

Príspevok imunohistochemie k histomorfologickej diagnostike COVID-19 pneumónie

Lucia Krivošíková, Samuel Horák, Kristína Mikuš-Kuracinová, Pavol Janega, Michal Palkovič, Pavel Babál

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

V priebehu pandémie COVID-19 vznikla potreba rýchlo a spoľahlivo objasniť patogenézu ochorenia. Nenahraditeľnú úlohu v tomto procese majú pitevné nálezy. Dostupné práce sa vzhľadom na klinickú manifestáciu zameriavajú hlavne na zmeny na pľúcach, menej v iných orgánoch. Najčastejším nálezom sú rôzne štádiá difúzneho alveolárneho poškodenia, reaktívne i reparatívne zmeny a nezvyčajne frekventované nálezy spojené s poruchou koagulácie. Morfologické zmeny sú, ako pri mnohých iných vírusových pneumóniách, nedostatočne špecifické. Na potvrdenie pôvodcu zmien je potrebné použiť špeciálne metódy. V rutinej praxi je najdostupnejšou metódou imunohistochemia. V prípade ochorenia COVID-19 jej využitie limituje najmä dĺžka trvania ochorenia, výkon pitvy viac ako 30 hodín po smrti a dostupnosť protilátok s dostatočne vysokou špecificitou a senzitivitou.

Kľúčové slová: COVID-19, vírusová pneumónia, pitva, imunohistochemia

Contribution of immunohistochemistry to histomorphological diagnostics of COVID-19 pneumonia

During the COVID-19 pandemic, a need to quickly and reliably elucidate the pathogenesis of the disease emerged. Autopsy findings play an irreplaceable role in this process. Considering the clinical manifestation, current articles focus mainly on changes in the lungs, less in the other organs. The most common findings include various stages of diffuse alveolar damage, reactive and reparatory changes, and unusually frequent findings associated with coagulation impairment. As in many other types of viral pneumonia, the morphological changes are not specific enough. Special methods must be used to confirm the pathogen. Immunohistochemistry is the most available method in routine practice. In COVID-19, its use is limited particularly by the duration of the disease, the time over 30 hours from death to the autopsy, and the availability of antibodies with sufficient specificity and sensitivity.

Keywords: COVID-19, viral pneumonia, autopsy, immunohistochemistry

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 12 – 16

Úvod

Ochorenie COVID-19 sa začalo šíriť koncom roka 2019 z čínskeho mesta Wu-chan v provincii Chu-pej. Ku koncu marca 2021 bolo celosvetovo zaznamenaných viac ako 132 miliónov potvrdených prípadov nákazy, pričom na ochorenie COVID-19 zomreli viac ako 3 milióny ľudí⁽¹⁾. Prejavy ochorenia varujú od asymptomatických prípadov cez pacientov s typickými chrípkovými príznakmi až po vážne prípady zápalu pľúc, neraz s tragickým koncom. Priebeh ochorenia nemožno spoľahlivo predvídať, ale medzi fatálnymi prípadmi dominujú pacienti s vyšším vekom, mužského pohlavia a s komorbiditami ako arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus, obezita, chronické ochorenie pľúc, srdca a iných orgánov, nádorové ochorenie a klinicky významná imunodeficiencia⁽²⁾.

Pre správny terapeutický prístup pri vážnych prípadoch je nevyhnutné poznať patogenézu ochorenia. Klinické údaje dopĺňa, upresňuje aj objasňuje patologickoanatomický nález. Jeho nenahraditeľná úloha sa už potvrdila aj pri iných infekčných ochoreniach v minulosti⁽⁹⁾. V prípade COVID-19 najzávažnejšie dôsledky vyplývajú z poškodenia pľúcneho parenchýmu s rozvojom intersticiálneho, vírusového zápalu pľúc. Skoré i neskoré zmeny majú typický makroskopický aj mikroskopický obraz.

Patologickoanatomický nález pri COVID-19 pneumónii

Makroskopický nález

Makroskopicky sú pľúca vo všeobecnosti ťažké a edematózne, s nálezom difúznej alebo ložiskovej konsolidácie^(3,10). V prípade COVID-19 je častý nález ložísk krvácania a infarktov parenchýmu, nezriedka s nálezom trombózy prírodných ciev⁽¹¹⁾. To sa prejaví tmavofialovým sfarbením na pozadí sivočerveného elastického zápalovo postihnutého tkaniva (**obrázok 1**). Nález pleurálneho výpotku nie je pre COVID-19 typický⁽¹¹⁾.

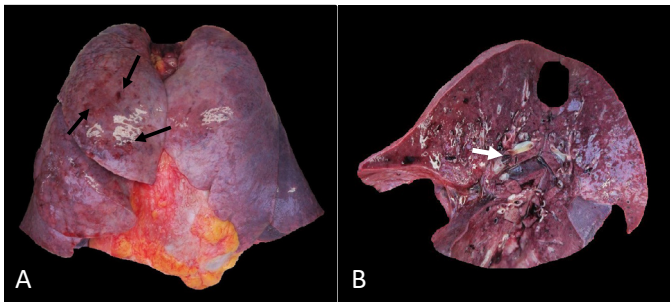
Tracheobronchitída sa vyskytuje u 88 % pacientov s letálnym priebehom COVID-19 nezávisle od intubácie a superinfekcie. Makroskopickým korelátom sú drobné sivobelavé afatózne ulcerácie s priemerom 2-3 mm, v niektorých prípadoch iba fokálne⁽¹⁰⁾.

Nezvyčajne častým nálezom je masívna pľúcna embolizácia z hlbokých žíl dolných končatín, ale aj čerstvá žilová trombóza v tejto oblasti bez embolizácie do pľúc^(3,5).

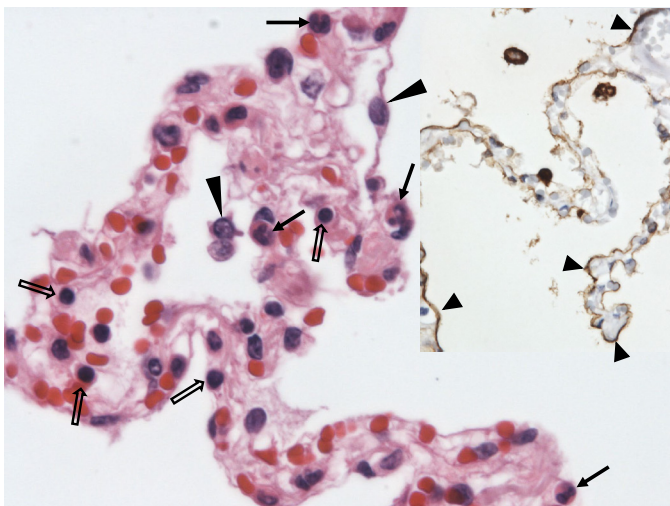
Mikroskopický nález

Mikroskopicky sa vírusové pneumónie prejavujú rôznymi morfológickými zmenami, obvykle ako difúzne alveolárne

Obrázok 1. Makroskopický obraz COVID-19 pneumónie. Pohľad na ventrálnu plochu pľúc a srdca uloženého v epikarde (A). Pľúca sú ťažké, edematózne presiaknuté, tuhoelastickej konzistencie. Subpleurálne sú viditeľné ložiská krvácania (šípky). Na reze (B) sú pľúca nevzdušné, konsolidované, sivočervenej farby. Zachytená trombembolizácia do vetvy arteria pulmonalis (biela šípka).



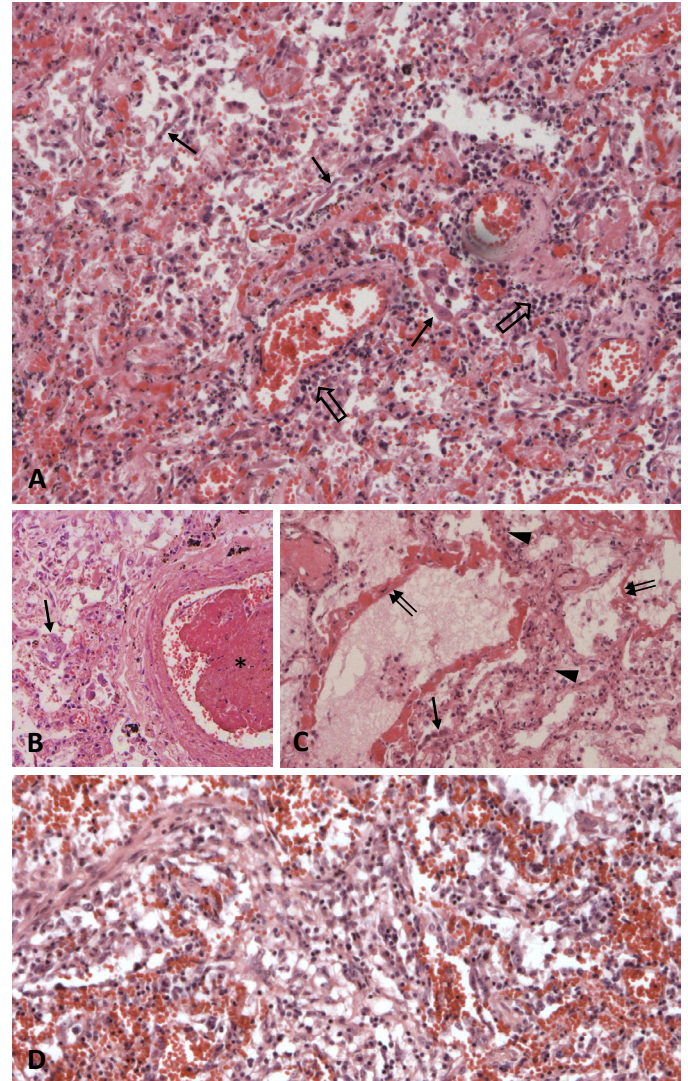
Obrázok 2. Včasné štádium rozvoja pneumónie vyvolanej SARS-CoV-2 s obrazom alveolárnej kapilaritídy. Alveolárne epitéliu sa môžu odlupovať (dlhý hrot šípky), imunohistochemicky s dôkazom SARS-CoV-2 nukleokapsidového proteínu (krátky hrot šípky), v alveolárnych septách je infiltrácia neutrofilmi (šípka) a lymfocytmi (dutá šípka). Hematoxylín a eozín (HE), 600x; výsek: BSB-134, imunoperoxidáza, diaminobenzidín, 400x



poškodenie (DAD, diffuse alveolar damage). Ide o najčastejší histologický korelát klinickej diagnózy syndrómu akútnej respiračnej tiesne (ARDS, acute respiratory distress syndrome). Tak ako klinicky, aj mikroskopicky ide o nešpecifický obraz, ktorý môže byť spôsobený napríklad aj toxickými vplyvmi, baktériami alebo hubami^(6,11). Na vírusový pôvod DAD poukazuje nález cytopatického efektu vírusov, a to najmä intranukleárných, intracytoplazmových inklúzií a mnohojadrových buniek. Tieto sú pri niektorých vírusových pneumóniách vyvolaných pôvodcami ako cytomegalovírus alebo respiračný syncytiálny vírus veľmi výrazné, ale pri mnohých iných, ako napríklad chrípka alebo SARS, ich nenachádzame⁽⁶⁾. Inými typickými nálezmi sú akútna bronchitída, organizujúca sa pneumónia a difúzna intersticiálna pneumónia⁽⁶⁾.

V prípade COVID-19 sú typickým nálezom najmä znaky exsudatívnej a proliferatívnej fázy DAD v rôznom štádiu s poškodením bronchiálneho epitelu, často s progresiou do fibrózy⁽³⁾. Rozvoju DAD v skorých štádiách predchádza nález akútnej alveolárnej kapilaritídy sprevádzanej zmiešanou zápalovou infiltráciou alveolárnych priehradiek lymfocytmi

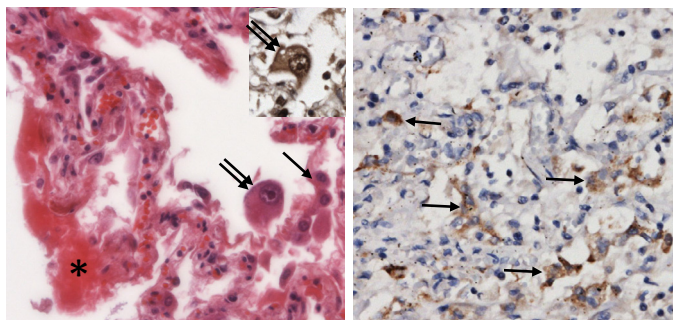
Obrázok 3. Rozvinutý histologický obraz COVID-19 pneumónie (A) s intersticiálnou lymfocytovou infiltráciou s maximom v okolí ciev (otvorená šípka), s reaktívnou hyperpláziou alveolárneho epitelu (šípka) a hromadením odlúpnutých epitelíí a makrofágov v alveolárnom priestore; trombóza (B) v malej artérii (*); difúzne alveolárne poškodenie (C) s alveolárnou kapilaritídou (hrot šípky) a tvorbou hyalínových membrán (dvojité šípky); počínajúca organizácia (D) a rozsiahle krvácania do tkaniva. HE, 100x



a neutrofilmi (obrázky 2, 3C)⁽¹¹⁾, a to aj bez nápadnejšieho poškodenia mimopľúcnych ciev⁽¹⁰⁾. Histomorfologická diagnostika COVID-19 pneumónie v iniciálnom štádiu vývoja je ťažká a v prípade, že pitva bola vykonaná do 30 hodín po smrti, imunohistochemická detekcia SARS-CoV-2 vírusovej infekcie môže byť kľúčová pre stanovenie správneho diagnostického záveru (obrázok 2).

Nálezy typické pre exsudatívnu fázu DAD, opísané pri ochorení COVID-19, zahŕňajú kongesciu malých ciev, zhrubnutie alveolárnych sept, intraalveolárny edém^(3,8,10), pričom osobitne opísaný je proteínový exsudát v alveolárnych priestoroch s ojedinelými veľkými proteínovými globulami a intraalveolárny fibrín⁽⁵⁾. Typické je formovanie hyalínových membrán, perivaskulárna zápalová infiltrácia lymfocytmi a plazmatickými bunkami a ložiská intraalveolárneho krvácania^(3,8,10) (obrázok 3). Charakteristickým nálezom je aj deskvamácia epitelu a aktivované pneumocyty II. typu s výrazne

Obrázok 4. COVID-19 pneumónia s imunohistochemickým dôkazom nukleokapsidového proteínu SARS-CoV-2 v alveolárnych epitelových bunkách (šípka); zriedkavý nález epitelovej bunky s vírusovými cytopatickými znakmi (zdvojená šípka); rozvoj hyalínovej membrány (*). HE, 200x; BSB-134, imunoperoxidáza, diaminobenzidín, 100x



zväčšeným jadrom a prominentným jadriekom a ojedinelé mnohojadrové syncytiálne bunky vznikajúce ich fúziou^(5,8,10) (**obrázky 3A, 4**). Niektorí autori opísali nález intracytoplazmatických inklúzií, ich vírusový pôvod však nebol jednoznačne potvrdený^(8,10). Nukleárne inklúzie opísané neboli⁽¹⁰⁾, zriedkavo však možno nájsť veľké epitelové bunky s nápadne veľkým jadriekom, čo by mohlo byť výsledkom vírusového cytopatického účinku vzhľadom na imunohistochemicky potvrdenú prítomnosť SARS-CoV-2 vírusovej infekcie v takýchto bunkách (**obrázok 4**).

Častým nálezom sú fibrínové mikrotromby v pľúcnych kapilárach aj vo väčších cievach⁽¹⁰⁾ (**obrázok 3B**). Mikrotromby nie sú raritou ani pri iných vírusových pneumóniách, ako to bolo napríklad pri SARS, omnoho zriedkavejšie pri chrípke^(11,14). V prípade COVID-19 je ich výskyt je prekvapivo častý aj u pacientov, ktorí dostávali antikoagulačnú terapiu⁽¹⁴⁾. Endotelové bunky sú často napučané až s tvorbou vakuol a so zdvojením bazálnej membrány. V niektorých prípadoch nachádzame kapilárne poškodenie s nekrózou kapilár, proliferáciou kapilár a zápalovou infiltráciou⁽¹⁰⁾.

Pre proliferatívnu fázu je typické pretrvávanie reaktívnej hyperplázie pneumocytov II. typu a proliferácia fibroblastov sprevádzaná expanziou stien alveolov s následným prestupom do alveol^(3-6,10) (**obrázok 3D**). Môže byť prítomná aj skvamózna metaplázia^(5,11). Častými nálezmi, ktoré predstavujú komplikácie DAD sú fibróza pľúc a sekundárna bakteriálna, menej často hubová infekcia^(3,10).

Distribúcia DAD vo všetkých fázach v prípade COVID-19 nie je uniformná, súčasne nachádzame zmeny v rôznych štádiách, hlavne v stredných a dolných lalokoch pľúc⁽⁵⁾. Ložiská postihnutého parenchýmu sú rozložené nerovnomerne⁽¹⁰⁾.

Polak a spol. rozdelili nález pri COVID-19 pneumónii odlišne, a to na 3 hlavné histologické vzory: 1. epitelový s reaktívnymi zmenami epitelu, prítomný u 85 % pacientov, 2. vaskulárny s mikrovaskulárnym poškodením, mikrotrombami a akútnou fibrinóznou a organizujúcou sa pneumóniou (59 % pacientov) a 3. fibrotický s fibrózou interstícia (22 % pacientov). Jednotlivé vzory sa aj prekrývali, pričom fibróza sa vyskytuje od 3. týždňa⁽⁴⁾.

Existujú indície, že COVID-19 môže minimálne u časti pacientov ako primárnu odpoveď vyvolávať organizujúcu sa pneumóniu, pričom k rozvoju znakov DAD dochádza až neskôr v dôsledku iných udalostí, napríklad pľúcnej ventilácie

alebo trombotickej mikroangiopatie^(7,10). Organizujúca sa pneumónia vyvolaná vírusmi bola opísaná v minulosti napríklad v súvislosti so SARS, MERS aj H1N1^(7,12). Na preskúmanie tejto možnosti v prípade COVID-19 však nie je dostupné dostatočné množstvo prác opisujúcich nález na pľúcach vo veľmi skorom štádiu ochorenia⁽⁷⁾.

Z našich pozorovaní pri analýze početných pitvaných prípadov úmrtí na COVID-19 môžeme pri mnohých konštatovať prítomnosť všetkých opísaných histologických nálezov, nezriedka súčasne na rozličných miestach pľúc. Táto skutočnosť poukazuje na nástup infekcie v rôznych častiach pľúc s odlišným časovým odstupom. Takéto paralely sa vyskytujúce nálezy COVID-19 pneumónie sú oveľa častejšie u pacientov z 2. vlny pandémie, na rozdiel od 1. vlny (na Slovensku do konca júna 2020), kde spravidla dominovalo masívne a uniformné postihnutie celého tkaniva pľúc.

Nález v iných orgánoch

Maiese a spol. vo svojej prehľadovej štúdií analyzujúcej histologický a pitevný nález v prácach publikovaných do júna roku 2020 nenašli dôkaz špecifických zmien v iných orgánoch okrem pľúc. Medzi mimopľúcny nálezmi dominujú mikrotromby a endotelitída rôznych orgánov, šokové zmeny pečene, obličiek a čriev, hemofagocytóza v kostnej dreni a slezine⁽³⁾.

Zrejme ani kardiálne komplikácie pri ochorení COVID-19 nie sú spôsobené priamym poškodením myokardu vírusom^(3,13). Medzi frekventované zmeny na srdci patria mikrotromby pretrvávajúce aj po klírense vírusu a amyloidóza srdca. Myokarditída máva v prípade nálezu veľmi limitovaný rozsah⁽³⁾.

Časté neurologické príznaky pri ochorení COVID-19 poukazujú na možný neurotropizmus vírusu. Imunohistochemicky sú vzorky nervového tkaniva v drvivej väčšine negatívne, okrem prípadu nálezu pozitivity v nervus vagus, nervus glossopharyngeus a ojedinelých buniek v predĺženej mieche celkovo u 16 pacientov. Vo všeobecnosti medzi najčastejšie nálezy patrí intrakraniálne krvácanie a encefalomalácie rôznej lokalizácie a rozsahu a mierny, fokálny, T-lymfocytový infiltrát v okolí ciev, v parenchýme mozgu a leptomeningoch⁽¹⁶⁾.

S výnimkou pľúc boli vírusové partikuly dokázané najmä v obličkách a čreve^(3,14). U pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19 s indikovaným bioptickým vyšetrením boli najčastejšími nálezmi akútne tubulárne poškodenie, fokálna segmentálna glomeruloskleróza, poškodenie endotelu a trombotická mikroangiopatia⁽¹⁵⁾. Časté gastrointestinálne ťažkosti nekorelujú s horšou prognózou pacientov. Mikroskopicky je prítomné poškodenie endotelu ciev submukózy, lymfoplazmocytovej zápalovej infiltrát a edém lamina propria⁽¹⁴⁾. V prípade známk poškodenia pečene existujú indície, že u časti pacientov môžu byť zmeny spôsobené priamou infekciou vírusom⁽¹⁸⁾.

Imunohistochemická detekcia SARS-CoV-2 infekcie

Mikroskopický obraz v prípade vírusových pneumónií vrátane COVID-19 spravidla nie je dostatočne špecifický. V mnohých prípadoch je potrebné etiologický agens v nekroptických a bioptických vzorkách dokázať metódami ako PCR, in situ hybridizácia, imunofluorescenčnými metódami alebo

Tabuľka 1. Imunohistochemická detekcia infekcie SARS-CoV-2 v humánných tkanivách protilátkami od rôznych producentov.

N°	Kat. N°	typ/klon	Ag	producent	Ag revital.	riedenie	inkubácia	nešpecif.r
1.	40590-T62	Rb-PAb	S2	Sino Biological	citrát	1:1000	noc	n/AE,BE,Le; c/BE,TE
2.	40588-T62	Rp-PAb	NP	Sino Biological	citrát	1:1000	noc	c/AE,BE
3.	NB100-56576	Rb-PAb	NP	Novus Biologicals	citrát	1:20	noc	no, ↓ senzitivita
4.	A2060-50	M-MAb 6F10	NP	BioVision	citrát	1:50	noc	no, ↓ senzitivita
5.	40150-R007	Rb-MAb 007	S1	Sino Biological	citrát/TRIS	1:20	noc	no, ↓ senzitivita
6.	40143-R001	Rp-MAb 001	NP	Sino Biological	citrát/TRIS	1:100	1 h	no
7.	GTX632604	Mo-MAb 1A9	Spike	GeneTex	citrát/TRIS	1:10	noc	-
8.	MBS9141939	Rb-MAb	NP	MyBioSource	citrát	1:2000	noc	c/AE,BE; Er. plazma
9.	BSB134	Mo-MAb 134	NP	BS-Bio	citrát	RTU	1 h	no
10.	DB280	R-MAb C19-Y	NP	DB-Biotech	citrát	1:1000	1 h	c/BE,Dec, nTB, Er

Ag: antigén; n: nukleárna pozitivita; c: cytoplazmová pozitivita; AE: alveolárny epitel; BE: bronchálny epitel; TE: tubulárny epitel obličky; Le: leukocyty; Er: erytrocyty; Dec: decidua; no: nepozorovaná nešpecifická reaktivita

imunohistochemicky (IHC)⁽⁶⁾. Najjednoduchšia a najlacnejšia je rutinne využívaná imunohistochemia.

V prípade imunohistochemickej diagnostiky COVID-19 vzniká niekoľko problémov. Najzávažnejší je, že IHC detekcia vírusu v pľúcnom tkanive je spoľahlivá len v priebehu prvých 2 týždňov ochorenia, vzácne možno vírus dokázať ešte do 4 týždňov⁽¹⁰⁾. Iným závažným problémom v prípade IHC dôkazu prítomnosti SARS-CoV-2 vo vyšetřovanom tkanive je časový odstup vykonania pitvy po úmrtí. Naše skúsenosti ukazujú, že imunohistochemická reaktivita zostáva zachovaná približne do 30 hodín po smrti. Po tomto období sa imunohistochemická detekcia vírusu stáva nespoľahlivou a so zväčšujúcim sa časovým intervalom výkonu pitvy od úmrtia až nemožnou. Dostupné práce však väčšinou čas pitvy neuvádzajú, preto nie je možné vyjadriť sa k zistenej spoľahlivosti IHC⁽¹⁷⁾.

Ďalšie ťažkosti vyplývajú z existencie množstva komerčne dostupných, ale nedostatočne overených protilátok, často s vysokou skríženou reaktivitou v imunohistochemickej aplikácii. Za použitia týchto protilátok bolo v roku 2020 publikovaných množstvo prác s údajným nálezom priameho vírusového poškodenia rôznych tkanív.

Z tohto dôvodu sme testovali protilátky na tkanivových vzorkách pľúc pacientov zosnulých na následky COVID-19 a na tkanivách z obdobia pred r. 2020. Testovali sme na tkanivových rezoch bez antigénovej revitalizácie a s revitalizáciou 30 min. v citrátovom pufri pH 5 alebo TRIS pufri pH 8, pri teplote varu. Negatívne kontroly boli jednak preparáty inkubované bez primárnej protilátky alebo inkubované s myšacím alebo králičím sérom pri rovnakom riedení ako testovaná protilátka. S cieľom dosiahnutia vyššej špecificity sme protilátky testovali s inkubáciou cez noc pri zvýšených riedeniach. Okrem skríženej reaktivity niektorých protilátok v tkanivách

získaných roky pred objavením sa SARS-CoV-2 vírusu, viaceré protilátky sa ukázali ako nevhodné pre imunohistochemickú aplikáciu (**tabuľka 1**). V pľúcnom tkanive sa ukázala spoľahlivá imunohistochemická detekcia SARS-CoV-2 vírusu predovšetkým v skorom štádiu infekcie, v bronchiolárnom, bronchálnom epiteli a najmä v odlupujúcich sa vírusom napadnutých alveolárnych epiteliách (**obrázok 4**). Zriedkavejšie sme pozorovali pozitivitu aj v hyperplastických alebo syncytiálnych obrovských alveolárnych epitelových bunkách. Celkom ojedinelo bola pozitivita v cytoplazme veľkých buniek s veľkým mechúrikovým jadrom a veľkým jadričkom, pravdepodobne s vírusovými cytopatickými znakmi (**obrázok 4**).

Záver

Pandémia spôsobená vírusom SARS-CoV-2, s náhlym nástupom a rýchlym rozšírením po celej zemeguli, odhalila potrebu čo najrýchlejšieho a spoľahlivého objasnenia patologického podstaty ochorenia. Do popredia sa tak po rokoch zaznávania až odmietania patologickoanatomickej pitvy dostáva posmrtná analýza zosnulých, ktorá je zdrojom základných informácií o patogenéze ochorenia a rozsahu poškodenia v rôznych tkanivách. Analýza pitevných nálezov poskytla základné poznatky o chorobe COVID-19 a prispela okrem pochopenia patológie aj k smerovaniu terapeutických stratégií pri liečbe tohto závažného ochorenia. Imunohistochemický dôkaz prítomnosti infekcie SARS-CoV-2 vo vyšetřovanom tkanive je rýchla a finančne nenáročná metóda. Je však limitovaná časovým odstupom pitvy po smrti a dostupnosťou protilátok s vysokou špecificitou a senzitivitou.

Oznam

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. PP-COVID-20-0051.

LITERATÚRA

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Covid19.who.int. https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAiAm-2BBhANEiwAe7eyFK6TAzBmS-jQHhO-Lf7d3BMDsrF6vSN35KMeJRQnlWh_tG0uDaRpRhoCd7wQAvD_BwE. Published 2021. Accessed April 8, 2021.
2. Gao Y, Ding M, Dong X, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*. 2020;76(2):428-455. doi:10.1111/all.14657
3. Maiese A, Manetti A, La Russa R, et al. Autopsy findings in COVID-19-related deaths: a literature review. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 2020. doi:10.1007/s12024-020-00310-8

4. Polak S, Van Gool I, Cohen D, von der Thüsen J, van Paassen J. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Modern Pathology*. 2020;33(11):2128-2138. doi:10.1038/s41379-020-0603-3
5. Sessa F, Bertozzi G, Cipolloni L, et al. Clinical-Forensic Autopsy Findings to Defeat COVID-19 Disease: A Literature Review. *J Clin Med*. 2020;9(7):2026. doi:10.3390/jcm9072026
6. Suster S, Moran C. *Biopsy Interpretation Of The Lung*. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013:155-173.

7. Kory P, Kanne J. SARS-CoV-2 organising pneumonia: 'Has there been a widespread failure to identify and treat this prevalent condition in COVID-19?'. *BMJ Open Respir Res.* 2020;7(1):e000724. doi:10.1136/bmjresp-2020-000724
8. Al Nemer A. Histopathologic and Autopsy Findings in Patients Diagnosed With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): What We Know So Far Based on Correlation With Clinical, Morphologic and Pathobiological Aspects. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(6):363-370. doi:10.1097/pap.0000000000000276
9. Salerno M, Sessa F, Piscopo A, et al. No Autopsies on COVID-19 Deaths: A Missed Opportunity and the Lockdown of Science. *J Clin Med.* 2020;9(5):1472. doi:10.3390/jcm9051472
10. Borczuk A, Salvatore S, Seshan S, et al. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. *Modern Pathology.* 2020;33(11):2156-2168. doi:10.1038/s41379-020-00661-1
11. Bösmüller H, Matter M, Fend F, Tzankov A. The pulmonary pathology of COVID-19. *Virchows Archiv.* 2021;478(1):137-150. doi:10.1007/s00428-021-03053-1
12. Shieh W, Hsiao C, Paddock C, et al. Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum Pathol.* 2005;36(3):303-309. doi:10.1016/j.humpath.2004.11.006
13. Bois MC, Boire NA, Layman AJ, et al. COVID-19-Associated Nonocclusive Fibrin Microthrombi in the Heart. *Circulation.* 2021;143(3):230-243. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050754
14. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1017-1032. doi:10.1038/s41591-020-0968-3
15. Akilesh S, Nast CC, Yamashita M, et al. Multicenter Clinicopathologic Correlation of Kidney Biopsies Performed in COVID-19 Patients Presenting With Acute Kidney Injury or Proteinuria. *Am J Kidney Dis.* 2021;77(1):82-93.e1. doi:10.1053/j.ajkd.2020.10.001
16. Mukerji SS, Solomon IH. What can we learn from brain autopsies in COVID-19?. *Neurosci Lett.* 2021;742:135528. doi:10.1016/j.neulet.2020.135528
17. Roden AC, Vrana JA, Koepllin JW, et al. Comparison of In Situ Hybridization, Immunohistochemistry and Reverse Transcription-Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARSCoV-2)-Testing in Tissue [published online ahead of print, 2021 Mar 15]. *Arch Pathol Lab Med.* 2021;10.5858/arpa.2021-0008-SA. doi:10.5858/arpa.2021-0008-SA
18. Wang Y, Liu S, Liu H, et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol.* 2020;73(4):807-816. doi:10.1016/j.jhep.2020.05.002

prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.
Ústav patologickej anatómie LFUK
Sasinkova 4, 813 72 Bratislava
e-mail: pavel.babal@fmed.uniba.sk