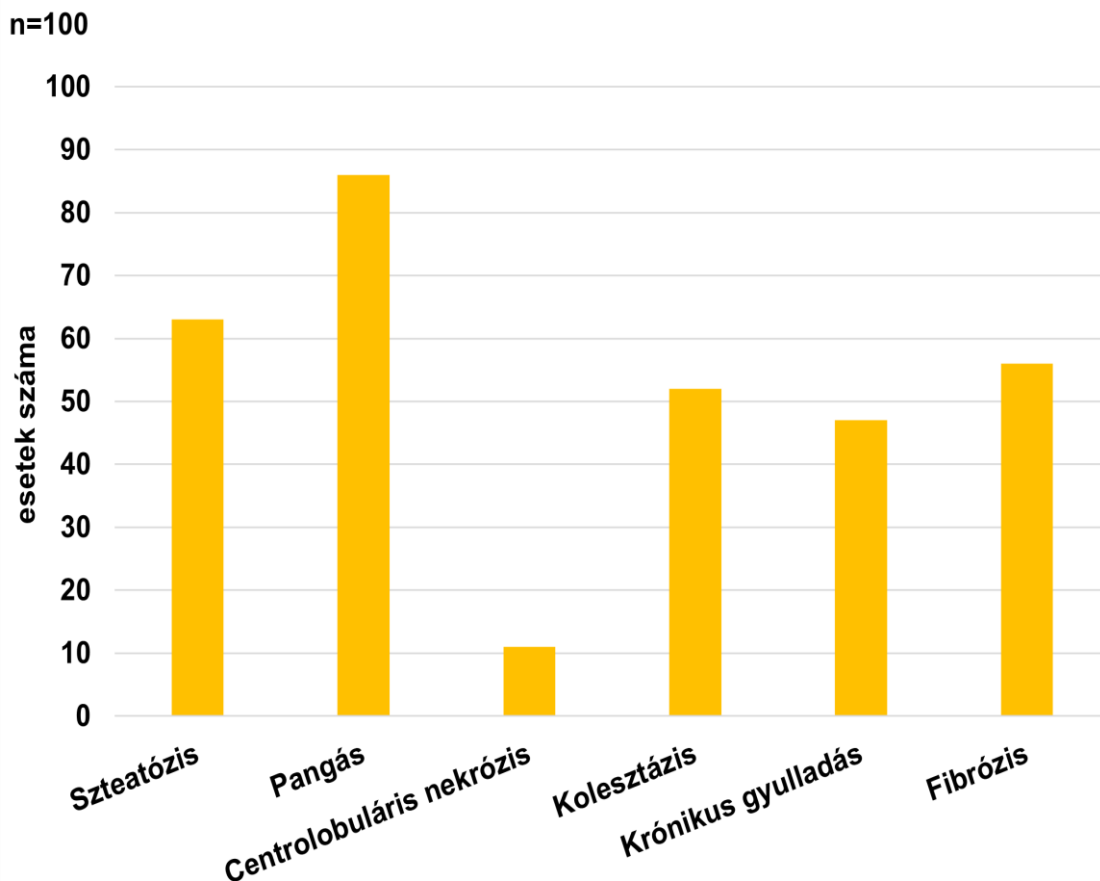
A vesében az arteriosclerosis, az intersticiális fibrózis és a glomerulosclerosis volt a legnagyobb arányban észlelhető (9. ábra).



9. ábra A veseelváltozások megoszlása a 100 SARS-CoV-2 fertőzött elhunytban (9).

4.1.2.4 A máj hisztológiai elváltozásainak szemikvantitatív értékelése

A májban észlelt elváltozások közül, az első 100 eset elemzése során a pangás, szteatózis, fibrózis, kolesztázis, krónikus gyulladás volt észlelhető (10. ábra). A májban észlelt további, részletesebb elváltozások analízisét a későbbiekben, a 150 eset bemutatása során ismertetjük.



10. ábra A májelváltozások megoszlása a 100 SARS-CoV-2 fertőzött elhunytban (9).

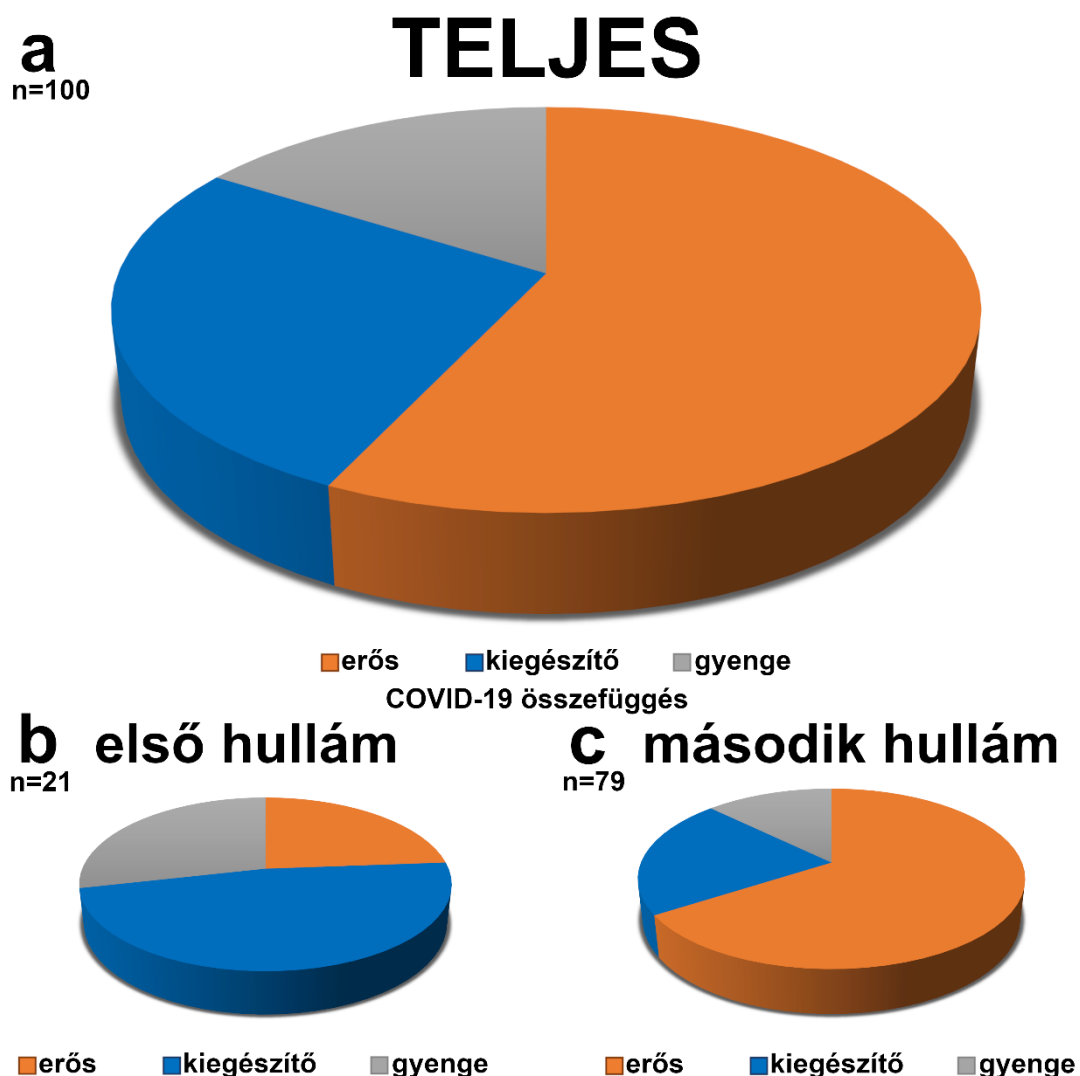
4.1.3 A SARS-CoV-2, mint halálóki tényező szerepének vizsgálata a fertőzöttekben, a társbetegségek figyelembevételével

A patológusok és klinikusok közti megbeszélés során igyekeztünk a hisztológiai elváltozások súlyosságát összevetni a klinikopatológiai adatok elemzésével a halál okának megállapítására. Ennek célja annak a megállapítása volt, hogy a vírusfertőzés mennyiben járult hozzá közvetlenül a halál bekövetkezéséhez. Az elemzés során az egyes szervekben észlelt elváltozások súlyosságát, a komorbiditások fennállását, a laboratóriumi eredményeket, a klinikai lefolyást vizsgáltuk, esetről – esetre, melynek alapján történt az egyes esetek valamely halálóki kategóriába történő besorolása. A halálóki kategóriák meghatározásának módját a már ismertett 4. táblázat tartalmazza.

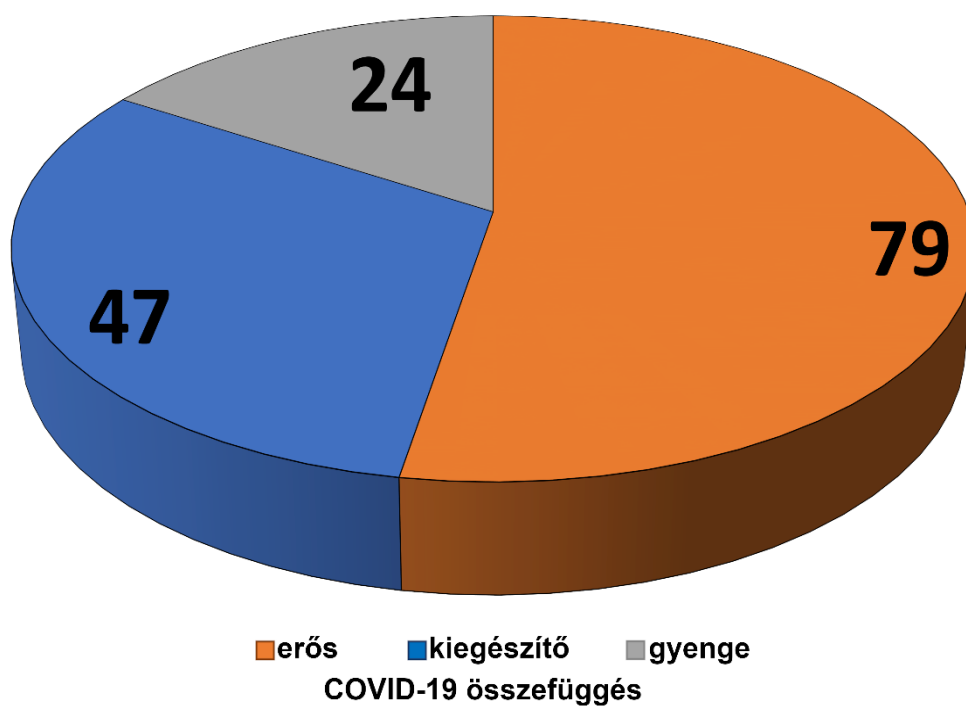
Az egyes halálóki kategóriák eloszlását mutatja a 11. ábra az első 100 eset elemzése során, melyen látható, hogy az összesített elemzés során az „erős” összefüggésű esetek domináltak (11. ábra/a). Az első hullámban azonban az arány a „kiegészítő” kategória

javára (11. ábra/b), míg a második hullámban (11. ábra/c) az „erős” összefüggést mutató kategória javára tolódott el. A megfigyelést a Khi-négyzet próba eredménye statisztikailag alátámasztja. Az újabb 50 esettel kiegészítve továbbra is az „erős” kategória dominált (12. ábra).

A BMI (kg/m^2) az „erős” összefüggésű csoportban volt a legmagasabb, de nem szignifikánsan (10. táblázat). A kardiovaszkuláris, valamint a légzőszervi betegségek a „kiegészítő” kategóriában nagyobb arányban voltak. (10. táblázat). A központi idegrendszer megbetegedése szignifikánsan gyakoribb volt a „kiegészítő” kategóriában, míg a „gyenge” kategóriában a malignus tumorok előfordulása volt szignifikánsan magasabb (10. táblázat).



11. ábra A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak (100 eset) eloszlása haláluki kategóriák szerint, összesítve (a), az első (b) és a második (c) hullámban (9).



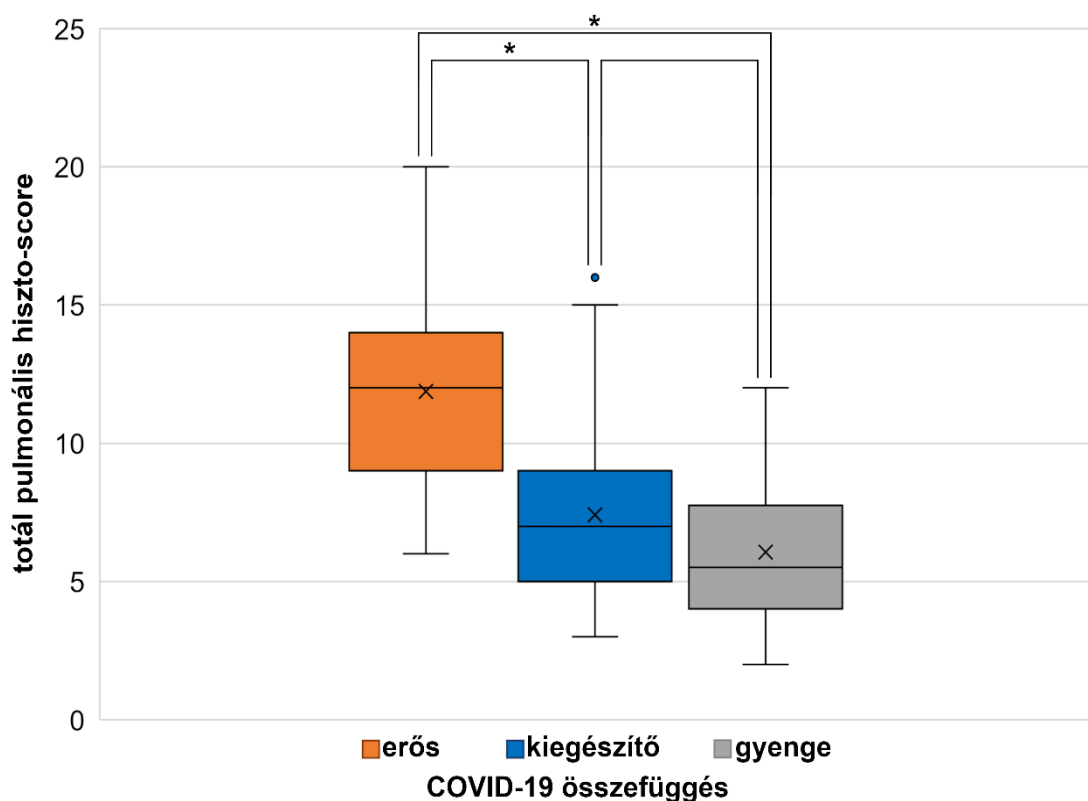
12. ábra A SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak (150 eset) összesített eloszlása haláloki kategóriák szerint (27).

10. táblázat 100 boncolt, SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt demográfiai adatai és komorbiditásai haláloki kategóriák szerinti bontásban, ezek összefüggései (9).

Vizsgált elhunytak összesen: n=100	Haláloki kategóriák COVID-19 asszociáltság mértéke alapján			p-érték
	erős n (%)	kiegészítő n (%)	gyenge n (%)	
Boncolt elhunytak száma; n	57 (100%)	27 (100%)	16 (100%)	
Kor, év; átlag (szórás)	74,58 (11,82)	74,96 (16,41)	74,88 (12,09)	0,991
Korcsoportok, év; n (%)				0,697
<51	3 (5,3)	3 (11,1)	1 (6,2)	
51-60	2 (3,5)	0 (0,0)	1 (6,2)	
61-70	14 (24,6)	7 (25,9)	2 (12,5)	
71-80	20 (35,1)	7 (25,9)	7 (43,8)	
81-90	14 (24,6)	5 (18,5)	4 (25,0)	
>90	4 (7,0)	5 (18,5)	1 (6,2)	
Nő; n (%)	24 (42,1)	14 (51,9)	12 (75,0)	0,059
Komorbiditások az anamnézisekben; n (%)				
Hipertenzió	49 (86,0)	23 (85,2)	13 (81,2)	0,925
Szív- és érrendszeri betegség	40 (70,2)	20 (74,1)	11 (68,8)	0,909
Diabétesz	26 (45,6)	9 (33,3)	5 (31,2)	0,456
Cerebrovaszkuláris betegség	17 (29,8)	8 (29,6)	6 (37,5)	0,833
Légzőszervi megbetegedés	17 (29,8)	9 (33,3)	4 (25,0)	0,870
Malignus tumor	6 (10,5)	8 (29,6)	6 (37,5)	0,015
Vesebetegség	9 (15,8)	6 (22,2)	4 (25,0)	0,598
Központi idegrendszer megbetegedése	4 (7,0)	8 (29,6)	3 (18,8)	0,018
Májbetegség	2 (3,5)	1 (3,7)	3 (18,8)	0,088
Testtömeg-index (BMI), kg/m ² ; átlag (szórás)	30,41 (6,77)	26,77 (6,84)	27,33 (8,41)	0,059
Kórházi ápolás időtartama, nap; átlag (szórás)	18,12 (21,06)	18,19 (21,21)	21,12 (27,56)	0,886
Kórházi ápolás időtartama, nap; medián (IQR=interkvartilis tartomány)	14,00 [7,00; 20,00]	12,00 [4,50; 21,50]	15,50 [4,50; 26,50]	0,775
Kórházi ápolás időtartam- kategóriánként, nap; n (%)				
<1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
1-2	6 (10,5)	4 (14,8)	3 (18,8)	
3-4	2 (3,5)	3 (11,1)	1 (6,2)	
5-9	13 (22,8)	6 (22,2)	3 (18,8)	
10-15	13 (22,8)	6 (22,2)	1 (6,2)	
>15	23 (40,4)	8 (29,6)	8 (50,0)	
Intenzív osztályon ápoltak; n (%)	45 (78,9)	13 (48,1)	5 (31,2)	<0,001
Pandémia hulláma; n (%)				
első hullám	5 (8,8)	10 (37,0)	6 (37,5)	
második hullám	52 (91,2)	17 (63,0)	10 (62,5)	

4.1.4 Az egyes szervekben észlelt hisztológiai elváltozások súlyossági fokozatának elemzése, összefüggése a tüdőben észlelt patológiai kép súlyosságával és a SARS-CoV-2 fertőzés halálokban betöltött szerepével

A tüdőben észlelt egyes hisztológiai eltérések súlyosságának értékelésével, a pontértékek (0-3) összeadásával képeztük az ún. „Totál pulmonális hiszto-score” (TP) értéket. A TP értékeket a három haláloki kategória szerint csoportosítva, különbséget észleltünk a kategóriák között (13. ábra). Az erős és kiegészítő, valamint az erős és gyenge kategóriák között ($p < 0,0001$) szignifikáns, a kiegészítő és a gyenge csoport között viszont nem észleltünk szignifikáns összefüggést ($p > 0,05$) (13. ábra).

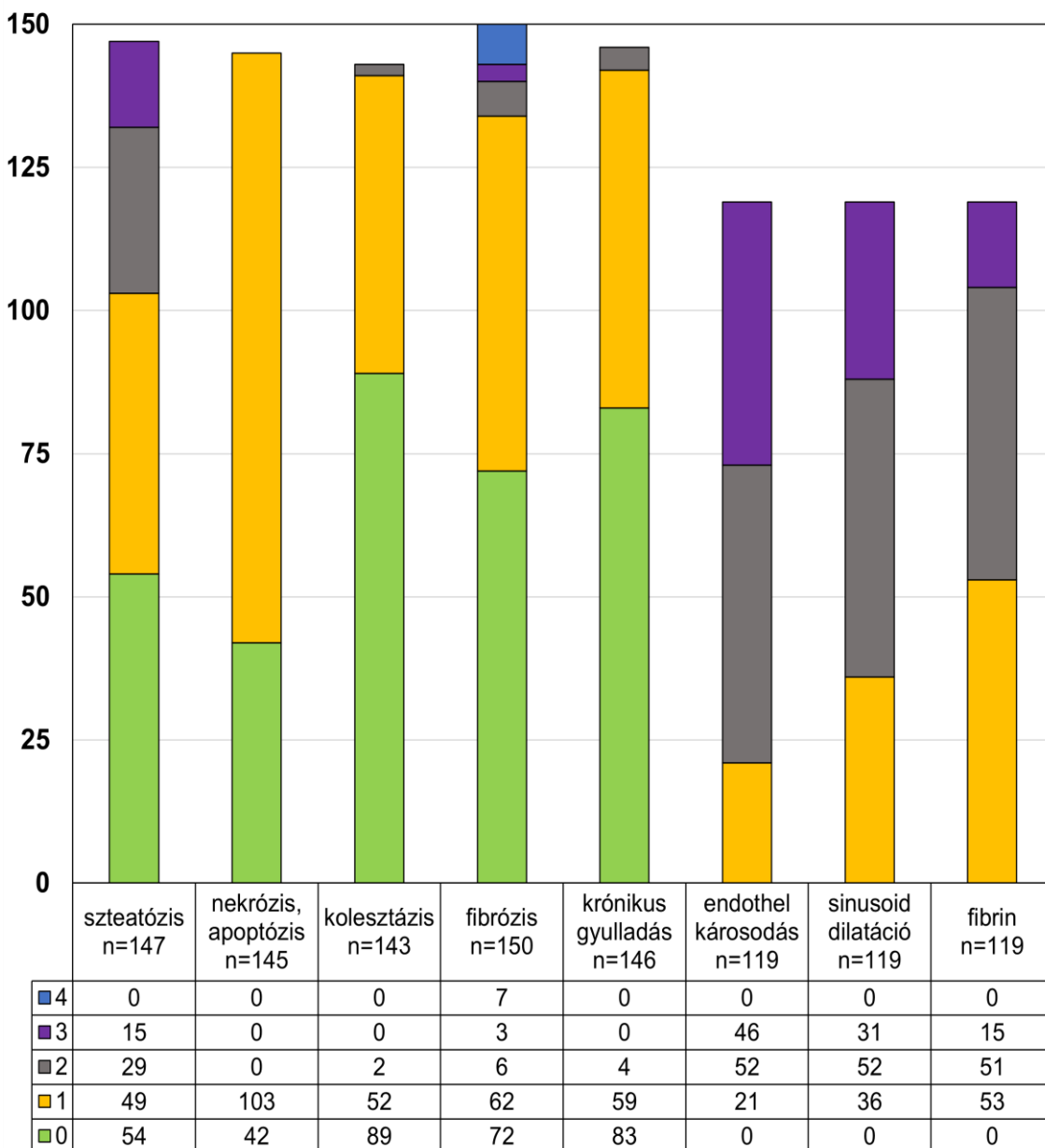


13. ábra Totál pulmonális hiszto-score értékek összehasonlítása haláloki kategóriánként. A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik ($\alpha = 0,05$) (9).

4.1.5 A májban észlelt hisztológiai elváltozások SARS-CoV-2 fertőzésben

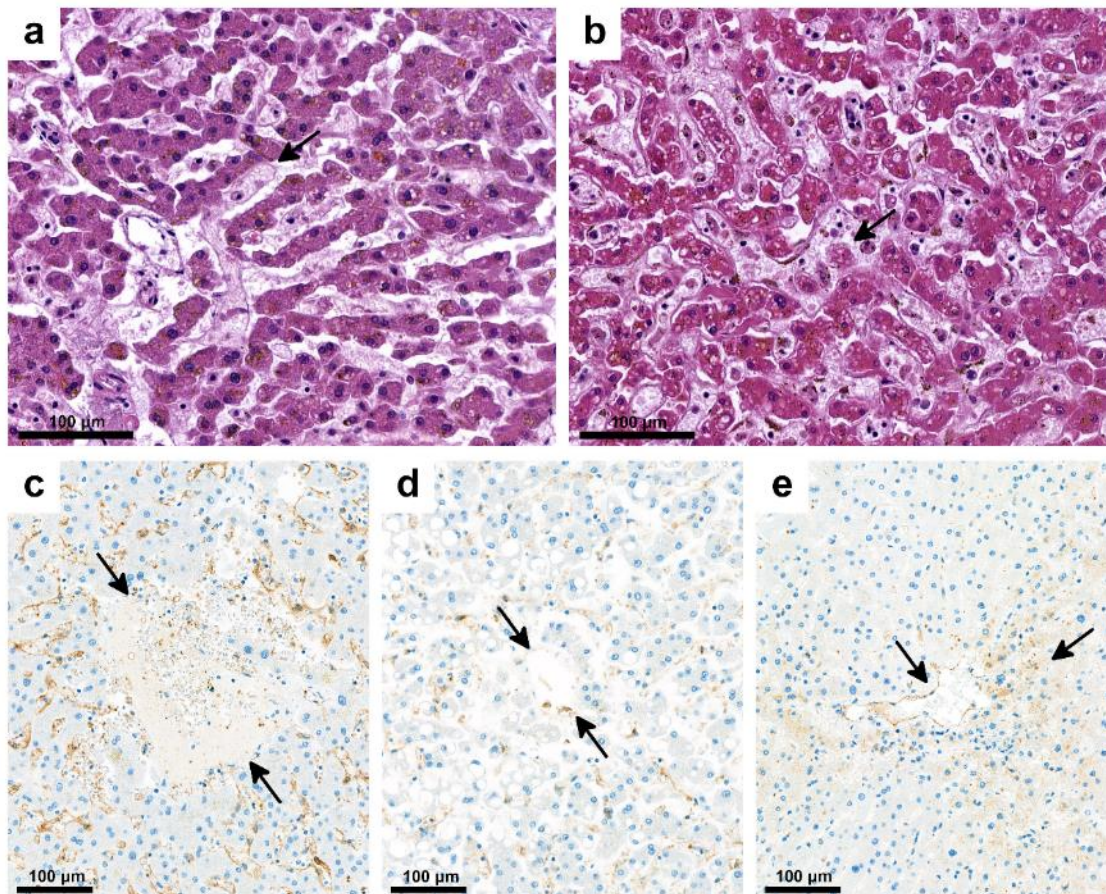
A májban észlelt hisztológiai elváltozásokat korábban ismertettük az első 100 eset elemzése során. (4.1.2. alfejezet). Ezt követően 150 boncolási esetben is elemeztük az eltéréseket. Néhány esetben előfordult, hogy a minta minősége, autolizáltsága nem tette

lehetővé az adott paraméter megítélését. Az egyes elváltozásokban észlelt súlyossági fokozatot (0-3, fibrózis 0-4) a 14. ábra mutatja. 7 esetben volt jelen cirrhosis (F4), 3-ban F3, 68-ban F1-2, míg fibrózist nem detektáltunk 48%-ban (72/150). Szteatózis igen nagy arányban mutatkozott (93/147; 63,27%), változó súlyossági fokozatban. Jelentős lobuláris, portális, periportális gyulladás nem volt jelen. A CK7-tel ábrázolt epeutak a cirrhotikus eseteket kivételével, csak minimális duktuláris reakciót mutattak. Egyes- sejt nekrozis/apoptózis, ritkábban zonális/fokális nekrozis megfigyelhető volt.



14. ábra Leggyakoribb szövettani elváltozások a májban, 150 SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt esetében. Pontozás: 0-3, kivéve fibrózis: 0-4 (27).

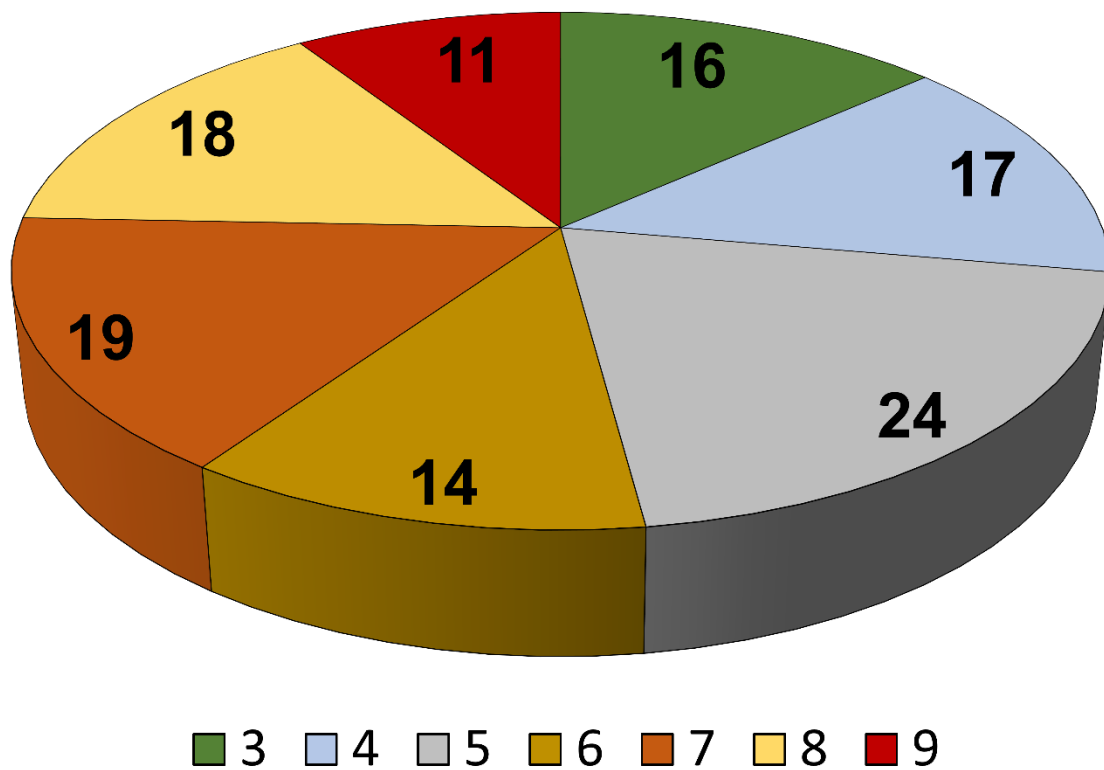
A fenti viszonylag enyhébb parenchyma-elváltozásokkal szemben súlyos eltéréseket figyeltünk meg a vaszkuláris és sinusoidealis endothelsejtekben. (15. ábra/a, b). Az endothelsejt károsodás különösen jól demonstrálható volt a Claudin-5 (15. ábra/c) és CD31 (15. ábra/d) IHC reakciókkal. A fibrin kiáramlást Faktor VIII (15. ábra/e) IHC reakció szemléltette.



15. ábra Máj szövetek endothelsejt károsodása: hematoxilin-eozin festett metszeteken (a, b), Claudin-5 (c), CD31 (d) és a fibrin kiválasztást jelző Faktor VIII (e) immunhisztokémiai reakciókkal DAB kromogénnel (27).

Az endothel elváltozások együtt jártak a 3. zóna sinusoidok és a Disse-tér ektáziával és fibrin akkumulációval. A sinusoid ektázia (S), endothel károsodás (E) és fibrin akkumuláció (F) mértékét részemenként 0-3 súlyossági pontértéssel jelöltük (SEF-score), mely legmagasabb pontértéke így 9 lehetett. Ennek ábrázolását a 16. ábra mutatja. A máj SEF pontok és a tüdő TP értékek között nem találtunk szignifikáns összefüggést ($p=0,96$).

n=119



16. ábra A sinusoidális elváltozások súlyossága (SEF-score) és eloszlása 119 SARS-CoV-2 fertőzött elhunyt esetén a májban. A különböző színű négyzetek és a csatlakozó számok a SEF-score értékét jelzik, mely maximálisan 9 lehet (S:3+E:3+F:3) esetenként (27).

4.1.6 Egyes sejttípusok identifikálására használt IHC reakciók

Az egyes sejttípusok identifikálására megfelelő antitesteket használtunk (3. táblázat). Az endothelsejteket CD31, CD34, Claudin-5 ellenes, a makrofágokat CD68, a cholangiocytákat CK7 ellenes antitestekkel azonosítottuk. Az IHC reakciók eredményeként egyértelműen azonosítani lehetett, a hisztológiai vizsgálatot kiegészítve, a sejteket, valamint segítette a károsodás mértékének a megállapítását. Ennek kiemelt jelentőséget tulajdonítottunk az endothelsejtek vizsgálata során, melyek károsodásáról az előző alfejezetben szóltunk.

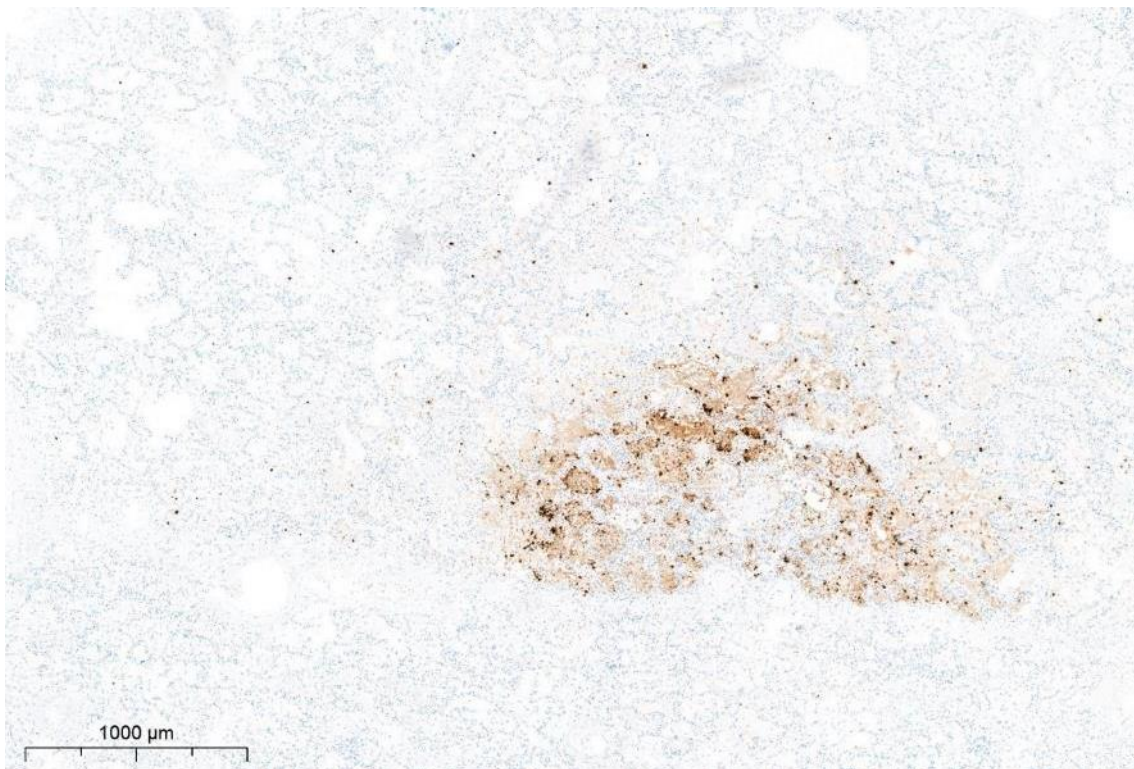
4.2 A SARS-CoV-2 egyes protein és RNS komponenseinek kimutatása a fertőzöttek boncolási anyagában immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel

4.2.1 A SARS-CoV-2 vírus komponenseinek detektálása különböző szövetekben és sejtekben

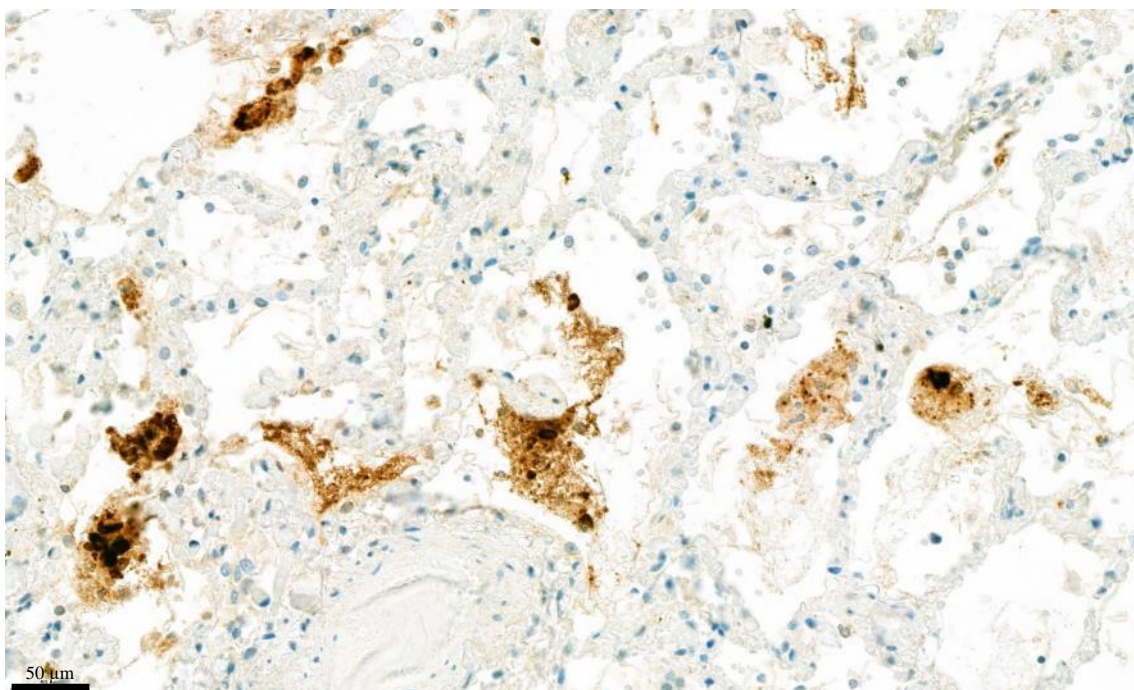
4.2.1.1 Immunhisztokémia

A HE metszetek már ismertetett (4.1 alfejezet) eredményeinek hisztológiai áttekintését követően, IHC vizsgálatokat végeztünk a SARS-CoV-2 protein komponenseinek, így a nukleokapszid fehérje (NP) és a tüskefehérje (spike) kimutatására.

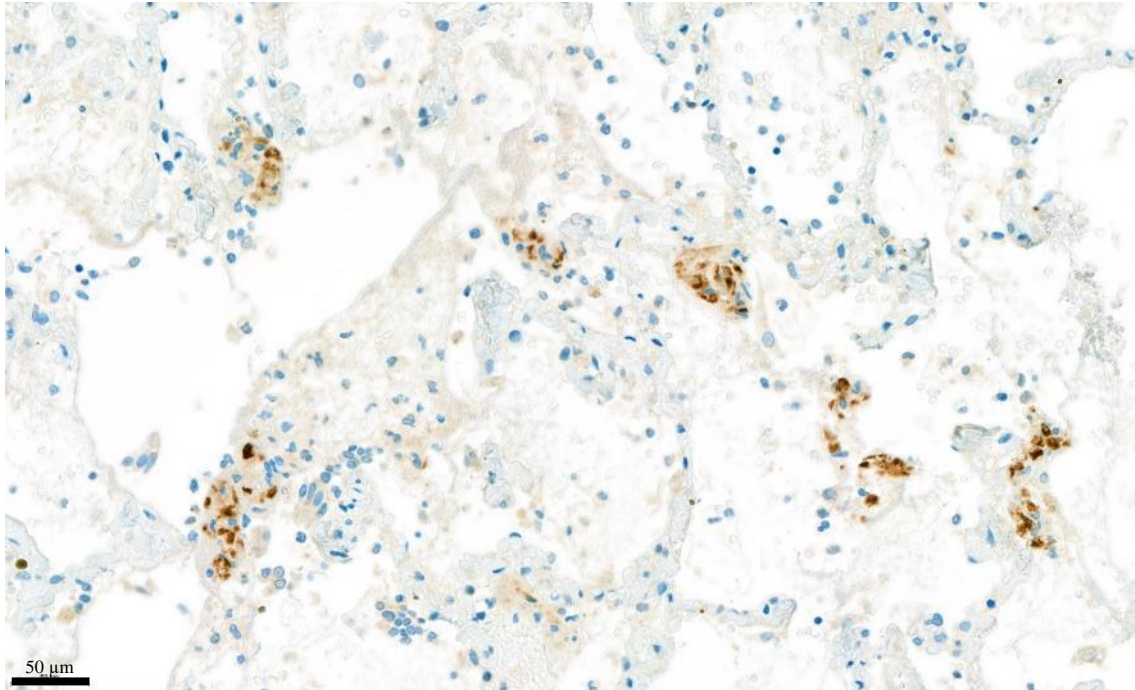
A vírus fehérjéinek eloszlása fokális mintázatban volt megfigyelhető a metszeteken, egyes területeken nem volt reakció, míg a tüdőmetszetek más területein intenzív reakció mutatkozott (17. ábra). Az eloszlás metszetenként is változott. A NP fehérje citoplazmatikus, valamint magi expressziót (18. ábra), míg a tüskefehérje csak citoplazmatikus megjelenést mutatott (19. ábra) a pneumocytákban. Általánosan megfigyelhető volt, hogy a NP IHC intenzívebb festődést adott a tüskefehérjénél. Mindkét fehérje jelentős mennyiségben kimutatható volt intraalveolárisan, a levált alveoláris sejtekben és a szövettörmelékben (20. ábra, 21. ábra).



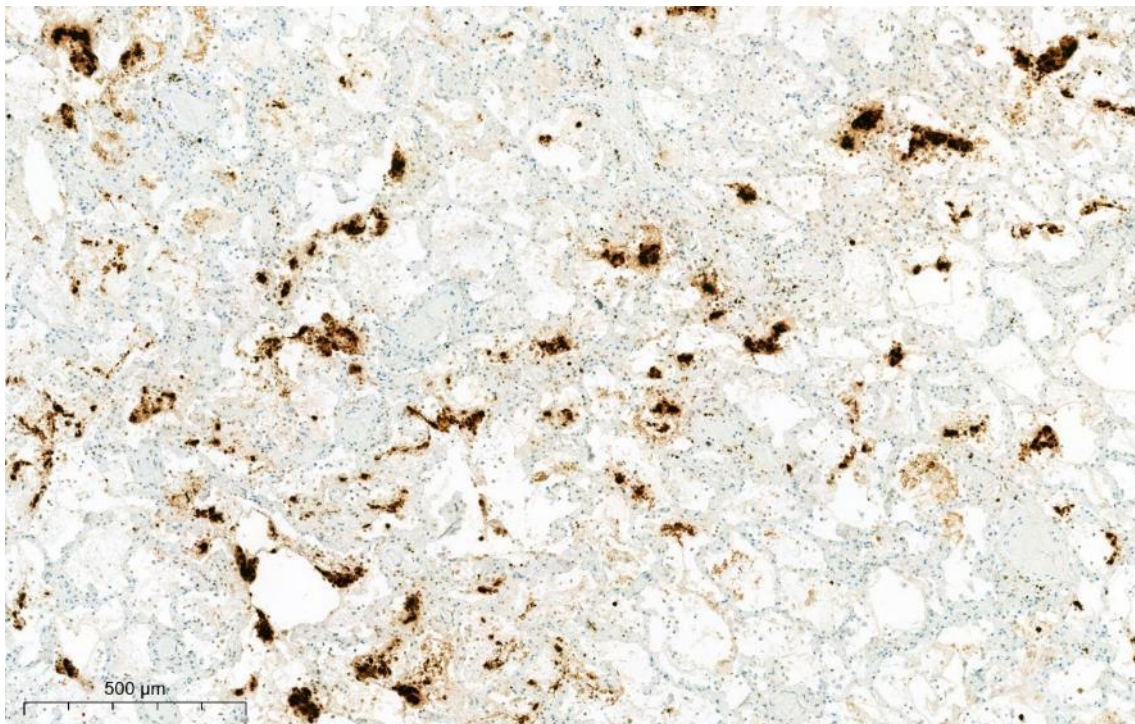
17. ábra Fokálisan megjelenő pozitív SARS-CoV-2 nukleokapszid fehérje immunhisztokémiai reakció DAB kromogénnel, vírus fertőzött tüdőszövetben (saját készítésű ábra).



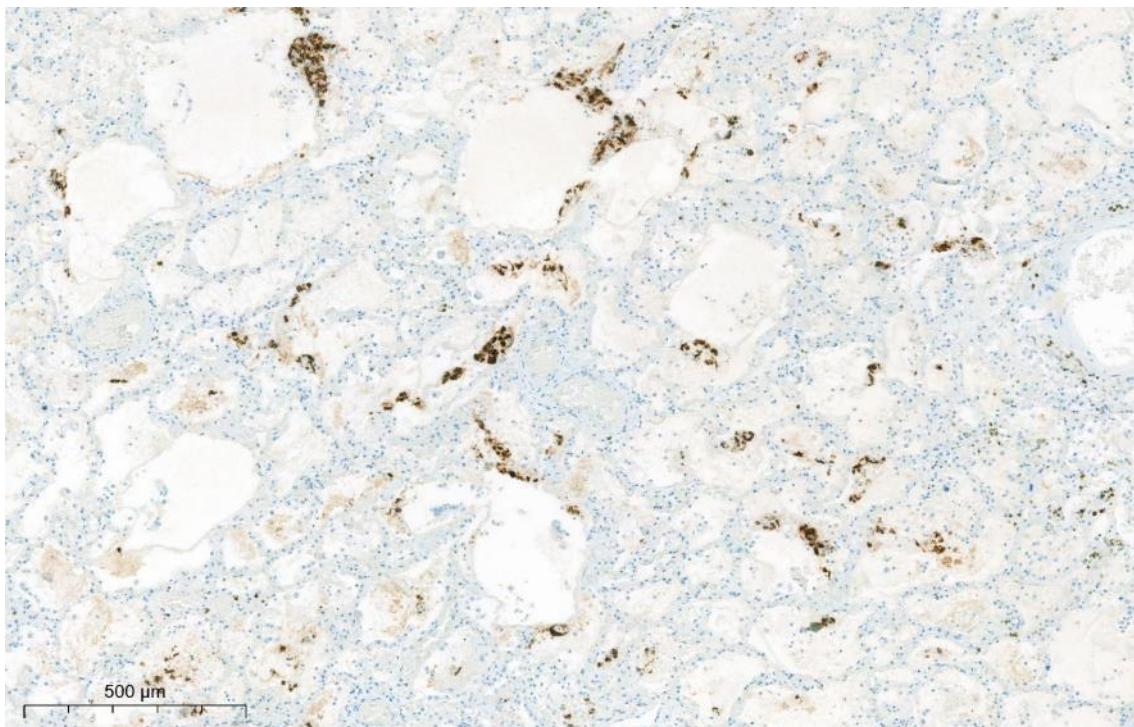
18. ábra Pozitív SARS-CoV-2 nukleokapszid fehérje immunhisztokémiai reakció DAB kromogénnel vírus fertőzött tüdőszövetben. Erős citoplazmatikus, valamint magi expresszió észlelhető a levált sejtekben, alveoláris terekben (9).



19. ábra Pozitív SARS-CoV-2 tüskefehérje immunhisztokémiai reakció DAB kromogénnel vírus fertőzött tüdőszövetben. Erős citoplazmatikus expresszió észlelhető az alveolusok falában, pneumocytákban (9).

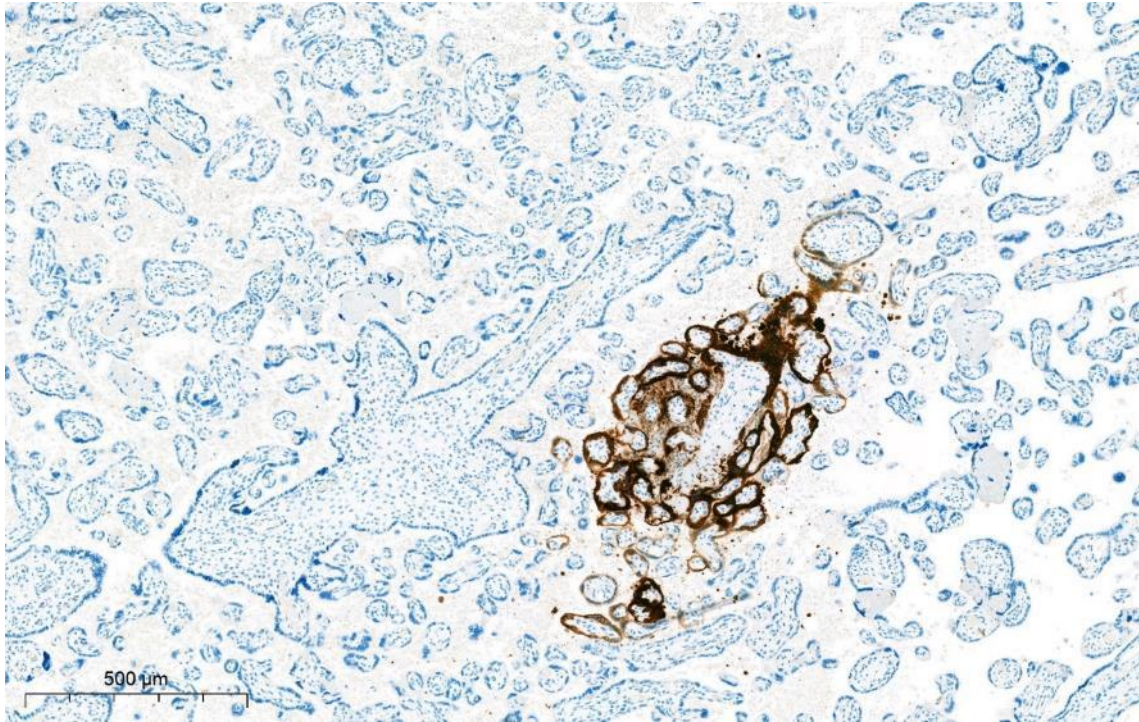


20. ábra SARS-CoV-2 nukleokapszid fehérje pozitív immunhisztokémiai reakció DAB kromogénnel, vírus fertőzött tüdőszövetben, a levált alveoláris hámsejtekben, sejtörmelékben (saját készítésű ábra).

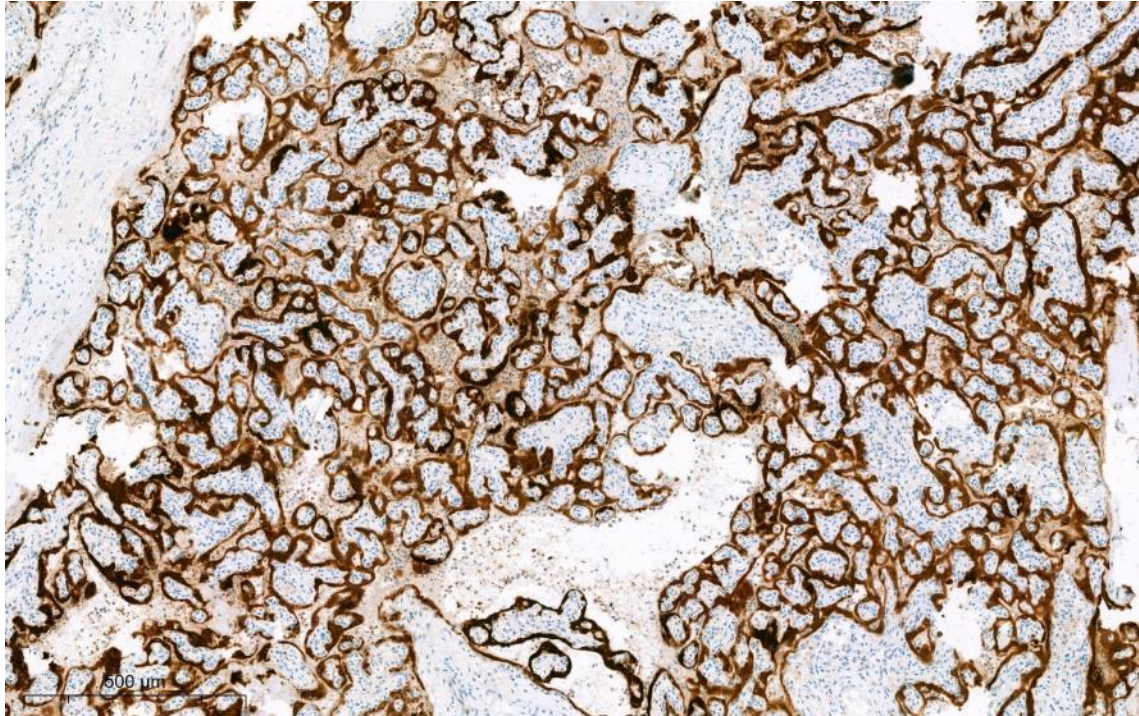


21. ábra SARS-CoV-2 tüskefehérje pozitív immunhisztokémiai reakció DAB kromogénnel, vírus fertőzött tüdőszövetben, a levált alveoláris sejtekben, sejttörmelékben (saját készítésű ábra).

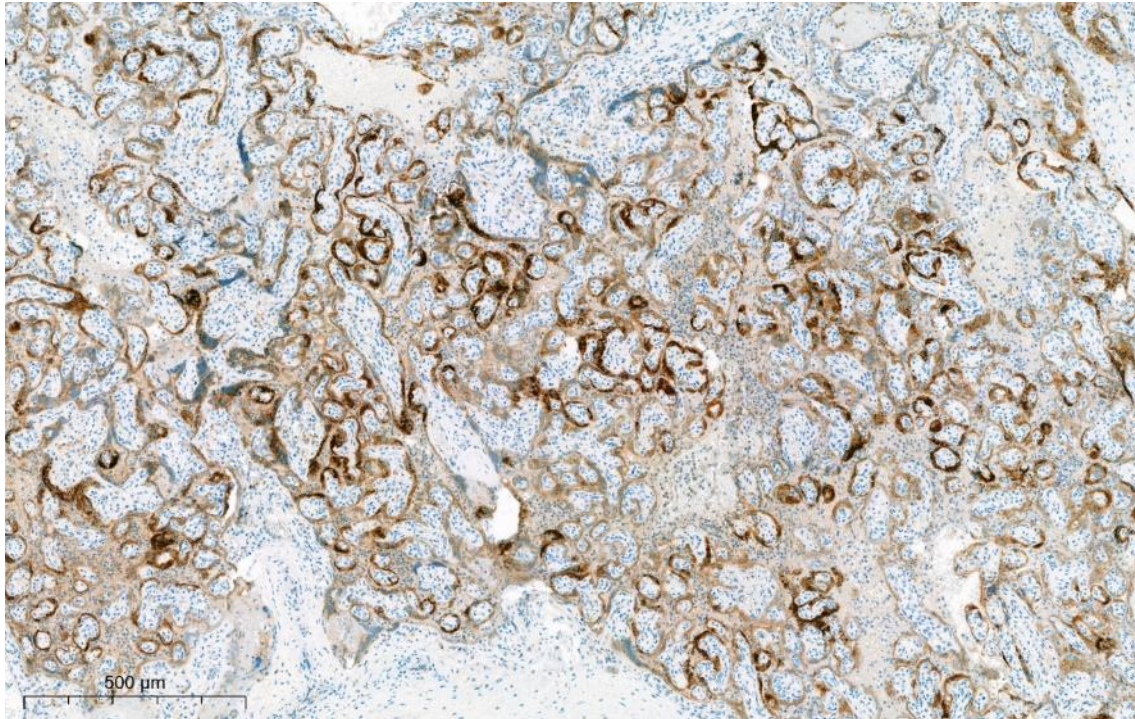
Az IHC reakció további kontrolljaként RT-PCR reakcióval bizonyítottan SARS-CoV-2 pozitív és negatív **placenta** szövetet is használtunk. A tüdőhöz hasonlóan itt is észlelhető volt a vírus fokálisan pozitív megjelenése (22. ábra). Mind a NP (23. ábra), mind a tüskefehérje (24. ábra) igen intenzív reakciót mutatott a fertőzött placenta mintákban. A vírusfehérjék a syncytiotrophoblastokban voltak detektálhatóak, míg a magzati erekben nem volt látható pozitívítás.



22. ábra Fokálisan megjelenő SARS-CoV-2 nukleokapszid fehérje immunhisztokémiai reakció pozitívitas DAB kromogénnel, placentában (saját készítésű ábra).

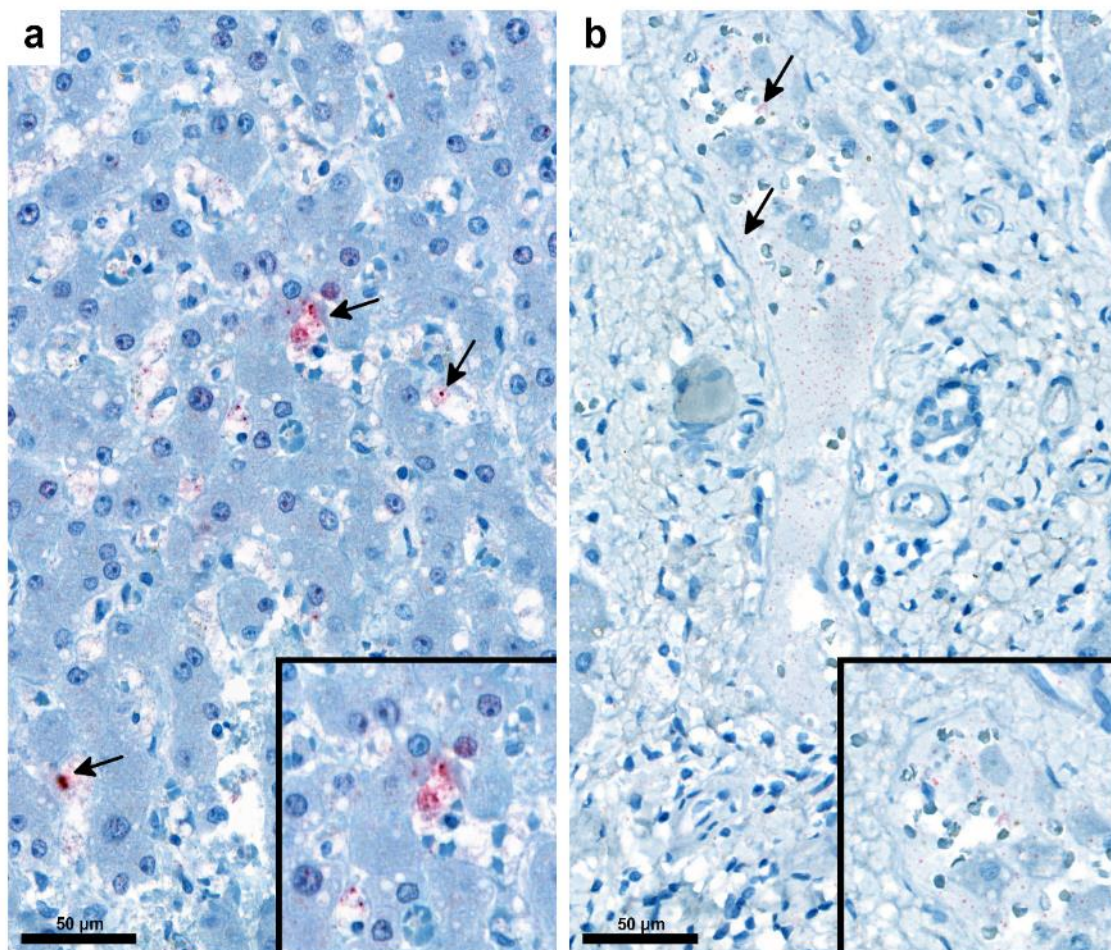


23. ábra Diffúzan megjelenő SARS-CoV-2 nukleokapszid fehérje immunhisztokémiai reakció pozitívitas DAB kromogénnel, placentában a syncytiotrophoblastokban (saját készítésű ábra).



24. ábra Diffúzan megjelenő SARS-CoV-2 tüskefehérje immuhisztokémiai reakció pozitívítás DAB kromogénnel, placentában a syncytiotrophoblastokban (saját készítésű ábra).

A továbbiakban kiemelten vizsgáltuk a SARS-CoV-2 proteinek expresszióját a **májszövetben**. Ehhez 20 olyan esetet választottunk, melyekben PMI < 2 nap volt. A NP 15 esetben volt detektálható, míg a tüskefehérje összesen 4 esetben (11. táblázat). A vírus proteinek egyenetlenül, fókálisan jelentek meg az endothelsejtekben, a Kupffer sejtekben és a portális makrofágokban (25. ábra). A hepatocytákban és a cholangiocytákban SARS-CoV-2 fehérjéket nem tudtunk detektálni.



25. ábra SARS-CoV-2 nukleokapszid fehérje (a, nyilak) és tüskefehérje (b, nyilak) pozitív immunhisztokémiai reakciója vaszkuláris és sinusoidealis terekben, endothelsejtekben és Kupffer sejtekben. A betétek nagyobb nagyítással (180×) ábrázolják a pozitív reakciót (27).

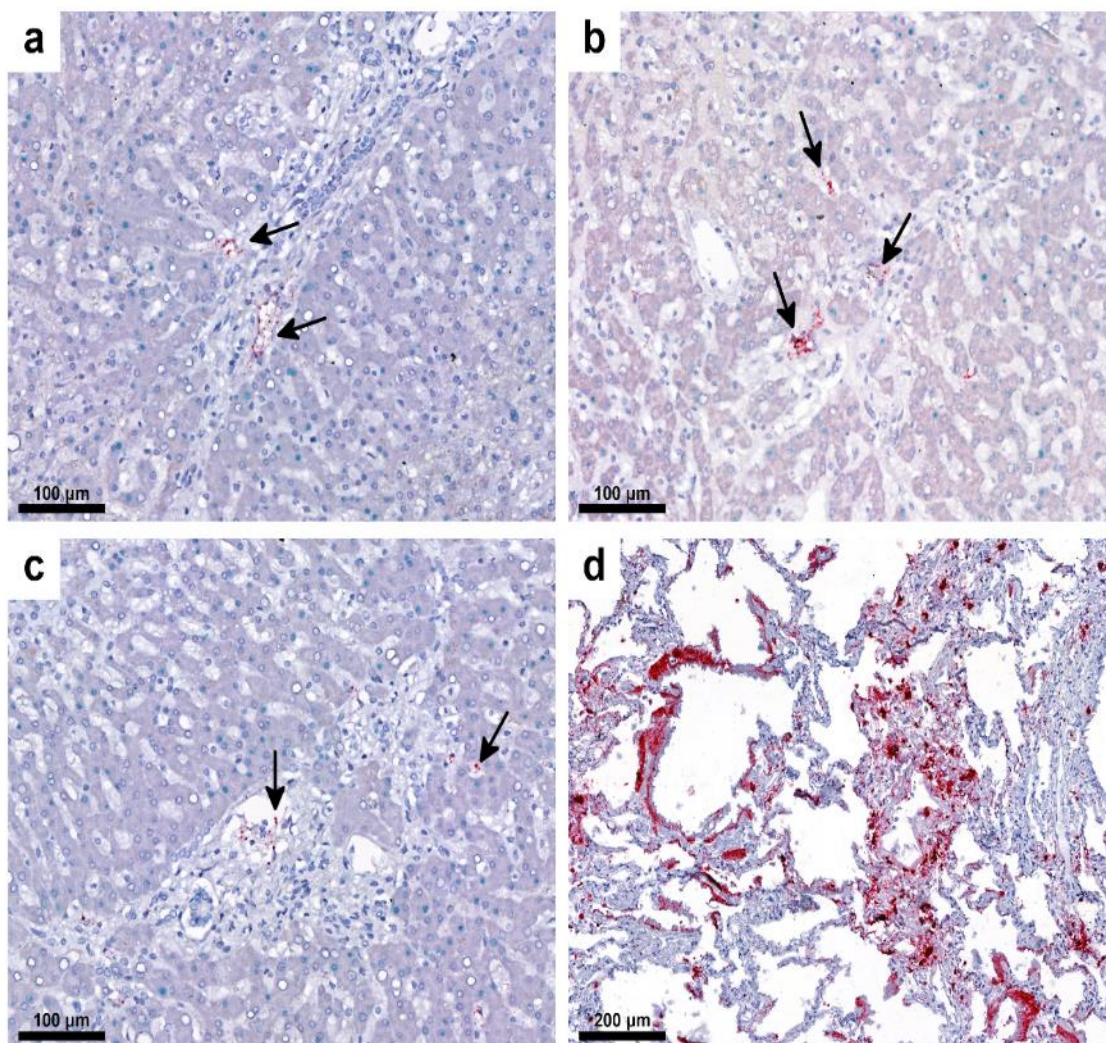
11. táblázat SARS-CoV-2 RNS kimutatása RT-PCR, ISH vizsgálatokkal, fehérjekimutatása IHC-val máj mintákban (27).

Minta száma	TÜDŐ RT-PCR	TÜDŐ NP IHC	TÜDŐ TŰSKE IHC	MÁJ RT-PCR	MÁJ NP IHC	MÁJ TŰSKE IHC	MÁJ ISH (RNAscope®)
#01	+	-	-	+	+	-	+
#02	+	+	+	+	+	-	-
#03	+	-	-	-	+	-	+
#04	+	+	+	+	+	+	+
#05	+	+	+	-	-	-	-
#06	+	-	-	+	+	-	+
#07	-	-	-	-	-	-	-
#08	+	+	+	+	+	-	+
#09	+	+	+	+	+	-	-
#10	+	+	+	+	+	+	-
#11	+	-	-	+	-	-	-
#12	+	-	-	-	+	-	-
#13	+	+	+	+	+	-	+
#14	+	-	-	-	-	-	-
#15	+	+	+	+	+	-	+
#16	+	+	+	+	+	+	-
#17	+	-	-	+	+	-	+
#18	-	-	-	+	+	-	+
#19	+	+	+	-	+	+	-
#20	+	+	-	-	-	-	-

RT-PCR=reverz transzkripció polimeráz-lánreakció, NP=nukleokapszid fehérje, IHC=immunhisztokémiai reakció, ISH=in situ hibridizáció

4.2.1.2 *In situ* hibridizáció

A fenti 20 májmintában az RT-PCR és IHC reakcióval párhuzamosan SARS-CoV-2 ISH végeztünk. Az alkalmazott RNAScope® technika a 20 esetből kilencben mutatott májpozitivitást (11. táblázat). A pozitív jel az IHC-hoz hasonlóan az endothel- és Kupffer sejtekben, valamint a portális makrofágokban jelentkezett (26. ábra). A vizsgálatokhoz itt is tüdő (26. ábra/d) és placenta mintákat használtunk pozitív kontrollként, igen intenzív reakciókat tapasztaltunk.



26. ábra SARS-CoV-2 kimutatása *in situ* hibridizációs reakcióval (RNAScope®). Vörös (pozitív) jel látható fertőzött májszövetben: az endothelsejtekben, Kupffer sejtekben, és portális makrofágokban (a, b, c, nyilak). Erős jel figyelhető meg fertőzött tüdőszövetbe (d), melyet pozitív kontrollként használtunk (27).

4.2.1.3 RT-PCR

A 20 kiválasztott, 2 napon belül végzett boncolások májeseiteihez tartozó tüdőminták közül az RT-PCR 18 esetben adott pozitív eredményt. A 18-ból 12 esetben a májmintákban is detektálható volt a SARS-CoV-2 RNS (11. táblázat). Azon két eset közül, ahol a tüdőmintában nem volt kimutatható a vírus RNS RT-PCR-al, egy esetben a májban sem, míg a másik esetben a májban igazolható volt a SARS-CoV-2 RNS jelenléte (11. táblázat).

4.2.2 SARS-CoV-2 vírus immunhisztokémiai kimutatására vonatkozó országos körvizsgálat

A négy vizsgálóhelyen (SE PIBOI, SZTE, DE, PTE) elvégzett IHC-k pozitivitását, intenzitását és a háttérét hasonlítottuk össze és értékeltük. A reakciókat kódolt, RT-PCR-rel ellenőrzött tüdő és placenta mintákon végeztük el. A RT-PCR eredményeket a vizsgálat vezetője ismerte, a mintaszett pozitív és negatív metszeteket is tartalmazott. A SARS-CoV-2 fertőzött tüdő és placenta mintákban minden esetben észlelhető volt a pozitív reakciót jelentő barna színreakció, míg a negatív kontrollokban nem. A vizsgálóhelyek bevont szakértői által elvégzett, szemikvantitatív kiértékelés összesített eredményeit az alábbi 12. táblázat. Összesített eredmény alatt az aktuális vizsgálóhelyen, adott hígítású antitesttel végzett reakcióra a vizsgálóhelyek által megítélt pontértékek összegét értjük. Ennek várt elméleti maximuma 48 (4 SARS-CoV-2 pozitív minta, maximálisan kapható 3-3 pontja, 4 vizsgálóhelytől). Értelemszerűen intenzitás tekintetében a 48-hoz minél közelebbi érték, míg háttér vonatkozásában a nullát közelítő pontösszegek a kívánatosak.

12. táblázat A vizsgált antitestekkel a jelölt hígításon, helyszínen végzett reakciók intenzitásra és háttérre vonatkozó összesített pontértékei (26).

Antitest kódja	Hígítás	Vizsgáló hely kódja	Intenzitás összeg	Háttér összeg
NP 1	1:1000	A	46	7
NP 1	1:1000	B	48	8
NP 1	1:1000	C	46	11
NP 1	1:1000	D	48	8
NP 2	1:100	B	31	10
SPIKE 1	1:200	A	44	0
SPIKE 1	1:500	B	44	0
SPIKE 1	1:250	C	47	7
SPIKE 1	1:500	C	43	4
SPIKE 1	1:500	D	39	0
SPIKE 2	1:500	B	23	11
SPIKE 3	1:2000	B	31	22

Statisztikailag elmondható, hogy intenzitásra vonatkozóan a pontozást végző szakértők valódi egyezést mutattak: Fleiss-féle k κ =0,62. A háttéresség megítélésének tekintetében némileg nagyobb eltérés volt kimutatható az értékelők között: Fleiss-féle k κ =0,45 ez mérsékelt egyezést jelent.

Az adatok áttekintésével megállapítható, hogy a B vizsgálóhely által kipróbált NP 2, SPIKE 2 és SPIKE 3 kódokkal rendelkező ellenanyagok alacsonyabb intenzitású és háttérsebb reakciókat eredményeznek, mint az NP 1 és SPIKE 1 antitestek. Statisztikailag pontos értékeket a Cohen-féle k κ ra vonatkozóan a következő 13. táblázat szerepeltet. Az adott antitestre vonatkozó összes intenzitás és háttér érték figyelembevételre került.

13. táblázat Antitestek kapott értékeinek összevetése Cohen-féle k κ segítségével

Összevetett antitest pár	Cohen-féle k κ
NP 1 – NP 2	0,47
SPIKE 1 – SPIKE 2	0,47
SPIKE 1 – SPIKE 3	0,46

Hígítások vonatkozásában a NP fehérje ellenes primer antitest esetén az NP 1 jelű, Sino által gyártott termék 1:1000 arányú hígításban megfelelő intenzitású, minimális háttérű reakciót adott a pozitív mintákban. A túskefehérje ellenes primer antitest tekintetében az egyes hígítások között nem mutatkozott sem gyakorlatban sem pedig statisztikailag (1:200 – 1:500 hígítások esetén Cohen-féle $\kappa=0,69$; 1:250 – 1:500 hígításoknál Cohen-féle $\kappa=0,74$) kimutatható érdemi eltérés. Elmondható, hogy a CST cég által gyártott SPIKE 1 kóddal jelölt antitest 1:500 arányú hígításban megfelelően használható.

A reakcióintenzitások aspektusában statisztikai szempontból a vizsgálóhelyek között, az eltérő laboratóriumi körülmények ellenére sem volt észlelhető különbség. Ezt a Friedman-teszt által adott érték: szignifikancia=0,75 igazolja, mely bőségesen meghaladja a 0,05-ös határt, mely a különbséget hivatott jelezni.

5. Megbeszélés

A COVID-19-ben elhunytak vizsgálata során világviszonylatban is jelentős kohorszt gyűjtöttünk a megbetegedés patológiájára, a halál bekövetkeztében szereplő tényezők szerepének feltárására, a haláloki láncolat analízisére vonatkozóan. A tanulmány első részében a 2020. márciusa és 2020. decembere között, az első és második hullámban boncolt 100 elhunyt adatait analizáltuk klinikopatológiai szempontból (9). A munkánk második szakaszában tovább bővítettük a vizsgálatok számát, a harmadik és negyedik COVID-19 hullámban elhunytakkal (150 beteg) (27).

A hisztológiai analízis során törekedtünk az észlelt elváltozások objektív elemzésére, az eredményekkel kapcsolatos konszenzus létrehozására, a vizsgálók értékelése közötti eltérések csökkentésére („interobserver variabilitás”). Ennek egyik módja az elkészült HE festett metszetek digitalizálása volt, az értékelést a szerv patológiájában speciálisan képzett patológus szakemberek team-munkában végezték. A szemikvantitatív eredmények előre meghatározott pontérték szerint kerültek meghatározásra az online megadott vizsgálólapokon, melyeket statisztikailag elemeztünk. Mindez új megközelítést jelentett az addig közlésre került boncolási adatokra vonatkozóan, melyek csak kis számú, többnyire több centrumból származó anyagok összefoglalását ismertették (7, 8, 10, 12, 48-55).

Vizsgálatainkban a boncolt populáció átlagéletkora hasonló volt az irodalomban közöltekhez (8, 12, 56), az első 100 esetben 74,73 év (50 férfi, 50 nő) (9), a második, 150 elhunytat felölelő tanulmányban 69,1 év volt (nő: 46%) (27). A legtöbb elhunyt a 71 – 80 év közötti korcsoportból került ki mindkét vizsgálat során, mely hasonló volt a nemzetközi adatokhoz (8, 12, 54, 56). Az alábbi **14. táblázat**ban látható az általunk publikált adatsorok, valamint a nemzetközi irodalomban fellelt közlemények esetszámainak, demográfiájának összehasonlítása.

14. táblázat Az általunk publikált adatsorok összehasonlítása nemzetközi tanulmányokkal.

első szerző (referencia)	Danics (9)	Pesti (27)	Carsana (8)	Lax (12)	Schaller (54)	Bradley (56)
vizsgált elhunytak száma	100	150	38	11	10	14
férfi	50	81	33	8	7	6
nő	50	69	5	3	3	8
átlagéletkor, év	74,7	69,6	69	81,5	n.a.	n.a.
medián életkor, év	77	71,5	n.a.	80,5	79	73,5
életkor minimum – maximum, év	40 – 103	26 – 103	32 – 86	75 – 91	64 – 90	42 – 84

n.a.=nincs adat

A komorbiditások is hasonlóan mutatkoztak saját tanulmányainkban, az irodalmi adatokhoz viszonyítva (hipertenzió, kardiovaszkuláris megbetegedés, diabetes, COPD, malignus daganatok stb.) (9, 12, 13, 27, 56). Mindezek alapján azt a véleményt fogalmaztuk meg, hogy a COVID-19-asszociált elváltozások elsősorban a COVID-19 megbetegedéssel összefüggően kialakuló eltérések, nem valamilyen „hazai sajátosságot”, jellegzetességet tükröznek (9).

Az analizált biomarkerek, laboratórium eltérések között mindkét tanulmányban a CRP, D-dimer, IL-6, LDH stb. emelkedés volt jelen a megbetegedettek és elhunytak 60%-nál, míg a limfopénia 74%-ában. A szérum enzim aktivitások közül az ALT, AST, GGT ugyancsak emelkedettnek bizonyult, hasonlóan mások eredményeihez (9, 27, 34, 35, 57-59). A diszthemosztázis jeleként a protrombin idő megnyúlása, alacsony trombocita szám, magas fibrinogén, von Willebrand faktor számos esetben jelen volt, más szerzők tanulmányában észleltekhöz hasonlóan (60).

Az észlelt szervi elváltozások közül a **tüdőben** tapasztaltak bizonyultak a leg súlyosabbnak mind a makroszkópos, mind a mikroszkópos vizsgálatok során, ahogy azt más tanulmányokban is bemutatták (8, 10, 12, 14, 49, 50, 53, 61-63). A legjellegzetesebbnek a DAD, a mikro- és makrotrombusok jelenléte, többmagvú órássejtek megjelenése bizonyult. A tüdő hisztológiai súlyossági pontjai (0-3, Totál pulmonális hiszto-score –TP) kifejezik a tüdőben észlelt elváltozások súlyosságát, így a fibrin mikrotrombusok, a hyalin membrán, DAD különböző fázisait stb. A TP-t

összevetve a három halálóki kategóriával (1. később) szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők. A SARS-CoV-2 NP és tüskeprotein egyértelműen kimutatható volt a tüdő pneumocytákban, a levált intraalveolaris sejtekben, mint azt magunk és mások IHC módszerekkel kimutattuk (9, 13, 56, 64, 65). IHC vizsgálataink során felhívtuk a figyelmet arra, hogy a virális antigének eloszlása a tüdőn belül, gyakran metszetenként is erősen eltérő, fókális megjelenésű, ami esetlegesen a mintavétel során értékelési eltérést okozhat.

Egyéb szervek közül a **szív** ugyancsak súlyos eltéréseket mutatott, mint azt a patológus kollegák vizsgálata szemikvantitatívan is kimutatta. A súlyos, tágult üregrendszerű szívben jellegzetes ún. „wavy fibers” (hullámos rostok) kiterjedten jelentek meg, változó mértékű intersticiális fibrózissal és a koszorús erek szklerotikus elváltozásával. Az utóbbiak valószínűleg nem hozhatók közvetlenül kapcsolatba a COVID-19 okozta eltérésekkel, elsősorban a hajlamosító tényezők közé sorolhatók. A rostelváltozások mellett a helyenként random megjelenő foltos, kis kiterjedésű myocardiális elváltozások viszont akut eltérésként értékelhetők, mely mikrocirkulációs zavarként interpretálható a kardiopatológus kollegák véleménye alapján (9). Fibrin mikrotrombusokat ritkábban észleltünk az anyagunkban (8%), mint az más szerzők leírásában szerepel (66, 67). Ugyancsak ritkán volt detektálható myocarditis (3%), más szerzők észleléséhez viszonyítva (16, 20, 68, 69).

A **vese** vizsgálata során elsősorban olyan eltéréseket észleltünk, melyek nem tekinthetők közvetlenül összefüggésben lévőknek a COVID-19 hatásával, krónikus, elsősorban az életkorral összefüggő eltérések mutatkoztak (9). Egyes szerzők enyhe tubuláris károsodást, és szegmentális glomeruloszklerózist írtak le (70).

Az első 100 elhunyt anyagának elemzése alapján a **májban** legjellegzetesebbnek, az anyagok 60%-t meghaladó arányában jelen lévő makro- és mikrovezikularis szteatózis, valamint pangás mutatkozott, mely összecseng korábban közölt tanulmányok eredményeivel (56, 71, 72). Emellett szétszórt, kis kiterjedésben nekrotikus/apoptotikus sejtek is mutatkoztak, mely elváltozásokat más szerzők szintén leírtak (63, 73, 74), változó mértékű laboratóriumi eltérésekkel társulva. Gyulladás ritkán és enyhe mértékben volt megfigyelhető, akut hepatitis jeleit nem észleltük. Magunk, ezen első szakaszban észlelt májelváltozásokat a COVID-19 megbetegedés másodlagos tényezőiként értékeltük, nem közvetlen vírus citopatogén hatásként. Ezen feltételezésünk

megerősítésére végeztünk a későbbiekben IHC és molekuláris biológiai módszerekkel részletes vizsgálatokat.

A fenti részletes patológiai szemikvantitatív értékelés alapján, klinikopatológiai megbeszélés során igyekeztünk a **halál egyértelmű okának** a megállapítására, illetve annak eldöntésére, hogy a **SARS-CoV-2 fertőzés milyen mértékben** volt felelős a beteg haláláért. A vírusfertőzés szempontjából három haláloki kategóriát különítettünk el, az elsőben egyértelműen a SARS-CoV-2-vel való fertőzés volt felelős a halál bekövetkezésért, a kapcsolat a vírus és a COVID-19 között **„erős”** volt (1. kategória). A másodikban a SARS-CoV-2 fertőzés mellett egyéb faktorok, így komorbiditások megközelítőleg hasonló arányban szerepeltek a halál okozásában (**„kiegészítő”**, 2. kategória). Végül a harmadik csoportban a SARS-CoV-2 fertőzés nem játszott lényeges szerepet a halál bekövetkezésében (**„gyenge”** összefüggés). Más szerzők Hamburgból 4 kategóriát különítettek el (*„definitive, probable, possible, not associated”*) (10).

A részletes klinikopatológiai elemzésünk során az első 100 elhunyt halálókában 57%-ban „erős” összefüggést állapítottunk meg, míg 27%-ban „kiegészítő” kategóriába soroltuk az elhunytakat, összesen tehát 84%-ban volt megállapítható a SARS-CoV-2 erős, vagy kiegészítő szerepe a halálokban. Az első és második hullámban elhunytak haláloki kategóriáit külön elemezve viszont, az első hullámban a „kiegészítő” kategória nagyobb arányban szerepelt (48%), mint a „gyenge” (28%) és az „erős” (24%). A második hullámban viszont az „erős” kategória fordult elő nagyobb arányban (66%), melyet a „kiegészítő” (21%) és a „gyenge” (13%) követett. Ezen értékeket összevetve a hamburgi szerzők által közölt adatokkal, melyek az első hullám elejéről származnak, egy szűkebb intervallumból, elmondható, hogy esetünkben többségben voltak a mi terminológiánk szerinti „erős” kategóriába sorolt elhunytak (10). A második vizsgálatban, a 150 elhunyt haláloki kategóriáiban az „erős” kategóriát 52,67%-ban, a „kiegészítőt” 31,33%-ban, a „gyenge” összefüggést 16% -ban találtuk. Ugyancsak megállapítottuk, hogy a második hullámban a kórházi ápolás (a kórházban töltött idő hossza) jelentősen rövidebb volt, mint az elsőben. Mindez azzal is magyarázható, hogy az összefüggés a második hullámban a SARS-CoV-2 fertőzéssel erősebb volt, melynek kezelésére kevesebb terápiás lehetőség állt rendelkezésre, mint a „kiegészítő” kategóriába került, komorbiditással küzdő betegek esetében. Ezt a feltételezést támogatja, hogy a „Totál

pulmonáris hiszto-score” (TP) súlyosabb volt az „erős” halálloki kategóriában, mint a „kiegészítőben” ($p < 0.0001$).

A korábbiakban utaltunk arra, hogy a legsúlyosabb eltérések COVID-19 során a tüdőben található, azonban változó mértékben egyéb szervek is érintettek lehetnek (22, 71, 75-80). Nyitott kérdés, hogy ezen szervekben létrejött elváltozások a vírus közvetlen citopatogén hatásának, vagy másodlagosan, a tüdőben kialakult fertőzés következményének, így a citokinek felszabadulásának, hipoxiának, gyógyszeres kezelés stb. következményének tekinthetők-e (9, 71, 72, 80-82).

Magunk a **májszövet** vizsgálata során kerestünk arra választ, hogy a vírus replikáció közvetlenül történik-e a májszövetben, milyen sejtekben és milyen eltéréseket létrehozva, mint ezt más szerzők is felvetették (27, 77, 83).

A májszövet vizsgálatához olyan 20 esetet választottunk, amelyek boncolására 2 napon belül került sor, a lehető legmegfelelőbb szöveti megőrzöttség érdekében. Más szerzőkhöz hasonlóan mind a NP, mind virális RNS kimutatható volt a májban, bár kis mennyiségben és egyenlőtlen eloszlásban (27, 72, 77, 79, 82, 84, 85). IHC és ISH vizsgálatokkal azonban sem a NP, sem a tüskefehérje, sem virális genomális RNS nem volt kimutatható a máj parenchyma sejtjeiben, így sem a hepatocytákban, sem a cholangiocytákban, míg azok demonstrálhatók voltak az endothelsejtekben és Kupffer sejtekben, valamint a portális/peroportális makrofágokban. A szerzők egy része sem igazolta a SARS-CoV-2 fehérjék jelenlétét a hepatocytákban (76), sőt egyéb májsejtekben sem tudták kimutatni (86, 87). Egyesek szerint ennek magyarázata lehet, hogy a SARS-CoV-2 replikációja alacsony szintű, betegről betegre, valamint a betegség lefolyása során és a kezelés hatására is változik az extrapulmonális szervekben (85).

A 20 kiválasztott, a halált követő 48 órán belül elvégzett boncolások májeseiteihez tartozó tüdőminták közül az RT-PCR 18 esetben adott pozitív eredményt, melyből 12 esetben a májmintákban is detektálható volt a SARS-CoV-2 RNS. A detektálás arányában a két szerv között észlelt különbség több tényezővel magyarázható. Részben a vírus korábban már említett fokális eloszlásával, de nagyobb valószínűséggel a tüdőben és a májban észlelhető eltérő mértékű vírus replikáció szintjével is összefügghet. Feltehetően az alacsonyabb szintű vírus replikáció a májban egyenetlenebb eloszlású vírus megjelenést eredményez, mely mind az IHC, mind az ISH módszerével kimutatási hiányhoz vezethet, mint erre a SARS-CoV-2 májban való replikációja során rámutattak.

Másrészről viszont, vizsgálatainkban az RT-PCR végzése során a FFPE mintákból több metszet lehúzása történt az RNS izoláláshoz, növelve a pozitívnak vélelmezhető mintafragmentumok mennyiségét, csökkentve ezzel a kimutathatóság esetleges technikai limitjét. Egyesek negatív eredményei, mely szerint nem sikerült virális komponens kimutatni a májban, részben az alkalmazott metodológiát illető eltérésekkel is magyarázható lenne (19, 56, 87). Hangsúlyozni kell azonban, hogy a SARS-CoV-2 genomális RNS kimutatása nem feltétlenül értékelhető a vírusreplikáció jeleként. Az ISH-val kimutatható virális RNS lehet ugyan a vírusreplikáció jele, de a rezidens makrofágokban fagocitált vírus RNS komponens is (88).

A SARS-CoV-2 protein és RNS komponensei – változó eloszlásban – kimutathatók voltak vizsgálatainkban az endothelsejtekben. Ismeretes, hogy az endothelsejtek rendelkeznek az ismert SARS-CoV-2 sejthez való kapcsolódás, illetve belépési receptorokkal, így mind az ACE2, mind a TEMPRESS2 receptorokkal, bár ezek eloszlása, mennyisége szervenként, sejtenként változó (89). A számos szerv endothelsejtjeiben kimutatott SARS-CoV-2 arra utal, hogy a vírus ezen sejtekben replikálódik, mely egyes szerzők szerint felveti, hogy a vírus citopatogén hatást fejt ki (79, 85). Az adatok nem igazolják jelenleg azonban azt, hogy a vírus belépése az endothelsejtekbe receptor-mediált, vagy fagocitózis útján történik-e. Az endothelsejtekben észlelhető kifejezett sejtkárosodás, melyet magunk is egyértelműen kimutattunk, lehet másodlagos tényező, így a citokinvihar, hypoxia, keringési zavar, gyógyszerhatás stb. következménye is. Egyes szerzők azonban nem detektáltak virális komponens az endothelsejtekben (90, 91). Az elektronmikroszkóposan bemutatott „vírus-szerű részecskék” morfológiája erősen kétséges, mellyel magunk is egyetértünk (92-95). Egyes *in vitro* adatok arra utalnak, hogy az emberi endothelsejtek fertőzhetők SARS-CoV-2-vel, azonban replikációt nem észleltek, és a vírus 72 órát követően jelentősebb sejtkárosodás nélkül eltűnt (96). Eltérés észlelhető a SARS-CoV-2 replikációt vizsgáló *in vitro* és *in vivo* modellek között is, kiemelten a parenchymasejtek tekintetében. A vírus detektálható volt máj organoidban (97), Huh7 sejtvonalban (98), azonban jelenleg is vitatott kérdés, hogy a vírus a hepatocytákban replikálódik-e (82, 98).

A májban észlelt eltérések, kiemelten az endothelsejt károsodás, akár primer citopatogén, akár másodlagos tényező következménye, arra hívja fel a figyelmet, hogy a tüdőn kívüli szervek, jelen esetben a máj, későbbi károsodásával is számolni kell a

betegséget sikeresen túlélő beteg esetén. Ennek alapján a súlyosabb COVID-19 fertőzésen átesett és „gyógyult”, vírus negatívvá vált egyének esetében is követni célszerű a betegeket és időszakosan ellenőrizni. Ez különösen indokolt, amennyiben a betegség lefolyása során a májfunkció eltéréseire utaló laboratóriumi és klinikai eltérések mutatkoztak.

6. Következtetések, új eredmények

A bemutatott 100, később 150 SARS-CoV-2 vírus fertőzött elhunyt egyén boncolási eredményeinek elemzése világviszonylatban is **jelentős esetszám** alapján vont le klinikopatológiai következtetéseket és tárt fel haláloki láncolatokat, az elváltozások szemikvantitatív elemzése alapján.

A vizsgált populáció **demográfia**ilag megfelelt a nemzetközileg vizsgált csoportoknak, mind kor, nem, komorbiditás tekintetében stb., így az észlelt patológiai eltérések más kohorszokra is nagy valószínűséggel kiterjeszthetők.

1. A klinikopatológiai elemzések alapján **három haláloki kategóriát** különítettünk el, mely a SARS-CoV-2-vel való összefüggés alapján csoportosította az eseteket. Ennek alapján az esetek a halálok szempontjából a vírussal való **„erős”, „kiegészítő”,** vagy **„gyenge”** kategóriába voltak sorolhatók.
2. Rámutattunk, hogy a pandémia egyes hullámaiban a haláloki kategóriák **arányában lényeges különbségek** mutatkoztak, az első hullámban a „kiegészítő”, míg a második hullámban az „erős” összefüggés aránya dominált. Összességében az „erős” összefüggés bizonyult a legnagyobb arányúnak.
3. A tüdőben észlelt elváltozások digitalizált, szemikvantitatív elemzése alapján az ú.n. **„Totál pulmonális hiszto-score”** (TP) értéket vezettük be, mely szorosan összefüggött a haláloki kategóriákkal. Az „erős” összefüggésű haláloki kategóriákban a TP érték szignifikánsan nagyobb volt, mint a kiegészítő és gyenge csoportban ($p < 0,0001$).
4. A tüdő hisztológiai elemzése mellett, részletesen vizsgáltunk számos extrapulmonális szervet, kiemelten a **májszövetet**. Megállapítottuk, hogy a leggyakoribb elváltozás, a változó mértékű szteatózis és a pangás volt, a fibrózis mértéke alacsonyabbnak bizonyult, a nekrozis/apoptózis nem volt jelentős és hepatitis nem fordult elő.
5. A viszonylag enyhébb parenchyma elváltozásokkal szemben viszont jelentős **sinusoidealis ektáziát, endothelsejtek károsodást és fibrin akkumulációt** észleltünk. Ennek szemikvantitatív mértékét az ú.n. **SEF-score**-ral fejeztük ki, mely nem mutatott összefüggést a haláloki kategóriákkal.

6. SARS-CoV-2 proteinek kimutatására megfelelő, IHC célra szolgáló antitestek kiválasztására, a magyarországi eljárások egységesítése céljából szervezett **hazai körvizsgálaton** – a négy orvosi egyetem részvételével – kiválasztottuk a legmegfelelőbbben használható és ajánlható primer antitesteket. Ez alapján megállapítottuk, hogy az **IHC** minősége és értékelése **nem függött a vizsgálóhelytől**.
7. A SARS-CoV-2 NP és tüskefehérjéket IHC, a virális RNS-t RT-PCR és ISH módszerekkel mutattuk ki a **máj különböző sejtjeiben**, ugyanazon betegektől származó **tüdőszövetel összehasonlítva**. Igazoltuk, hogy a SARS-CoV-2 NP és tüskefehérjei, valamint a virális RNS a fertőzött májban kimutathatók, az endothel, a Kupffer sejtekben és a makrofágokban. A vírus a parenchyma sejtekben (hepatocytá, cholangiocytá) nem volt detektálható.
8. A májban észlelt eltérések, kiemelten az **endothelsejt károsodás** (akár primer citopatogén, akár másodlagos tényezők következménye), arra hívja fel a figyelmet, hogy a tüdön kívüli szervek, így a máj, későbbi károsodásával is számolni kell a betegséget sikeresen túlélő betegeknél. Ennek alapján a súlyosabb COVID-19 fertőzésen átesett és „gyógyult”, vírus negatívvá vált egyének esetében **is indokolt a betegek követése**, időszakos ellenőrzése.

7. Összefoglalás

Az Egészségügyi Világszervezet által 2019. december 31-én bejelentett újfajta koronavírus, a SARS-CoV-2 okozta COVID-19 pandémia 2020. márciusára elérte hazánkat is, még ebben a hónapban elhunytak a betegség első áldozatai. A Semmelweis Egyetem Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézete Magyarországon elsőként kezdte meg a SARS-CoV-2 fertőzött elhunytak kórboncolását. Munkánk első szakaszában 100, majd további 50 elhunyt részletes kórboncolási eredményeit elemeztük. A májelhváltozások analízisére 20 olyan esetet választottunk, akiken a kórboncolás a halál idejétől számított 2 napon belül megtörtént. A kórboncolások során, egységes protokoll alapján történtek a szöveti mintavételek. A mintákon a rutin szövettani festéseken túl, immunhisztokémiai, *in situ* hibridizációs és RT-PCR reakciókat is végeztünk a vírus kimutatására, valamint a fertőzés hatásainak elemzésére. A hazai vizsgálóhelyek SARS-CoV-2 kimutatással kapcsolatos eljárásainak egységesítése érdekében országos körvizsgálatot szerveztünk. A kórboncolások makroszkópos megfigyelései, az elhunytak demográfiai adatai, klinikai anamnézise, valamint a mikroszkópos szövettani képe alapján az intézeti munkacsoport közösen határozta meg, hogy a SARS-CoV-2 fertőzés mennyiben felelős a halál bekövetkezéséért, azaz a vírusfertőzés a halálokkal „erős”, „kiegészítő” vagy „gyenge” összefüggésben áll-e. Ezen kategorizálás segítségével megállapítottuk, hogy az első hullámban a „kiegészítő”, míg a második hullámban az „erős”, valamint összességében is az „erős” összefüggés dominált. A munkacsoport megalkotta az ú.n. „Totál pulmonális hisztó-score” (TP) értéket, mely összefüggésben állt a haláloki kategóriákkal. Az extrapulmonális szervek közül a kiemelten tanulmányozott májszövetben nekrozis, apoptózis, hepatitis ritkán, míg szteatózis és pangás gyakran volt észlelhető. Súlyos, kiterjedt, nem-parenchymális sejtkárosodások voltak kimutathatók, így sinusoidealis ektázia (S), endothelsejtek károsodása (E) és fibrin akkumuláció (F) (SEF-score). A SARS-CoV-2 proteinek és RNS-t az endothelsejtekben, Kupffer sejtekben és makrofágokban detektáltuk, a parenchymasejtekben nem tudtuk kimutatni. A májban észlelt eltérések, kiemelten az endothelsejt károsodás, arra hívja fel a figyelmet, hogy a tüdőn kívüli szervek, így a máj, későbbi károsodásával is számolni kell a fertőzést sikeresen túlélő betegekben. Ennek alapján a súlyosabb COVID-19-en átesett egyének esetében is indokolt a betegek követése, időszakos ellenőrzése.

8. Summary

The COVID-19 pandemic caused by the new type of coronavirus, SARS-CoV-2, announced by the World Health Organization on 31st of December 2019 reached our country by March 2020, with the first victims of the disease dying this month. The Department of Pathology, Forensic and Insurance Medicine at Semmelweis University was the first in Hungary to start pathological autopsies of SARS-CoV-2-infected patients. In the first phase of our work, we analysed the detailed pathology results of 100 and the next phase 50 more deceased patients. For the analysis of liver lesions, we selected 20 cases who underwent autopsy within 2 days of death. Tissue samples were taken during the autopsies according to uniform protocol. In addition to routine histopathological staining, the samples were subjected to immunohistochemical, *in situ* hybridization and RT-PCR reactions to detect the virus and to analyse the effects of infection. A nationwide study was organised to standardise the SARS-CoV-2 detection procedures of Hungarian testing sites. Based on macroscopic observations of autopsies, demographic data, clinical history and microscopic histology of the deceased, the institutional working group determined to what extent the SARS-CoV-2 infection was responsible for death. In other words, whether the viral infection had "strong", "contributive" or "weak" association with death. This categorisation allowed us to conclude that, in the first wave the "contributive" one, while in the second wave the "strong" and overall, the "strong" association predominated. Our working group created the "Total Pulmonary Histo-score" (TP), which was correlated with the mortality categories. Necrosis, apoptosis and hepatitis were rarely observed in liver, as extrapulmonary organ, whereas steatosis and congestion were frequently found. Severe, extensive, non-parenchymal cellular damage was detected, such as sinusoidal ectasia (S), endothelial cell damage (E) and fibrin accumulation (F) and liver specific score was created (SEF-score). SARS-CoV-2 proteins and RNA were detected in endothelial cells, Kupffer cells and macrophages, but not in parenchymal cells. The abnormalities detected in the liver, especially the endothelial cell damage, raise the possibility of subsequent damage in extrapulmonary organs in those patients, who survived SARS-CoV-2 infection. On this basis, follow-up and periodic monitoring of patients with more severe COVID-19 is also warranted.

9. Irodalomjegyzék

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 382: 727-733.
2. Cucinotta D, Vanelli M. (2020) WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed*, 91: 157-160.
3. Merkely B, Szabo AJ, Kosztin A, Berenyi E, Sebestyén A, Lengyel C, Merkely G, Karady J, Varkonyi I, Papp C, Miseta A, Betlehem J, Burian K, Csoka I, Vasarhelyi B, Ludwig E, Prinz G, Sinkó J, Hánkó B, Varga P, Fulop GA, Mag K, Vokó Z. (2020) Novel coronavirus epidemic in the Hungarian population, a cross-sectional nationwide survey to support the exit policy in Hungary. *Geroscience*, 42: 1063-1074.
4. Wang H, Paulson KR, Pease SA, Watson S, Comfort H, Zheng P, Aravkin AY, Bisignano C, Barber RM, Alam T, Fuller JE, May EA, Jones DP, Frisch ME, Abbafati C, Adolph C, Allorant A, Amlag JO, Bang-Jensen B, Bertolacci GJ, Bloom SS, Carter A, Castro E, Chakrabarti S, Chattopadhyay J, Cogen RM, Collins JK, Cooperrider K, Dai X, Dangel WJ, Daoud F, Dapper C, Deen A, Duncan BB, Erickson M, Ewald SB, Fedosseeva T, Ferrari AJ, Frostad JJ, Fullman N, Gallagher J, Gamkrelidze A, Guo G, He J, Helak M, Henry NJ, Hulland EN, Huntley BM, Kereselidze M, Lazzar-Atwood A, Legrand KE, Lindstrom A, Linebarger E, Lotufo PA, Lozano R, Magistro B, Malta DC, Månsson J, Mantilla Herrera AM, Marinho F, Mirkuzie AH, Misganaw AT, Monasta L, Naik P, Nomura S, O'Brien EG, O'Halloran JK, Olana LT, Ostroff SM, Penberthy L, Reiner Jr RC, Reinke G, Ribeiro ALP, Santomauro DF, Schmidt MI, Shaw DH, Sheena BS, Sholokhov A, Skhvitaridze N, Sorensen RJD, Spurlock EE, Syailendrawati R, Topor-Madry R, Troeger CE, Walcott R, Walker A, Wiysonge CS, Worku NA, Zigler B, Pigott DM, Naghavi M, Mokdad AH, Lim SS, Hay SI, Gakidou E, Murray CJL. (2022) Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020–21. *The Lancet*, 399: 1513-1536.

5. Kenessey I, Abonyi-Tóth Z, Bogos K, Kerpel-Fronius A, Kiss Z, Moldvay J, Roxin G, Surján O, Wéber A, Wittmann I, Surján G, Kásler M. (2022) A koronavírusal összefüggő halálozás vizsgálata Magyarországon és a Visegrádi Együttműködés országában 2020-2021-ben. *Magy Belorv Arch*, 75: 5-13.
6. Kiss Z, Wittmann I, Polivka L, Surjan G, Surjan O, Barcza Z, Molnar GA, Nagy D, Muller V, Bogos K, Nagy P, Kenessey I, Weber A, Palosi M, Szlavik J, Schaff Z, Szekanez Z, Muller C, Kasler M, Voko Z. (2022) Nationwide Effectiveness of First and Second SARS-CoV2 Booster Vaccines During the Delta and Omicron Pandemic Waves in Hungary (HUN-VE 2 Study). *Front Immunol*, 13: 905585.
7. Bryce C, Grimes Z, Pujadas E, Ahuja S, Beasley MB, Albrecht R, Hernandez T, Stock A, Zhao Z, AlRasheed MR, Chen J, Li L, Wang D, Corben A, Haines GK, 3rd, Westra WH, Umphlett M, Gordon RE, Reidy J, Petersen B, Salem F, Fiel MI, El Jamal SM, Tsankova NM, Houldsworth J, Mussa Z, Veremis B, Sordillo E, Gitman MR, Nowak M, Brody R, Harpaz N, Merad M, Gnjjatic S, Liu WC, Schotsaert M, Miorin L, Aydilto Gomez TA, Ramos-Lopez I, Garcia-Sastre A, Donnelly R, Seigler P, Keys C, Cameron J, Moultrie I, Washington KL, Treatman J, Sebra R, Jhang J, Firpo A, Lednicky J, Paniz-Mondolfi A, Cordon-Cardo C, Fowkes ME. (2021) Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. *Mod Pathol*, 34: 1456–1467.
8. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, Rech R, Colombo R, Antinori S, Corbellino M, Galli M, Catena E, Tosoni A, Gianatti A, Nebuloni M. (2020) Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: A two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 20: 1135-1140.
9. Danics K, Pesti A, Toro K, Kiss-Dala N, Szlavik J, Lakatos B, Radnai A, Balazs T, Bacskai M, Dobi D, Varkonyi T, Glasz T, Lotz G, Kiss A, Schaff Z, Valyi-Nagy I. (2021) A COVID-19-association-dependent categorization of death causes in 100 autopsy cases. *Geroscience*, 43: 2265-2287.
10. Edler C, Schroder AS, Aepfelbacher M, Fitzek A, Heinemann A, Heinrich F, Klein A, Langenwalder F, Lutgehetmann M, Meissner K, Puschel K, Schadler J, Steurer S, Mushumba H, Sperhake JP. (2020) Dying with SARS-CoV-2 infection-an

- autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med*, 134: 1275-1284.
11. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS. (2020) Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*, 382: 1708-1720.
 12. Lax SF, Skok K, Zechner P, Kessler HH, Kaufmann N, Koelblinger C, Vander K, Bargfrieder U, Trauner M. (2020) Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome: Results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series. *Ann Intern Med*, 173: 350-361.
 13. Schaff Z, Danics K, Pesti A, Lotz G, Várkonyi T, Dobi D, Vályi-Nagy I, Törő K, Glasz T, Kiss A. (2021) A COVID–19 patológiája: Halálok SARS-CoV-2-fertőzésben: vírusfertőzésben vagy vírusfertőzéssel? *Scientia et Securitas*, 2: 94-99.
 14. Szekely L, Bozoky B, Bendek M, Ostad M, Lavignasse P, Haag L, Wu J, Jing X, Gupta S, Saccon E, Sonnerborg A, Cao Y, Bjornstedt M, Szakos A. (2021) Pulmonary stromal expansion and intra-alveolar coagulation are primary causes of COVID-19 death. *Heliyon*, 7: e07134.
 15. Zombori T, Kuthi L, Hortobagyi T, Csorgo E, Argyelan J, Kocsis L, Sejben I, Kaizer L, Radics B, Sejben A, Pancsa T, Nyari GR, Barath B, Cserni G, Ivanyi B, Tiszlavicz L. (2021) "Dum spiro spero": a SARS-CoV-2-fertőzés klinikopatológiája 26 eset kapcsán. *Orv Hetil*, 162: 1791-1802.
 16. Bearnse M, Hung YP, Krauson AJ, Bonanno L, Boyraz B, Harris CK, Helland TL, Hilburn CF, Hutchison B, Jobbagy S, Marshall MS, Shepherd DJ, Villalba JA, Delfino I, Mendez-Pena J, Chebib I, Newton-Cheh C, Stone JR. (2021) Factors associated with myocardial SARS-CoV-2 infection, myocarditis, and cardiac inflammation in patients with COVID-19. *Mod Pathol*, 34: 1345-1357.
 17. Benedetti C, Waldman M, Zaza G, Riella LV, Cravedi P. (2020) COVID-19 and the Kidneys: An Update. *Front Med (Lausanne)*, 7: 423.

18. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, Singh KP, Chaicumpa W, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ. (2020) Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clin Microbiol Rev*, 33: e00028.
19. Fassan M, Mescoli C, Sbaraglia M, Guzzardo V, Russo FP, Fabris R, Trevenzoli M, Pelizzaro F, Cattelan AM, Basso C, Navalesi P, Farinati F, Vettor R, Dei Tos AP. (2021) Liver histopathology in COVID-19 patients: A mono-Institutional series of liver biopsies and autopsy specimens. *Pathol Res Pract*, 221: 153451.
20. Kawakami R, Sakamoto A, Kawai K, Gianatti A, Pellegrini D, Nasr A, Kutys B, Guo L, Cornelissen A, Mori M, Sato Y, Pescetelli I, Brivio M, Romero M, Guagliumi G, Virmani R, Finn AV. (2021) Pathological Evidence for SARS-CoV-2 as a Cause of Myocarditis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*, 77: 314-325.
21. Lopes-Pacheco M, Silva PL, Cruz FF, Battaglini D, Robba C, Pelosi P, Morales MM, Caruso Neves C, Rocco PRM. (2021) Pathogenesis of Multiple Organ Injury in COVID-19 and Potential Therapeutic Strategies. *Front Physiol*, 12.
22. Marjot T, Webb GJ, Barritt ASt, Moon AM, Stamataki Z, Wong VW, Barnes E. (2021) COVID-19 and liver disease: mechanistic and clinical perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18: 348-364.
23. Hussman JP. (2021) Severe Clinical Worsening in COVID-19 and Potential Mechanisms of Immune-Enhanced Disease. *Front Med (Lausanne)*, 8: 637642.
24. Idalsoaga F, Ayares G, Arab JP, Diaz LA. (2021) COVID-19 and Indirect Liver Injury: A Narrative Synthesis of the Evidence. *J Clin Transl Hepatol*, 9: 760-768.
25. Satturwar S, Fowkes M, Farver C, Wilson AM, Eccher A, Girolami I, Pujadas E, Bryce C, Salem F, El Jamal SM, Paniz-Mondolfi A, Petersen B, Gordon RE, Reidy J, Frassetta F, Marshall DA, Pantanowitz L. (2021) Postmortem Findings Associated With SARS-CoV-2: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Surg Pathol*, 45: 587-603.
26. Pesti A, Gyömörei C, Juhász P, Kálmán E, Kiss A, Kuthi L, Lotz G, Méhes G, Schaff Z, Tiszlavicz L. (2022) SARS-CoV-2-fehérjék kimutatása immunhisztokémiai módszerrel emberi szövetekben. *Orv Hetil*, 163: 975-983.
27. Pesti A, Danics K, Glasz T, Varkonyi T, Barbai T, Reszegi A, Kovalszky I, Valyi-Nagy I, Dobi D, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. (2023) Liver alterations and detection of

- SARS-CoV-2 RNA and proteins in COVID-19 autopsies. *Geroscience*, 45: 1015-1031.
28. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19: 155-170.
 29. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia Ja, Yu T, Zhang X, Zhang L. (2020) Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395: 507-513.
 30. Kiss B, Kis Z, Palyi B, Kellermayer MSZ. (2021) Topography, Spike Dynamics, and Nanomechanics of Individual Native SARS-CoV-2 Virions. *Nano Lett*, 21: 2675-2680.
 31. Bourouiba L. (2020) Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA*, 323: 1837-1838.
 32. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. (2020) Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, 371: m3862.
 33. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, Tan KS, Wang DY, Yan Y. (2020) The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res*, 7: 11.
 34. Hao SR, Zhang SY, Lian JS, Jin X, Ye CY, Cai H, Zhang XL, Hu JH, Zheng L, Zhang YM, Jia HY, Yu GD, Wang XY, Gu JQ, Lu YF, Yu XP, Yu L, Xiang DR, Ye CY, Jin CL, Qiu YQ, Li LJ, Sheng JF, Liang TB, Yang YD. (2020) Liver enzyme elevation in coronavirus disease 2019: A multicenter, retrospective, cross-sectional study. *Am J Gastroenterol*, 115: 1075-1083.
 35. Kulkarni AV, Kumar P, Tevethia HV, Premkumar M, Arab JP, Candia R, Talukdar R, Sharma M, Qi X, Rao PN, Reddy DN. (2020) Systematic review with meta-analysis: liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Aliment Pharmacol Ther*, 52: 584-599.
 36. Lamers MM, Haagmans BL. (2022) SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 20: 270-284.

37. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. (2007) A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol*, 81: 20-29.
38. Mahajan M, Chatterjee D, Bhuvanewari K, Pillay S, Bhattacharjya S. (2018) NMR structure and localization of a large fragment of the SARS-CoV fusion protein: Implications in viral cell fusion. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860: 407-415.
39. Graham RL, Baric RS. (2010) Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol*, 84: 3134-3146.
40. Fehr AR, Perlman S. (2015) Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1282: 1-23.
41. Zóka A, Tresó B, Bekő G. (2021) A SARS-CoV-2-járvány kihívásai és tapasztalatai a molekuláris diagnosztikában. *Orv Hetil*, 162: 2071-2078.
42. Lean FZX, Lamers MM, Smith SP, Shipley R, Schipper D, Temperton N, Haagmans BL, Banyard AC, Bewley KR, Carroll MW, Brookes SM, Brown I, Nunez A. (2020) Development of immunohistochemistry and in situ hybridisation for the detection of SARS-CoV and SARS-CoV-2 in formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Sci Rep*, 10: 21894.
43. Sun Y, Ge L, Udhane SS, Langenheim JF, Rau MJ, Patton MD, Gallan AJ, Felix JC, Rui H. (2021) Sensitive and Specific Immunohistochemistry Protocol for Nucleocapsid Protein from All Common SARS-CoV-2 Virus Strains in Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Tissues. *Methods Protoc*, 4.
44. Liu J, Babka AM, Kearney BJ, Radoshitzky SR, Kuhn JH, Zeng X. (2020) Molecular detection of SARS-CoV-2 in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. *JCI Insight*, 5.
45. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. (2012) RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 14: 22-29.
46. Wang Z, Portier BP, Gruver AM, Bui S, Wang H, Su N, Vo HT, Ma XJ, Luo Y, Budd GT, Tubbs RR. (2013) Automated quantitative RNA in situ hybridization for resolution of equivocal and heterogeneous ERBB2 (HER2) status in invasive breast carcinoma. *J Mol Diagn*, 15: 210-219.
47. Brahim Belhaouari D, Fontanini A, Baudoin JP, Haddad G, Le Bideau M, Bou Khalil JY, Raoult D, La Scola B. (2020) The Strengths of Scanning Electron

- Microscopy in Deciphering SARS-CoV-2 Infectious Cycle. *Front Microbiol*, 11: 2014.
48. Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, Ghosh S, Mukhopadhyay S. (2020) COVID-19 autopsies, Oklahoma, USA. *Am J Clin Pathol*, 153: 725-733.
 49. Basso C, Calabrese F, Sbaraglia M, Del Vecchio C, Carretta G, Saieva A, Donato D, Flor L, Crisanti A, Dei Tos AP. (2020) Feasibility of postmortem examination in the era of COVID-19 pandemic: the experience of a northeast Italy university hospital. *Virchows Arch*, 477: 341-347.
 50. Borczuk AC, Salvatore SP, Seshan SV, Patel SS, Bussel JB, Mostyka M, Elsoukkary S, He B, Del Vecchio C, Fortarezza F, Pezzuto F, Navalesi P, Crisanti A, Fowkes ME, Bryce CH, Calabrese F, Beasley MB. (2020) COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. *Mod Pathol*, 33: 2156-2168.
 51. Hooper JE, Padera RF, Dolhnikoff M, da Silva LFF, Duarte-Neto AN, Kapp ME, Lacy JM, Mauad T, Nascimento Saldiva PH, Rapkiewicz AV, Wolf DA, Felix JC, Benson P, de Almeida Monteiro RA, Shanes E, Gawelek KL, Marshall DA, McDonald MM, Muller W, Priemer DS, Solomon IH, Zak T, Bhattacharjee MB, Fu L, Gilbert AR, Harper HL, Litovsky S, Lomasney J, Mount SL, Reilly S, Sekulic M, Steffensen TS, Threlkeld KJ, Zhao B, Williamson AK. (2021) A postmortem portrait of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A large multiinstitutional autopsy survey study. *Arch Pathol Lab Med*, 145: 529-535.
 52. Jiang T, Lv B, Liu H, He S, Zhang G, Li C, Li W, Li W, He Y, Zhang T, Wang Y, Mo W, Yi N, Peng L, Li Y, Ruan C, Li C, Liu Y, Luo P, Jiang H, Xue Z, Liu L, Wang W. (2021) Autopsy and statistical evidence of disturbed hemostasis progress in COVID-19: medical records from 407 patients. *Thromb J*, 19: 8.
 53. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Hopfer H, Deigendesch N, Frank S, Turek D, Willi N, Pargger H, Bassetti S, Leuppi JD, Cathomas G, Tolnay M, Mertz KD, Tzankov A. (2020) Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology*, 77: 198-209.

54. Schaller T, Hirschbuhl K, Burkhardt K, Braun G, Trepel M, Markl B, Claus R. (2020) Postmortem examination of patients with COVID-19. *JAMA*, 323: 2518-2520.
55. Vasquez-Bonilla WO, Orozco R, Argueta V, Sierra M, Zambrano LI, Munoz-Lara F, Lopez-Molina DS, Arteaga-Livias K, Grimes Z, Bryce C, Paniz-Mondolfi A, Rodriguez-Morales AJ. (2020) A review of the main histopathological findings in coronavirus disease 2019. *Hum Pathol*, 105: 74-83.
56. Bradley BT, Maioli H, Johnston R, Chaudhry I, Fink SL, Xu H, Najafian B, Deutsch G, Lacy JM, Williams T, Yarid N, Marshall DA. (2020) Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington state: a case series. *Lancet*, 396: 320-332.
57. Fu Y, Zhu R, Bai T, Han P, He Q, Jing M, Xiong X, Zhao X, Quan R, Chen C, Zhang Y, Tao M, Yi J, Tian D, Yan W. (2021) Clinical features of patients infected with coronavirus disease 2019 with elevated liver biochemistries: A multicenter, retrospective study. *Hepatology*, 73: 1509-1520.
58. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, Bikdeli B, Ahluwalia N, Ausiello JC, Wan EY, Freedberg DE, Kirtane AJ, Parikh SA, Maurer MS, Nordvig AS, Accili D, Bathon JM, Mohan S, Bauer KA, Leon MB, Krumholz HM, Uriel N, Mehra MR, Elkind MSV, Stone GW, Schwartz A, Ho DD, Bilezikian JP, Landry DW. (2020) Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*, 26: 1017-1032.
59. Yip TC, Lui GC, Wong VW, Chow VC, Ho TH, Li TC, Tse YK, Hui DS, Chan HL, Wong GL. (2021) Liver injury is independently associated with adverse clinical outcomes in patients with COVID-19. *Gut*, 70: 733-742.
60. D'Ardes D, Boccacorda A, Cocco G, Fabiani S, Rossi I, Bucci M, Guagnano MT, Schiavone C, Cipollone F. (2022) Impaired coagulation, liver dysfunction and COVID-19: Discovering an intriguing relationship. *World J Gastroenterol*, 28: 1102-1112.
61. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, Hofman P, Kern I, Panizo A, von der Thusen J, Timofeev S, Gorkiewicz G, Lunardi F. (2020) Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*, 477: 359-372.

62. Dorward DA, Russell CD, Um IH, Elshani M, Armstrong SD, Penrice-Randal R, Millar T, Lerpiniere CEB, Tagliavini G, Hartley CS, Randle NP, Gachanja NN, Potey PMD, Dong X, Anderson AM, Campbell VL, Duguid AJ, Al Qsous W, BouHaidar R, Baillie JK, Dhaliwal K, Wallace WA, Bellamy COC, Prost S, Smith C, Hiscox JA, Harrison DJ, Lucas CD. (2021) Tissue-specific immunopathology in fatal COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med*, 203: 192-201.
63. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, Tai Y, Bai C, Gao T, Song J, Xia P, Dong J, Zhao J, Wang FS. (2020) Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*, 8: 420-422.
64. Sessa F, Bertozzi G, Cipolloni L, Baldari B, Cantatore S, D'Errico S, Di Mizio G, Asmundo A, Castorina S, Salerno M, Pomara C. (2020) Clinical-forensic autopsy findings to defeat COVID-19 disease: A literature review. *J Clin Med*, 9: 2026.
65. Lotz G, Danics K, Pesti A, Várkonyi T, Dobi D, Vályi-Nagy I, Törő K, Glasz T, Kiss A, Schaff Z. (2021) A COVID-19-betegség okozta szervi károsodások patológiája. *Klinikai Onkológia*, 8: 211-218.
66. Duarte-Neto AN, Monteiro RAA, da Silva LFF, Malheiros D, de Oliveira EP, Theodoro-Filho J, Pinho JRR, Gomes-Gouvea MS, Salles APM, de Oliveira IRS, Mauad T, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. (2020) Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology*, 77: 186-197.
67. Nadkarni GN, Lala A, Bagiella E, Chang HL, Moreno PR, Pujadas E, Arvind V, Bose S, Charney AW, Chen MD, Cordon-Cardo C, Dunn AS, Farkouh ME, Glicksberg BS, Kia A, Kohli-Seth R, Levin MA, Timsina P, Zhao S, Fayad ZA, Fuster V. (2020) Anticoagulation, Bleeding, Mortality, and Pathology in Hospitalized Patients With COVID-19. *J Am Coll Cardiol*, 76: 1815-1826.
68. Buja LM, Wolf DA, Zhao B, Akkanti B, McDonald M, Lelenwa L, Reilly N, Ottaviani G, Elghetany MT, Trujillo DO, Aisenberg GM, Madjid M, Kar B. (2020) The emerging spectrum of cardiopulmonary pathology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19): Report of 3 autopsies from Houston, Texas, and review of autopsy findings from other United States cities. *Cardiovasc Pathol*, 48: 107233.

69. Wichmann D, Sperhake JP, Lutgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, Heinrich F, Mushumba H, Kniep I, Schroder AS, Burdelski C, de Heer G, Nierhaus A, Frings D, Pfefferle S, Becker H, Bredereke-Wiedling H, de Weerth A, Paschen HR, Sheikhzadeh-Eggers S, Stang A, Schmiedel S, Bokemeyer C, Addo MM, Aepfelbacher M, Puschel K, Kluge S. (2020) Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med*, 173: 268-277.
70. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, Yi F, Yang HC, Fogo AB, Nie X, Zhang C. (2020) Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*, 98: 219-227.
71. Diaz LA, Idalsoaga F, Cannistra M, Candia R, Cabrera D, Barrera F, Soza A, Graham R, Riquelme A, Arrese M, Leise MD, Arab JP. (2020) High prevalence of hepatic steatosis and vascular thrombosis in COVID-19: A systematic review and meta-analysis of autopsy data. *World J Gastroenterol*, 26: 7693-7706.
72. Lagana SM, Kudose S, Iuga AC, Lee MJ, Fazlollahi L, Remotti HE, Del Portillo A, De Michele S, de Gonzalez AK, Saqi A, Khairallah P, Chong AM, Park H, Uhlemann AC, Lefkowitz JH, Verna EC. (2020) Hepatic pathology in patients dying of COVID-19: a series of 40 cases including clinical, histologic, and virologic data. *Mod Pathol*, 33: 2147-2155.
73. Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, Xiao SY. (2020) Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol*, 33: 1007-1014.
74. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, Mehra MR, Schuepbach RA, Ruschitzka F, Moch H. (2020) Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*, 395: 1417-1418.
75. Moreira JLS, Barbosa SMB, Vieira JG, Chaves NCB, Goncalves Junior J. (2022) Liver histopathological changes and COVID-19: What does literature have to tell us? *Dig Liver Dis*, 54: 296-298.
76. Santana MF, Guerra MT, Hundt MA, Ciarleglio MM, Pinto RAA, Dutra BG, Xavier MS, Lacerda MVG, Ferreira AJ, Wanderley DC, Borges do Nascimento IJ, Araujo RFA, Pinheiro SVB, Araujo SA, Leite MF, Ferreira LCL, Nathanson MH, Vieira Teixeira Vidigal P. (2022) Correlation Between Clinical and Pathological Findings

- of Liver Injury in 27 Patients With Lethal COVID-19 Infections in Brazil. *Hepatol Commun*, 6: 270-280.
77. Saviano A, Wrensch F, Ghany MG, Baumert TF. (2021) Liver disease and coronavirus disease 2019: From pathogenesis to clinical care. *Hepatology*, 74: 1088-1100.
 78. Torge D, Bernardi S, Arcangeli M, Bianchi S. (2022) Histopathological Features of SARS-CoV-2 in Extrapulmonary Organ Infection: A Systematic Review of Literature. *Pathogens*, 11.
 79. Van Cleemput J, van Snippenberg W, Lambrechts L, Dendooven A, D'Onofrio V, Couck L, Trypsteen W, Vanrusselt J, Theuns S, Vereecke N, van den Bosch TPP, Lammens M, Driessen A, Achten R, Bracke KR, Van den Broeck W, Von der Thusen J, Nauwynck H, Van Dorpe J, Gerlo S, Maes P, Cox J, Vandekerckhove L. (2021) Organ-specific genome diversity of replication-competent SARS-CoV-2. *Nat Commun*, 12: 6612.
 80. Zhao M, Wang M, Zhang J, Ye J, Xu Y, Wang Z, Ye D, Liu J, Wan J. (2020) Advances in the relationship between coronavirus infection and cardiovascular diseases. *Biomed Pharmacother*, 127: 110230.
 81. Caramaschi S, Kapp ME, Miller SE, Eisenberg R, Johnson J, Epperly G, Maiorana A, Silvestri G, Giannico GA. (2021) Histopathological findings and clinicopathologic correlation in COVID-19: a systematic review. *Mod Pathol*, 34: 1614-1633.
 82. Wang Y, Liu S, Liu H, Li W, Lin F, Jiang L, Li X, Xu P, Zhang L, Zhao L, Cao Y, Kang J, Yang J, Li L, Liu X, Li Y, Nie R, Mu J, Lu F, Zhao S, Lu J, Zhao J. (2020) SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol*, 73: 807-816.
 83. Sonzogni A, Previtali G, Seghezzi M, Alessio MG, Gianatti A, Licini L, Morotti D, Zerbi P, Carsana L, Rossi R, Lauri E, Pellegrinelli A, Nebuloni M. (2020) Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations. *Liver International*, 40: 2110-2116.
 84. Puelles VG, Lutgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, Chilla S, Heinemann A, Wanner N, Liu S, Braun F, Lu S, Pfefferle S, Schroder AS, Edler C, Gross O, Glatzel M, Wichmann D, Wiech T, Kluge S, Pueschel K,

- Aepfelbacher M, Huber TB. (2020) Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*, 383: 590-592.
85. Stein SR, Ramelli SC, Grazioli A, Chung J-Y, Singh M, Yinda CK, Winkler CW, Sun J, Dickey JM, Ylaya K, Ko SH, Platt AP, Burbelo PD, Quezado M, Pittaluga S, Purcell M, Munster VJ, Belinky F, Ramos-Benitez MJ, Boritz EA, Lach IA, Herr DL, Rabin J, Saharia KK, Madathil RJ, Tabatabai A, Soherwardi S, McCurdy MT, Babyak AL, Perez Valencia LJ, Curran SJ, Richert ME, Young WJ, Young SP, Gasmi B, Sampaio De Melo M, Desai S, Tadros S, Nasir N, Jin X, Rajan S, Dikoglu E, Ozkaya N, Smith G, Emanuel ER, Kelsall BL, Olivera JA, Blawas M, Star RA, Hays N, Singireddy S, Wu J, Raja K, Curto R, Chung JE, Borth AJ, Bowers KA, Weichold AM, Minor PA, Moshref MAN, Kelly EE, Sajadi MM, Scalea TM, Tran D, Dahi S, Deatrick KB, Krause EM, Herrold JA, Hochberg ES, Cornachione CR, Levine AR, Richards JE, Elder J, Burke AP, Mazzeffi MA, Christenson RH, Chancer ZA, Abdulmahdi M, Sopha S, Goldberg T, Sangwan Y, Sudano K, Blume D, Radin B, Arnouk M, Eagan JW, Palermo R, Harris AD, Pohida T, Garmendia-Cedillos M, Dold G, Saglio E, Pham P, Peterson KE, Cohen JI, de Wit E, Vannella KM, Hewitt SM, Kleiner DE, Chertow DS, Consortium NC-A. (2022) SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy. *Nature*, 612: 758-763.
86. Bussani R, Schneider E, Zentilin L, Collesi C, Ali H, Braga L, Volpe MC, Colliva A, Zanconati F, Berlot G, Silvestri F, Zacchigna S, Giacca M. (2020) Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBioMedicine*, 61: 103104.
87. Massoth LR, Desai N, Szabolcs A, Harris CK, Neyaz A, Crotty R, Chebib I, Rivera MN, Sholl LM, Stone JR, Ting DT, Deshpande V. (2021) Comparison of RNA in situ hybridization and immunohistochemistry techniques for the detection and localization of SARS-CoV-2 in human tissues. *Am J Surg Pathol*, 45: 14-24.
88. Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. (2020) SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun*, 11: 6059.

89. Bernard I, Limonta D, Mahal LK, Hobman TC. (2020) Endothelium infection and dysregulation by SARS-CoV-2: evidence and caveats in COVID-19. *Viruses*, 13: 29.
90. Hui KPY, Cheung MC, Perera R, Ng KC, Bui CHT, Ho JCW, Ng MMT, Kuok DIT, Shih KC, Tsao SW, Poon LLM, Peiris M, Nicholls JM, Chan MCW. (2020) Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir Med*, 8: 687-695.
91. Schaefer IM, Padera RF, Solomon IH, Kanjilal S, Hammer MM, Hornick JL, Sholl LM. (2020) In situ detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19. *Mod Pathol*, 33: 2104-2114.
92. Calomeni E, Satoskar A, Ayoub I, Brodsky S, Rovin BH, Nadasdy T. (2020) Multivesicular bodies mimicking SARS-CoV-2 in patients without COVID-19. *Kidney Int*, 98: 233-234.
93. Dittmayer C, Meinhardt J, Radbruch H, Radke J, Heppner BI, Heppner FL, Stenzel W, Holland G, Laue M. (2020) Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral. *Lancet*, 396: e64-e65.
94. Miller SE, Brealey JK. (2020) Visualization of putative coronavirus in kidney. *Kidney Int*, 98: 231-232.
95. Roufosse C, Curtis E, Moran L, Hollinshead M, Cook T, Hanley B, Horsfield C, Neil D. (2020) Electron microscopic investigations in COVID-19: not all crowns are coronas. *Kidney Int*, 98: 505-506.
96. Urata R, Ikeda K, Yamazaki E, Ueno D, Katayama A, Shin-Ya M, Ohgitani E, Mazda O, Matoba S. (2022) Senescent endothelial cells are predisposed to SARS-CoV-2 infection and subsequent endothelial dysfunction. *Sci Rep*, 12: 11855.
97. Yang L, Han Y, Nilsson-Payant BE, Gupta V, Wang P, Duan X, Tang X, Zhu J, Zhao Z, Jaffre F, Zhang T, Kim TW, Harschnitz O, Redmond D, Houghton S, Liu C, Naji A, Ciceri G, Guttikonda S, Bram Y, Nguyen DT, Cioffi M, Chandar V, Hoagland DA, Huang Y, Xiang J, Wang H, Lyden D, Borczuk A, Chen HJ, Studer L, Pan FC, Ho DD, tenOever BR, Evans T, Schwartz RE, Chen S. (2020) A human pluripotent stem cell-based platform to study SARS-CoV-2 tropism and model virus infection in human cells and organoids. *Cell Stem Cell*, 27: 125-136 e127.

98. Chu H, Chan JF, Yuen TT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, Hu B, Yip CC, Tsang JO, Huang X, Chai Y, Yang D, Hou Y, Chik KK, Zhang X, Fung AY, Tsoi HW, Cai JP, Chan WM, Ip JD, Chu AW, Zhou J, Lung DC, Kok KH, To KK, Tsang OT, Chan KH, Yuen KY. (2020) Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*, 1: e14-e23.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

1. Danics K, **Pesti A**, Törő K, Kiss-Dala N, Szlávik J, Lakatos B, Radnai A, Balázs T, Bacskai M, Dobi D, Várkonyi T, Glasz T, Lotz G, Kiss A, Schaff Z, Vályi-Nagy I. A COVID-19-association-dependent categorization of death causes in 100 autopsy cases. *Geroscience*. 2021;43(5):2265-87.
IF: 7,581 (2021)
2. Lotz G, Danics K, **Pesti A**, Várkonyi T, Dobi D, Vályi-Nagy I, Törő K, Glasz T, Kiss A, Schaff Z. A COVID-19-betegség okozta szervi károsodások patológiája. *Klinikai Onkológia*. 2021;8(7):211-8.
IF: -
3. Schaff Z, Danics K, **Pesti A**, Lotz G, Várkonyi T, Dobi D, Vályi-Nagy I, Törő K, Glasz T, Kiss A. A COVID–19 patológiája.: Halálok SARS-CoV-2-fertőzésben: vírusfertőzésben vagy vírusfertőzéssel? *Scientia et Securitas*. 2021;2(1):94-9.
IF: -
4. **Pesti A**, Gyömörei C, Juhász P, Kálmán E, Kiss A, Kuthi L, Lotz G, Méhes G, Schaff Z, Tiszlavicz L. SARS-CoV-2-fehérjék kimutatása immunhisztokémiai módszerrel emberi szövetekben. *Orvosi Hetilap*. 2022;163(25):975-83.
IF: 0,707(2021)
5. **Pesti A**, Danics K, Glasz T, Várkonyi T, Barbai T, Reszegi A, Kovalszky I, Vályi-Nagy I, Dobi D, Lotz G, Schaff Z, Kiss A. Liver alterations and detection of SARS-CoV-2 RNA and proteins in COVID-19 autopsies. *Geroscience*. 2023;45(2):1015-31.
IF: 7,581 (2021)

Összesített IF (10.1): 15,869

10.2 Disszertációtól független saját közlemények

6. Lendvai G, Szekerczés T, Gyöngyösi B, Schlachter K, Kontsek E, **Pesti A**, Patonai A, Werling K, Kovalszky I, Schaff Z, Kiss A. MicroRNA Expression in Focal

Nodular Hyperplasia in Comparison with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. Pathology and Oncology Research. 2019;25(7):1103-9.

IF: 2,826 (2019)

7. Kontsek E, **Pesti A**, Bjornstedt M, Üveges T, Szabó E, Garay T, Gordon P, Gergely S, Kiss A. Mid-Infrared Imaging Is Able to Characterize and Separate Cancer Cell Lines. Pathology and Oncology Research. 2020;26(4):2401-7.

IF: 3,201 (2020)

8. Kontsek E, **Pesti A**, Slezsák J, Gordon P, Tornóczki T, Smuk G, Gergely S, Kiss A. Mid-Infrared Imaging Characterization to Differentiate Lung Cancer Subtypes. Pathology and Oncology Research. 2022;28:1610439.

IF: 2,874 (2021)

9. Pataki AB, Olár A, Ribli D, **Pesti A**, Kontsek E, Gyöngyösi B, Bilecz A, Kovács T, Kovács KA, Kramer Z, Kiss A, Szócska M, Pollner P, Csabai I. HunCRC: annotated pathological slides to enhance deep learning applications in colorectal cancer screening. Scientific Data. 2022;9(1):370.

IF: 8,501 (2021)

10. Szeitz B, Pipek O, Kulka J, Szundi C, Rusz O, Tőkés T, Szász AM, Kovács KA, **Pesti A**, Ben Arie TB, Gángó A, Fülöp Z, Drágus E, Vári-Kakas SA, Tőkés AM. Investigating the Prognostic Relevance of Tumor Immune Microenvironment and Immune Gene Assembly in Breast Carcinoma Subtypes. Cancers. 2022;14(8):1942.

IF: 6,575 (2021)

11. Kádár R, Maros K, Drégelyi Z, Szedenik Á, Lukácsi A, **Pesti A**, Besenyei M, Egri B. Incidence of compulsive behavior (stereotypies/abnormal repetitive behaviors) in populations of sport and race horses in Hungary. Journal of Veterinary Behavior. 2023;61:37-49.

IF: 2,172 (2021)

Összesített IF (10.2): 26,149

Teljes összesített IF (10.1+10.2): 42,018

11. Köszönetnyilvánítás

Zárásképpen szeretném köszönetemet, hálámat és tiszteletemet kifejezni mindazok számára, akik nélkül nem készülhetett volna el az értekezésem.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Kiss András** témavezetőmnek, aki először TDK hallgatóként vett engem a szárnyai alá, majd szakmai gyakorlatra invitált az Intézetbe, végül pedig végig kísérte doktorandusz éveimet, folyamatosan biztosította a kutatásaimhoz szükséges tudományos, szakmai és infrastrukturális háttérrel.

Leírhatatlan hálával és őszinte csodálattal adózom **Prof. Dr. Schaff Zsuzsa** akadémikus asszonynak, mindannyiunk Professzor Asszonyának. A tiszta gondolatai, pontos iránymutatása, kimeríthetetlen tudása és mindennapos segítsége nélkül ez a mű nem készült volna el.

Köszönettel tartozom **Dr. Danics Krisztinának**, aki kezdetektől vállalta a COVID-19 elhunytak kórboncolását, kitartó munkájával a kutatáshoz szükséges mintáink dandárját biztosította. Itt szeretném kifejezni hálámat munkájukért, tanácsaikért, segítségükért a COVID-19 Munkacsoportunk további tagjainak: **Dr. Barbai Tamásnak**, **Dr. Dobi Dejánnak**, **Dr. Glasz Tibornak**, **Prof. Dr. Kovalszky Ilonának**, **Dr. Lotz Gábornak**, **Dr. Reszegi Andreának**, **Prof. Dr. Vályi-Nagy Istvánnak**, **Dr. Várkonyi Tibornak**. Hálásan köszönöm **asszisztenseinknek**, hogy sokszor estébe nyúlóan készítették a kutatásainkhoz szükséges mintákat, különösképpen köszönet illeti **Hegyesi Nikolettet**, **Kaminszky Zsuzsannát**, **Kovács Erzsébetet**, **Dr. Sklánitzné Samodai Erikát**, **Szabó Irént**.

Köszönöm **Dr. Kenessey Istvánnak** a statisztikai kérdésekben nyújtott tanácsait, valamint értekezésem házi bírálatát.

Hálával tartozom **Kontsek Endre** kollégámnak, barátomnak, hogy a Műegyetemi kezdetektől számíthatok segítségére, javaslataira. Valamint köszönöm neki a sok közös projektet, kutatást, amit már magunk mögött tudhatunk, és ami még előttünk áll.

Hálás vagyok a Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet munkatársainak, hogy befogadtak közösségükbe, segítenek a jövő nemzedékeinek képzésében és új tudományos felfedezések létrejöttében.

Örök hálával tartozom szüleimnek **Pestiné Heincz Andreának** és **Pesti Zoltánnak**, hogy mindig mellettem állnak, megteremtették tanulmányaim feltételeit és segítenek

életem során mindenben. Köszönöm testvéremnek **Pesti Johannának**, hogy mindig számíthatok rá, segít, amiben csak tud. Hálás vagyok feleségemnek **Dr. Féderer Krisztinának**, hogy mindenben támogat, a nehéz pillanatokban mosolyt csal arcomra s végig kísér utamon. Köszönöm **Dr. Kiss Bálint** barátomnak, hogy tanácsaira, gondolataira bármikor számíthatok, úgy szakmai-tudományos, mint magánéleti kérdésekben.