

SARS-CoV-2-fehérjék kimutatása immunhisztokémiai módszerrel emberi szövetekben

Patológiai körvizsgálat

Pesti Adrián¹ ■ Gyömörei Csaba dr.² ■ Juhász Péter dr.³
Kálmán Endre dr.² ■ Kiss András dr.¹ ■ Kuthi Levente dr.⁴ ■ Lotz Gábor dr.¹
Méhes Gábor dr.³ ■ Schaff Zsuzsa dr.¹ ■ Tizslavicz László dr.⁴

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, Budapest

²Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Pécs

³Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Debrecen

⁴Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Szeged

Bevezetés: A SARS-CoV-2 (súlyos akut légzőszervi szindrómát előidéző koronavírus) okozta COVID-19 világszerte sajnálatosan nagy halálozással jár. A fertőzés kimutatása elsősorban polimeráz-lánreakcióval (PCR) történik élőben vagy a halál után, amely azonban nem ad információt arról, hogy a vírus mely sejtekben, szövetekben van jelen. A SARS-CoV-2 tüske- és nukleokapszid-proteinjeinek, valamint a vírus-ribonukleinsavnak (RNS) az *in situ* kimutatása igazolhatja a vírus jelenlétét, valamint adatot szolgáltat annak direkt vagy indirekt sejtpusztulást okozó mechanizmusáról. Jelenleg számos SARS-CoV-2-tüske- és -nukleokapszid fehérjeellenes antitest van kereskedelmi forgalomban, melyek eltérő eredménnyel képesek a megfelelő antigének kimutatására.

Célkitűzés: A jelen munka célja a megfelelő, megbízhatóan működő antitest kiválasztása volt.

Módszer: COVID-19-ben elhunyt 3 egyén formalinfixált, paraffinba ágyazott, SARS-CoV-2-PCR-pozitív tüdejének anyagai, valamint fertőzött placenta anonim módon jelölt mintái kerültek vizsgálatra, megfelelő negatív kontrollal. Az immunhisztokémiai reakciók intenzitását és specifitását hasonlították össze négy hazai orvostudományi egyetemi patológiai intézet részvételével, különböző antitesteket és hígításokat alkalmazva. Az elvégzett immunhisztokémiai reakciók szkennelt, kódolt metszeteken kerültek értékelésre, majd az eredmények összesítése után statisztikai elemzésre.

Eredmények: A vizsgálatok alapján meghatározhatók voltak azon antitestek, amelyek a jelölt hígításban és módszerrel megfelelő intenzitású, megbízható eredményt adtak.

Következtetés: A vizsgálat alapot ad arra, hogy a SARS-CoV-2 egyes komponensei biopsziás/sebészi anyagban és az elhunyt szövetekben nagy pontossággal és reprodukálható módon kimutathatók legyenek a COVID-19-ben megbetegedett, elhunyt egyének élőben vagy halál után eltávolított szöveteiben, sejtjeiben.

Orv Hetil. 2022; 163(25): 975–983.

Kulcsszavak: COVID-19, SARS-CoV-2, tüskefehérje, nukleokapszid-fehérje, immunhisztokémia

Detection of SARS-CoV-2 proteins by immunohistochemistry in human tissues

Pathology collaborative analysis

Introduction: The COVID-19 (coronavirus disease 2019) caused by SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) is associated with high mortality rates worldwide. Polymerase chain reaction (PCR) is extensively used for virus detection in both infected patients and deceased persons. PCR, however, gives no information about the localization of the virus in cells and tissues. Detection of spike and nucleocapsid proteins and viral ribonucleic acid (RNA) of the SARS-CoV-2 *in situ* might provide more information and aid in the discovery of the pathomechanism of cellular damage. There are several commercially available anti-spike and anti-nucleocapsid antibodies used to detect immunohistochemical reactions, though each gives different results.

Objective: The goal of the present study was to compare the intensity and specificity of several anti-spike and anti-nucleocapsid antibodies in different dilutions in four Hungarian university departments.

Method: Immunohistochemical reactions were performed on coded slides taken from infected lungs of 3 deceased and placenta samples with appropriate negative controls of formalin-fixed paraffin-embedded tissues, scanned, evaluated unanimously and analysed statistically by the assessors.

Results: By comparing the intensity, dilution, background and reproducibility of the different primary antibodies, it was possible to select the antibodies with the best results.

Conclusion: The antibodies selected with established dilutions can be used in further studies to detect SARS-CoV-2 proteins in surgical materials and in samples obtained during autopsy.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, spike protein, nucleocapsid protein, immunohistochemistry

Pesti A, Gyömörei Cs, Juhász P, Kálmán E, Kiss A, Kuthi L, Lotz G, Méhes G, Schaff Zs, Tiszlavicz L. [Detection of SARS-CoV-2 proteins by immunohistochemistry in human tissues. Pathology collaborative analysis]. *Orv Hetil.* 2022; 163(25): 975–983.

(Beérkezett: 2022. március 21.; elfogadva: 2022. április 19.)

Rövidítések

ARDS = (acute respiratory distress syndrome) akut légzőszervi distressz szindróma; CE = (Conformité Européenne) európai megfelelés; COVID-19 = (coronavirus disease 2019) koronavírus-betegség 2019; DAB = diaminobenzidin; FFPE = (formalin-fixed, paraffin-embedded) formalinfixált, paraffinba ágyazott; HE = hematoxilin-eozin; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; RNS = ribonukleinsav; RT-PCR = (reverse transcription polymerase chain reaction) reverztranszkriptáz polimeráz-láncreakció; RUO = (Research Use Only) csak kutatási használatra; SARS-CoV-2 = (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2; SE = Semmelweis Egyetem; TUKEB = Tudományos és Kutatásügyi Bizottság

A SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) okozta COVID-19-et (coronavirus disease 2019) az Egészségügyi Világszervezet (WHO) pandémiává nyilvánította [1]. Már a járvány kezdetén világossá vált, hogy a koronavírusok közé tartozó SARS-CoV-2 elsősorban a tüdőt támadja, abban okoz súlyos, igen összetett károsodást, mely a légzőfelület jelentős csökkenéséhez vezet a betegekben, az alveolaris hám pusztulásával, az ún. akut légzőszervi distressz szindróma (ARDS) kialakulásával, hialinmembrán-betegséggel [2–11]. A COVID-19 jobb megismerése azonban rávilágított arra, hogy a tüdön kívül egyéb szervek – kiemelten a szív, a vese, az idegrendszer, a máj stb. – is érintettek lehetnek, amire a klinikai tünetek is utalnak [4, 12–18]. Nem világos azonban, hogy az extrapulmonalis elváltozásokért a vírus közvetlen sejtkárosító hatása felelős-e, vagy annak közvetett hatása, így a vírus kiváltotta „citokinvihar”, a szív- és érrendszeri komplikációk, a hypoxia, a beteg gyógyszeres kezelésének hatása stb. [4, 10, 19–21]. Ennek eldöntésében segíthet a SARS-CoV-2 egyes komponenseinek, így tüske- és nukleokapszid-fehérjéinek, valamint a vírus-ribonukleinsavnak (RNS) az *in situ* kimutatása a sejtekben és a szövetekben. A vírusfehérjék

kimutatása *in situ* immunhisztokémiai módszerekkel, a vírus-RNS detektálása *in situ* hibridizációs módszerrel lehetséges [4, 10]. A világszerte végzett és közölt immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatok azonban eltérő eredményt hoztak, nem sikerült egyértelműen detektálni a vírusfehérjéket és a vírus-RNS-t a sejtekben. Ennek egyik oka lehet, hogy a vizsgálatokban használt antitestek, módszerek eltérőek. Célunk volt ezért, hogy összevessük az egyes hazai laboratóriumokban használt SARS-CoV-2-ellenes antitesteket, és vizsgáljuk a különböző hígításokban végzett immunhisztokémiai reakciók intenzitását, reprodukálhatóságát eltérő laboratóriumi körülmények között.

Anyag és módszerek

Vizsgálati minták

A Semmelweis Egyetem (SE) Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézetének anyagából 3, COVID-19-ben elhunyt betegből származó 3 tüdőmintát, valamint COVID-19-ben szenvedő várandós placentájából származó mintát választottunk ki. Negatív kontrollként egy, a COVID-19-pandémia előtt elhunyt egyén tüdőszövetét vizsgáltuk, akiben virális pneumonia volt a diagnózis. A mintákat az asszisztensek sorszámmal látták el. A vizsgálok az immunhisztokémiai reakciót anonim módon értékelték. A vizsgálatba bevont pozitív és negatív minták számát sem az immunreakciót végzők, sem az értékelők nem ismerték, beleértve a metszeteket készítő intézet értékelő szakembereit. A betegek SARS-CoV-2-fertőzöttségét élőben, orr-garat mintából végzett reverztranszkriptáz polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) igazolták. A halál és a boncolás között 24–48 óra telt el, a placenta esetében a szerv 6 óra múlva került feldolgozásra. A boncolás során a COVID-19-ben elhunyt betegek közvetlen haláloka súlyos virális típusú pneumonia

volt, jellegzetes diffúz alveolaris károsodással, valamint hialinmembrán-képződéssel.

A vizsgálatok összhangban voltak a Helsinki Deklaráció irányelveivel, és a Tudományos és Kutatásügyi Bizottság (TUKEB) IV/938-1/2022/EKU számon hozójárult azok elvégzéséhez.

Hisztológia: A tüdő-, valamint placentamintákat kivágás után 10%-os formalinban fixáltuk – ami 4%-os formaldehidkoncentrációnak felel meg – 24 órán át, majd dehidrációt követően paraffinba (FFPE) ágyasztuk. A metszeteket rutin módon hematoxilin-eozinnal (HE) festettük.

A vizsgálat szervezése: A SE-en kiválasztott, COVID-19-ben elhunytak FFPE-tüdőmintáiból, a placentából és egy pandémia előtt, boncolás során nyert tüdőmintából RT-PCR-reakcióval igazoltuk a SARS-CoV-2-szekvenciákat, illetve a negatív kontroll esetében azok hiányát. Az FFPE-anyagból készített metszetek immunhisztokémiára előkészített tárgylemezeken kerültek a részt vevő intézetekhez az immunhisztokémiai reakciók elvégzésére. A részt vevő intézetek a következők voltak: a Debreceni Egyetem, a Pécsi Tudományegyetem és a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézete. A pozitív és negatív mintákat sorszámmal láttuk el az anonimitás biztosítására.

Immunhisztokémia: Az elsődleges antitesteket, a gyártó cégeket, a megfelelő hígítást az 1. táblázat tartalmazza.

A reakciókat a Roche cég VENTANA BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) immunhisztokémiai készülékével, a forgalmazó által ajánlott OptiView DAB (Diaminobenzidine IHC Detection Kit, Ventana) segítségével vizualizáltuk mind a négy laboratóriumban, hematoxilin-háttérfestéssel, követve a gyártó cég útmutatásait. Az ellenanyagokból az NP 1 és a SPIKE 1 központilag került beszerzésre (SE) és szállításra a részt vevő intézetekbe, a FedEx segítségével, a megfelelő szállítási körülmények betartásával. A B vizsgálóhely által használt ellenanyagokat a helyi intézet rendelte, mivel azokat korábban már alkalmazták és végezték velük a reakciókat az egyéb, központilag küldött immunhisztokémiai reakcióra alkalmazott metodikával. Az ezekkel az antitestekkel végzett reakciók eredményességét a további három részt vevő intézet is értékelte. A használt ellenanyagok nem rendelkeztek CE-jelöléssel, mint az immunhisztokémiai diagnosztikában használt immunhisztokémiai reagensek többsége esetében, csak RUO-minősítéssel.

Értékelés: Az elkészült immunhisztokémiai reakciókat tartalmazó tárgylemezeket a résztvevők a SE-re küldték, ahol azok a 3DHitech Panoramic® 1000 Digital Slide Scanner (3D Histech Kft., Budapest, Magyarország) készülékével szkennelésre kerültek. A résztvevők a digitalizált metszeteket a megadott linken keresztül a számítógép képernyőjén, szemikvantitatívan értékelték. Az

1. táblázat | A SARS-CoV-2-nukleokapszid és -tüskefehérje elleni antitestekkel végzett immunhisztokémiai reakciók értékelése négy vizsgálóhelyen (A, B, C, D)

Az antitest kódja	Az antitest neve, gyártó*, katalógusszám	Eredet, klón	Hígítás	A vizsgálóhely kódja	Intenzitás-összeg** [§]	Háttér-összeg*** [§]
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	Egér, #05	1 : 1000	A	46	7
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	Egér, #05	1 : 1000	B	48	8
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	Egér, #05	1 : 1000	C	46	11
NP 1	SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Sino, 40143-MM05	Egér, #05	1 : 1000	D	48	8
NP 2	SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Ab, Thermo, MA1-7404	Egér, B46F	1 : 100	B	31	10
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	Nyúl, E5S3V	1 : 200	A	44	0
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	Nyúl, E5S3V	1 : 500	B	44	0
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	Nyúl, E5S3V	1 : 250	C	47	7
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	Nyúl, E5S3V	1 : 500	C	43	4
SPIKE 1	SARS-CoV-2 Spike Protein (S1), CST, #99423	Nyúl, E5S3V	1 : 500	D	39	0
SPIKE 2	Anti-SARS-CoV-Spike, DB, DB 279	Nyúl, Q25-L	1 : 500	B	23	11
SPIKE 3	SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 ab, Abcam, ab275759	Nyúl, polyclonalis	1 : 2000	B	31	22

SARS-CoV-2 = súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2

*Sino: Sino Biological Inc., Beijing, P. R.China; CST: Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA; Abcam: Abcam PLC, Cambridge, UK; Thermo: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; DB: DB Biotech a.s., Kosice, Slovakia

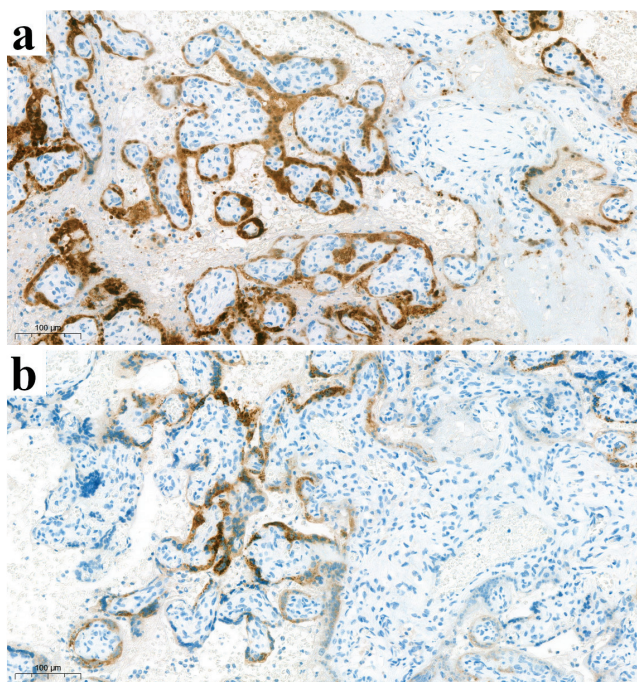
**Az egyes vizsgálóhelyek által adott pontértékek összege az adott antitesttel végzett reakció intenzitására vonatkozóan

***Az egyes vizsgálóhelyek által adott pontértékek összege az adott antitesttel végzett reakció háttérére vonatkozóan

§A pontértékek összegének várt elméleti maximuma 48 (4 maximális – 3 – pontot elért pozitív minta, 4 vizsgálóhely)

immunhisztokémiai reakció intenzitását (0–3 pont), valamint a reakció hátterét (0–3) pontozták, egész számértéket használva. A nyert pontok összegzése alapján kerültek kiválasztásra a javasolható antitestek, megjelölve a legmegfelelőbb hígítást az antigének kimutatására, figyelembe véve a hátteret és az esetleges aspecifikus reakciót.

Statisztikai analízis: Az eredmények kiértékelését az IBM SPSS Statistics 28.0.1.0(142) (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) szoftverrel végeztük. A kiértékelés első lépéseként azt vizsgáltuk a Fleiss-féle kappa-mutatóval, hogy a pontozást végző személyek azonos statisztikai minőségben értékelték-e a mintákat [22]. A különböző részt vevő intézetekben (A, B, C, D) készült minták összevetésére (antitesttípusok, hígítások, vizsgálóhelyek) szintén a Fleiss-féle kappa-, illetve két csoport összevetése esetén az erre az esetre speciálisan használandó Cohen-féle kappa-mérőszámot alkalmaztuk. A vizsgálóhelyek összehasonlításakor az adott mintára a négy értékelő által adott pontok összegéből képzett adatsort vetjük az elemzés alapjául, valamint a vizsgálóhelyek végső összevetésére Friedman-tesztet is végeztünk [23]. Az elemzések során a statisztikában elfogadott 95%-os konfidenciaintervallumot alkalmaztuk ($\alpha = 0,05$). Fontos kiemelni, hogy az egyes adatcsoportok csekély elemszáma miatt a használt statisztikai módszerek eredményei csak limitáltan vehetők figyelembe.



1. ábra

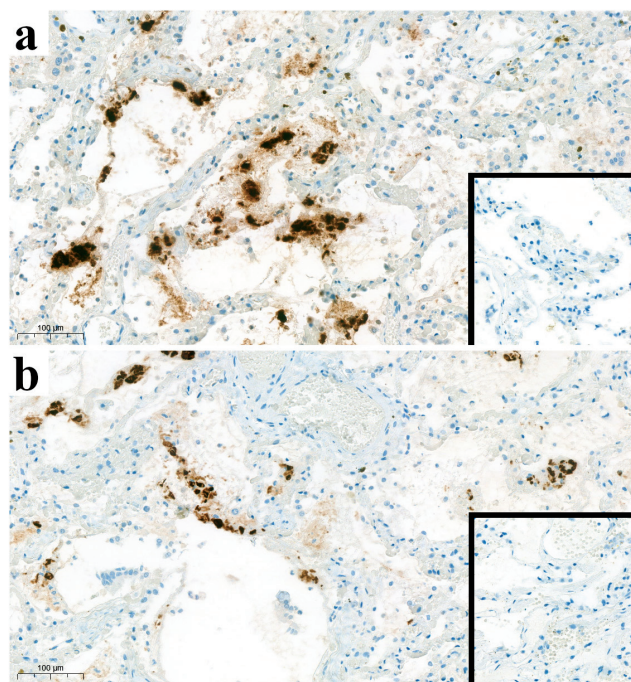
SARS-CoV-2-nukleokapszid- (a) és -tüskéfehérje (b) kimutatása immunhisztokémiai reakcióval, diaminobenzidin kromogént használva, vírusfertőzött placentában. A barna szín jelzi a syncytiotrophoblastokban jelen lévő vírusfehérjét. A magzati erekben nem észlelhető pozitívítás. Antitest: NP 1, SPIKE 1, intenzitás: 3, háttér: 0. Lépték 100 µm

SARS-CoV-2 = súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2

Eredmények

Az elvégzett immunhisztokémiai reakciók képét az 1. és 2. ábra mutatja. A placentában erős barna színreakció látható a syncytiotrophoblastokban, mind a nukleokapszid-, mind a tüskéfehérjék kimutatására irányuló immunhisztokémiai reakciók esetén, diaminobenzidin (DAB) kromogént használva (1/a és 1/b). A tüdőminták esetében erős barna színreakció jelzi a SARS-CoV-2 nukleokapszid- (2/a) és tüskéfehérjének (2/b) jelenlétét a pneumocytákban, a levált alveolaris hámsejtekben és a hialinmembránban. A negatív kontrollban nem észleltünk barna színreakciót (2/a betét és 2/b betét).

Az immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív értékelésének eredményeit az 1. táblázat mutatja. Az egyes vizsgálóhelyek által a mintákra adott pontértékeket az 1. mellékletben tüntettük fel. A statisztikai elemzések azt mutatták, hogy az intenzitás szemikvantitatív megítélésében a pontozást végző személyek valódi egyezést mutattak (Fleiss-kappa = 0,62). A háttér minősítése szempontjából nagyobb volt az eltérés az értékelők pontozásai között (Fleiss-kappa = 0,45), ez mérsékelt egyezést jelent. Ezen adathalmazok segítségével megállapítást



2. ábra

SARS-CoV-2-nukleokapszid- (a) és tüskéfehérje (b) kimutatása immunhisztokémiai reakcióval, diaminobenzidin kromogént használva, COVID-19-ben elhunyt beteg tüdőszövetében. A változó erősségű színreakció jelzi a vírusfehérjék jelenlétét. Levált alveolaris hámsejtekben és makrofágokban erős citoplazmatikus reakció látható. Antitest: NP 1, SPIKE 1, intenzitás: 3, háttér: 0. A SARS-CoV-2-nukleokapszid- (a-betét) és -tüskéfehérje (b-betét) negatív a SARS-CoV-2-vel nem fertőzött (PCR-negatív) tüdőmintákban. Antitest: NP 1, SPIKE 1, intenzitás: 0, háttér: 0. Lépték 100 µm

COVID-19 = koronavírus-betegség 2019; PCR = polimeráz-láncreakció; SARS-CoV-2 = súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2

nyert, hogy a B vizsgálóhely által kipróbált NP 2, SPIKE 2 és SPIKE 3 jelű antitestek (1. táblázat) az intenzitás tekintetében alacsonyabb, a háttér tekintetében magasabb pontszámot értek el, összehasonlítva a mind a négy vizsgálóhelyen tesztelt NP 1 és SPIKE 1 jelű antitestekkel. (NP 1–NP 2: Cohen-féle kapp = 0,47; SPIKE 1–SPIKE 2: Cohen-féle kapp = 0,47; SPIKE 1–SPIKE 3: Cohen-féle kapp = 0,46.)

A hígítások tekintetében az értékelési pontok alapján a nukleokapszid-ellenes elsődleges antitest használata esetében a Sino Biological Inc. cég terméke (1. táblázat – NP 1-es kód) 1 : 1000 arányú hígításban megfelelő intenzitású, minimális háttérfestést nyújtó reakciót adott mind a négy vizsgálóhelyen. A tüskefehérje-ellenes antitestek esetében az egyes hígítások között nem mutatkozott érdemi eltérés (az 1 : 200–1 : 500 hígítások összevetésénél a Cohen-féle kapp = 0,69; az 1 : 250–1 : 500 hígítások összehasonlítása esetén a Cohen-féle kapp = 0,74). Összességében a Cell Signaling Technology Inc. cég terméke (1. táblázat – SPIKE 1-es kód) 1 : 500 arányú hígításban megfelelőnek bizonyult a reakciók elvégzésére.

A reakcióintenzitások tekintetében a négy vizsgálóhely között az eltérő laboratóriumi körülmények ellenére sem volt tapasztalható statisztikailag jelentős eltérés (a Friedman-teszt eredménye: szignifikancia = 0,75, mely jelentősen meghaladja a szignifikáns különbséget jelző 0,05-ös határt). Ugyanakkor az NP 1-es és SPIKE 1-es (1 : 200, 1 : 500 hígítású csoportok) kóddal rendelkező antitestekhez tartozó intenzitáseredményekre számolva a Fleiss-féle kapp = 0,45, amely közepes mértékű egyezésnek felel meg.

Megbeszélés

A COVID-19-pandémia kezdete óta számos esetben merült fel az igény a kórokozó, a SARS-CoV-2 kimutatására [3–5, 7, 10, 11]. Ennek széleskörűen használt kivitelezési módja az RT-PCR-reakció, melyet a leggyakrabban az orr-garat területéről vett mintákban használnak a vírusnukleinsav szekvenciájának detektálására. Ezen módszer azonban nem ad felvilágosítást arról, hogy milyen sejtekben történik a vírusreplikáció, illetve mely sejtek tartalmazzák a vírusfehérje vagy -nukleinsav komponenseit. Ennek igénye és szükségessége a boncolások, valamint ritkábban a biopsziás és műtéti anyagok vizsgálata során merülhet fel, és a kimutatás eredménye megválaszolhatja, hogy a sejt- és szövetkárosodás a vírus közvetlen hatásának vagy – közvetett módon – egyéb tényezők közrejátszásának a következménye-e.

Számos közlemény számol be – elsősorban boncolási anyagban – a SARS-CoV-2 immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációval történő kimutatásáról, beleértve saját közleményeinket is [4, 9–11, 15, 24]. A SARS-CoV-2 tüske- és nukleokapszid-fehérjei kimutathatók a tüdő 2-es típusú pneumocytáiban, a levált alveolaris hámsejtekben, endothel- és egyéb érfali sejtekben, a hialin-

membránban, valamint az orr, a garat és a hörgők sejteiben [4, 10, 11, 15, 25–27]. Kérdésként merül fel azonban, hogy a vírus extrapulmonalisán is kimutatható-e, és az egyéb szervekben észlelhető károsodások a vírus közvetlen citopatogén hatásával vagy indirekt tényezőkkel, így a keringésben és a szövetekben emelkedett citokinhatással, oxigénhiánnyal, a kezelés során alkalmazott gyógyszerhatással, vagy a beteg esetleges egyéb társbetegségével függenek-e össze.

Több közlemény számol be a SARS-CoV-2 kimutatásáról extrapulmonalisán, így a szívben, a májban, a vesében, a központi idegrendszerben, az endokrin szervekben stb. [4, 12–18, 28]. Ezen vizsgálatokban az immunhisztokémiai reakciók mellett többnyire elvégezték a vírus-RNS szekvenciáinak kimutatását célzó PCR-reakciót és *in situ* hibridizációt is a mintákban [10, 15]. COVID-19-ben megbetegedett és elhunyt várandósok placentáiban is detektálták a SARS-CoV-2-t, fontos azonban megjegyezni, hogy az újszülöttek csak ritkán fertőződtek meg az anya és a placenta fertőzöttsége ellenére, azaz az anya–magzat vertikális vírustranszmisszió viszonylag ritkán fordult elő, bár néha észlelhető volt [29, 30].

Mindezen adatok szükségessé teszik, hogy COVID-19-ben elhunytak és megbetegedettek esetében törekedjünk a SARS-CoV-2 kimutatására a megbetegedett szervekben. A világszerte igen nagy számú ez irányú vizsgálatban számos antitestet használtak a vírus tüske- és nukleokapszid-fehérjeinek *in situ* kimutatására, különböző módszerekkel. Részben ezzel is magyarázható, hogy eltérő észleléseket és következtetéseket olvashatunk a vírus jelenlétére vonatkozóan a különböző sejtekben és szövetekben. Egyesek nem mutattak ki víruskomponenseket a placentában, míg mások – így magunk is – detektáltuk azt [29, 31–33].

Ugyancsak vitatott, hogy az endothelsejtekben történik-e vírusreplikáció, és a vírus jelen van-e ezen sejtekben [34, 35]. Nem egyértelmű, hogy a fertőzést követően milyen hosszú ideig van jelen a vírus a fertőzöttekben, milyen sejtekben, illetve hány nappal a halál után mutatható ki biztonsággal az egyes szervekben. Magunk korábbi vizsgálatainkban 10 nappal a halál után végzett boncolás során is detektáltuk a SARS-CoV-2-antigént a fertőzöttek tüdőszövetében [4].

A jelen tanulmányban igyekeztünk a legmegfelelőbb immunhisztokémiai reakciót kiválasztani, elsősorban a SARS-CoV-2-tüske- és -nukleokapszid-ellenes elsődleges antitestekre vonatkozóan. Ennek, valamint a lehető legmagasabb hígítást elérő, legkevesebb háttérrel rendelkező antitesteknek a kiválasztása volt a cél a négy egyetemi laboratóriumban végzett vizsgálatok összehasonlítása során. Az immunhisztokémiai reakciókat azonos kódolt mintákon, igazoltan vírust tartalmazó, illetve azt biztosan nem tartalmazó, negatív szövetben vizsgáltuk, és a digitalizált képeken anonim módon értékeltük. A vizsgálatba bekerült pozitív és negatív minták számát csak a szervező intézet egyik – az értékelésben részt nem vevő – munka-

1. melléklet A négy vizsgálóhelyen (A–D) végzett immunhisztokémiai reakciók szemi kvantitatív értékelése

A vizsgálóhely kódja	Az antitest kódja	Hígítás	A minta kódja	1. értékelő		2. értékelő		3. értékelő		4. értékelő		Összeg	
				INTENZITÁS [0–3]	HÁTTÉR [0–3]	INTENZITÁS [0–3]	HÁTTÉR [0–3]	INTENZITÁS [0–3]	HÁTTÉR [0–3]	INTENZITÁS [0–3]	HÁTTÉR [0–3]	INTENZITÁS [0–12]	HÁTTÉR [0–12]
A	NP 1	1000	PLACENTA 1	3	0	3	1	3	1	3	0	12	2
	SPIKE 1	200	PLACENTA 1	3	0	2	0	2	0	2	0	9	0
	NP 1	1000	TÜDŐ 1	3	0	3	0	3	0	3	1	12	1
	SPIKE 1	200	TÜDŐ 1	3	0	3	0	3	0	3	0	12	0
	NP 1	1000	TÜDŐ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SPIKE 1	200	TÜDŐ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NP 1	1000	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	2	0	11	0
	SPIKE 1	200	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	12	0
	NP 1	1000	TÜDŐ 4	3	1	3	1	3	1	2	1	11	4
	SPIKE 1	200	TÜDŐ 4	3	0	3	0	3	0	2	0	11	0
	NP 1	1000	PLACENTA 1	3	0	3	0	3	1	3	0	12	1
	NP 2	100	PLACENTA 1	2	0	3	0	3	0	3	0	11	0
	SPIKE 2	2000	PLACENTA 1	2	1	2	1	2	1	2	1	8	4
	SPIKE 1	500	PLACENTA 1	3	0	3	0	3	0	3	0	12	0
	SPIKE 3	500	PLACENTA 1	3	1	2	1	2	1	3	0	10	3
	B	NP 1	1000	TÜDŐ 1	3	0	3	0	3	0	3	0	12
NP 2		100	TÜDŐ 1	2	1	3	1	3	1	1	1	9	4
SPIKE 2		2000	TÜDŐ 1	1	2	1	0	1	0	1	0	4	2
SPIKE 1		500	TÜDŐ 1	3	0	3	0	3	0	3	0	12	0
SPIKE 3		500	TÜDŐ 1	2	2	1	1	2	1	1	1	6	5
NP 1		1000	TÜDŐ 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
NP 2		100	TÜDŐ 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
SPIKE 2		2000	TÜDŐ 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
SPIKE 1		500	TÜDŐ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SPIKE 3		500	TÜDŐ 2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	7
NP 1		1000	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	12	0
NP 2		100	TÜDŐ 3	1	1	2	1	2	1	1	1	6	3
SPIKE 2		2000	TÜDŐ 3	1	1	2	0	2	0	1	0	6	1
SPIKE 1		500	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	12	0
SPIKE 3		500	TÜDŐ 3	2	0	2	1	2	1	2	1	8	3

1. melléklet folyt.

A vizsgáló-hely kódja	Az antitest kódja	Hígítás	A minta kódja	1. értékelő		2. értékelő		3. értékelő		4. értékelő		Összeg		
				INTENZITÁS [0-3]	HÁTTÉR [0-3]	INTENZITÁS [0-3]	HÁTTÉR [0-3]	INTENZITÁS [0-3]	HÁTTÉR [0-3]	INTENZITÁS [0-3]	HÁTTÉR [0-3]	INTENZITÁS [0-12]	HÁTTÉR [0-12]	
C	NP 1	1000	TÜDŐ 4	3	1	3	2	3	1	3	3	2	12	6
	NP 2	100	TÜDŐ 4	1	1	2	0	2	0	0	0	1	5	2
	SPIKE 2	2000	TÜDŐ 4	1	1	2	1	2	0	0	1	1	5	3
	SPIKE 1	500	TÜDŐ 4	1	0	3	0	3	0	3	1	0	8	0
	SPIKE 3	500	TÜDŐ 4	0	1	3	1	3	1	1	1	1	7	4
	NP 1	1000	PLACENTA 1	3	1	3	1	3	0	3	0	0	12	2
	SPIKE 1	250	PLACENTA 1	3	1	3	0	3	0	3	0	0	12	1
	SPIKE 1	500	PLACENTA 1	3	0	3	0	2	0	3	0	0	11	0
	NP 1	1000	TÜDŐ 1	3	1	3	1	3	1	3	0	0	12	3
	SPIKE 1	250	TÜDŐ 1	2	1	3	1	3	1	3	0	0	11	3
	SPIKE 1	500	TÜDŐ 1	2	1	3	1	2	1	3	0	0	10	3
	NP 1	1000	TÜDŐ 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	SPIKE 1	250	TÜDŐ 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	SPIKE 1	500	TÜDŐ 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	D	NP 1	1000	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	12
SPIKE 1		250	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	12	0
SPIKE 1		500	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	12	0
NP 1		1000	TÜDŐ 4	3	1	3	1	3	1	1	1	2	10	5
SPIKE 1		250	TÜDŐ 4	3	0	3	1	3	1	3	0	0	12	2
SPIKE 1		500	TÜDŐ 4	3	0	3	0	2	0	2	0	0	10	0
NP 1		1000	PLACENTA 1	3	1	3	1	3	0	3	0	0	12	2
SPIKE 1		500	PLACENTA 1	3	0	2	0	2	0	2	0	0	9	0
NP 1		1000	TÜDŐ 1	3	0	3	0	3	0	3	0	0	12	0
SPIKE 1		500	TÜDŐ 1	3	0	2	0	2	0	1	0	0	8	0
NP 1		1000	TÜDŐ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SPIKE 1		500	TÜDŐ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NP 1		1000	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	12	0
SPIKE 1		500	TÜDŐ 3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	12	0
NP 1		1000	TÜDŐ 4	3	1	3	1	3	1	3	2	2	12	6
SPIKE 1	500	TÜDŐ 4	3	0	2	0	2	0	2	0	0	10	0	

társa ismerte, és a jelölést az asszisztensek végezték. A négy laboratóriumban végzett összehasonlító vizsgálat eredményeként megjelöltük a leginkább megbízható, reprodukálható eredményt adó antitesteket a SARS-CoV-2 tüske- és nukleokapszid-fehérjéinek detektálására. Az összehasonlító vizsgálat eredményének értéke, hogy azok a patológiai laboratóriumokban kiterjedten használt immunautomaták segítségével, a gyártói utasítások figyelembevételével történtek, és az eredményt a négy részt vevő intézet anonim módon értékelte. A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a SARS-CoV-2 egyes komponensei, így a tüske- és nukleokapszid-fehérjék a jelzett primer antitestekkel (NP 1, SPIKE 1) megbízhatóan kimutathatók az FFPE-anyagokban, így alkalmazásuk a megadott hígításokban javasolható.

Anyagi támogatás: A munka az Emberi Erőforrások Minisztériuma (EMMI) I/82-5/2022/EKF számú és a 30. számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA-30 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Szerzői munkamegosztás: K. E., K. A., M. G., S. Zs., T. L.: A projekt értelmi szerzői, helyi irányítói, a közlemény megírói. A szerzők, az első szerző kivételével, betűrendben kerültek felsorolásra. P. A. PhD-hallgató: A körvizsgálat szervezése, az anyagok kiválasztása, a statisztika elkészítése, az irodalom áttekintése. L. G., J. P., Gy. Cs., K. L.: Az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezése, értékelése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik a kéziratral kapcsolatban.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondunk a szerzők között nem szereplő, a munkát segítő munkatársaknak, így *Barbai Tamás dr.* (Budapest), *Beke Livia* (Debrecen) és *Daru Krisztián* (Szeged) kollegáknak.

Irodalom

- [1] Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020; 91: 157–160.
- [2] Bryce C, Grimes Z, Pujadas E, et al. Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. *Mod Pathol.* 2021; 34: 1456–1467.
- [3] Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20: 1135–1140.
- [4] Danics K, Pesti A, Törő K, et al. A COVID-19-association-dependent categorization of death causes in 100 autopsy cases. *Geroscience* 2021; 43: 2265–2287.
- [5] Edler C, Schröder A S, Aepfelbacher M, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection – an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med.* 2020; 134: 1275–1284. Erratum: *Int J Legal Med.* 2020; 134: 1977.
- [6] Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; 382: 1708–1720.
- [7] Lax SF, Skok K, Zechner P, et al. Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome: results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series. *Ann Intern Med.* 2020; 173: 350–361.
- [8] Merkely B, Szabó AJ, Kosztin A, et al. Novel coronavirus epidemic in the Hungarian population, a cross-sectional nationwide survey to support the exit policy in Hungary. *Geroscience* 2020; 42: 1063–1074.
- [9] Schaff Z, Danics K, Pesti A, et al. Cause of death in SARS-CoV-2 infection: viral infection or other chronic diseases with SARS-CoV-2 (death “in” or “with” COVID-19). [A COVID-19 patológiája: Halálok SARS-CoV-2-fertőzésben: vírushirtőzésben vagy vírushirtőzéssel?] *Scientia et Securitas* 2021; 2: 94–99. [Hungarian]
- [10] Székely L, Bozóky B, Bendek M, et al. Pulmonary stromal expansion and intra-alveolar coagulation are primary causes of COVID-19 death. *Heliyon* 2021; 7: e07134.
- [11] Zombori T, Kuthi L, Hortobágyi T, et al. “Dum spiro spero”: clinicopathologic characteristics of SARS-CoV-2 infection. [„Dum spiro spero”: a SARS-CoV-2-fertőzés klinikopatológiája 26 eset kapcsán.] *Orv Hetil.* 2021; 162: 1791–1802. [Hungarian]
- [12] Bearse M, Hung YP, Krauson AJ, et al. Factors associated with myocardial SARS-CoV-2 infection, myocarditis, and cardiac inflammation in patients with COVID-19. *Mod Pathol.* 2021; 34: 1345–1357.
- [13] Benedetti C, Waldman M, Zaza G, et al. COVID-19 and the kidneys: an update. *Front Med (Lausanne)* 2020; 7: 423.
- [14] Dhama K, Khan S, Tiwari R, et al. Coronavirus disease 2019-COVID-19. *Clin Microbiol Rev.* 2020; 33: e00028-20.
- [15] Fassin M, Mescoli C, Sbaraglia M, et al. Liver histopathology in COVID-19 patients: a mono-institutional series of liver biopsies and autopsy specimens. *Pathol Res Pract.* 2021; 221: 153451.
- [16] Kawakami R, Sakamoto A, Kawai K, et al. Pathological evidence for SARS-CoV-2 as a cause of myocarditis: JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol.* 2021; 77: 314–325.
- [17] Lopes-Pacheco M, Silva PL, Cruz FF, et al. Pathogenesis of multiple organ injury in COVID-19 and potential therapeutic strategies. *Front Physiol.* 2021; 12: 593223.
- [18] Marjot T, Webb GJ, Barritt AS 4th, et al. COVID-19 and liver disease: mechanistic and clinical perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021; 18: 348–364.
- [19] Hussman JP. Severe clinical worsening in COVID-19 and potential mechanisms of immune-enhanced disease. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 637642.
- [20] Idalsoaga F, Ayares G, Arab JP, et al. COVID-19 and indirect liver injury: a narrative synthesis of the evidence. *J Clin Transl Hepatol.* 2021; 9: 760–768.
- [21] Satturwar S, Fowkes M, Farver C, et al. Postmortem findings associated with SARS-CoV-2: systematic review and meta-analysis. *Am J Surg Pathol.* 2021; 45: 587–603.
- [22] Fleiss JL. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol Bull.* 1971; 76: 378–382.
- [23] Friedman M. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J Am Stat Assoc.* 1937; 32: 675–701.
- [24] Bradley BT, Maioli H, Johnston R, et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet* 2020; 396: 320–332. [Erratum: *Lancet.* 2020; 396: 312.]
- [25] Borczuk AC, Salvatore SP, Seshan SV, et al. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. *Mod Pathol.* 2020; 33: 2156–2168.

- [26] Bussani R, Schneider E, Zentilin L, et al. Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBioMedicine* 2020; 61: 103104.
- [27] Schaefer IM, Padera RF, Solomon IH, et al. *In situ* detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19. *Mod Pathol.* 2020; 33: 2104–2114.
- [28] Aschman T, Schneider J, Greuel S, et al. Association between SARS-CoV-2 infection and immune-mediated myopathy in patients who have died. *JAMA Neurol.* 2021; 78: 948–960.
- [29] Hosier H, Farhadian SF, Morotti RA, et al. SARS-CoV-2 infection of the placenta. *J Clin Invest.* 2020; 130: 4947–4953.
- [30] Patanè L, Morotti D, Giunta MR, et al. Vertical transmission of coronavirus disease 2019: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA on the fetal side of the placenta in pregnancies with coronavirus disease 2019-positive mothers and neonates at birth. *Am J Obstet Gynecol MFM* 2020; 2: 100145.
- [31] Chen H, Guo J, Wang C, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet* 2020; 395: 809–815. [Erratum: *Lancet* 2020; 395: 1038.]
- [32] Fan C, Lei D, Fang C, et al. Perinatal transmission of 2019 coronavirus disease-associated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: should we worry? *Clin Infect Dis.* 2021; 72: 862–864. [Erratum: *Clin Infect Dis.* 2021; 72: 910.]
- [33] Mulvey JJ, Magro CM, Ma LX, et al. Analysis of complement deposition and viral RNA in placentas of COVID-19 patients. *Ann Diagn Pathol.* 2020; 46: 151530.
- [34] Bernard I, Limonta D, Mahal LK, et al. Endothelium infection and dysregulation by SARS-CoV-2: evidence and caveats in COVID-19. *Viruses* 2020; 13: 29.
- [35] Chilosi M, Poletti V, Ravaglia C, et al. The pathogenic role of epithelial and endothelial cells in early-phase COVID-19 pneumonia: victims and partners in crime. *Mod Pathol.* 2021; 34: 1444–1455.

(Schaff Zsuzsa dr.,
Budapest, Üllői út 93., 1091
e-mail: schaff.zsuzsa@med.semmelweis-univ.hu)



Szíves figyelmükbe ajánljuk a Magyar Személyre Szabott Medicina Társaság XII.,
immár hagyományosnak tekinthető konferenciáját.

A kétnapos konferencia témái arra fókuszálnak, hogy miként működik
a személyre szabott orvoslás a „big data” és a „real world evidencia” korában
és ennek milyen gyakorlati kihatása van az orvoslás mindennapjaiban.

Helyszín: Abacus Business and Wellness Hotel
2053 Herceghalom, Gesztenyés út 3.

Időpont: 2022. augusztus 26–27.

A konferencia OFTEX-GYOFTEX pontértéke: 32 pont

További részletek: www.mszmt.hu

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)