



UNIVERSITATEA  
LUCIAN BLAGA  
— DIN SIBIU —



Școala doctorală de medicină

Domeniul de doctorat: Medicină

## TEZĂ DE DOCTORAT

**Modificările histopatologice și analiza  
imunohistochimică și moleculară a infecției  
cu virusul SARS-CoV-2**

Doctorand:  
**GEORGE-CĂLIN, OPRINCA**

Conducător de doctorat:  
**Prof. Univ. Dr. MANUELA, MIHALACHE**



# CUPRINS



INTRODUCERE .....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII .....	2
1. NOȚIUNI FUNDAMENTALE DE VIRUSOLOGIE .....	2
1.1. SCURT ISTORIC AL VIRUSOLOGIEI MODERNE .....	2
1.2. BIOMASA VIRALĂ: DE LA GENOMUL VIRAL ANTIC, LA VIRUSURI SIMBIOTICE ȘI VIRUSURI PATOGENE .....	3
1.3. STRUCTURA MORFOLOGICĂ VIRALĂ .....	3
2. RĂSPUNSUL IMUN AL GAZDEI ÎN INFECȚIILE VIRALE .....	5
2.1. BARIERELE CHIMICE ȘI ANATOMICE .....	5
2.2. IMUNITATEA INTRINSECĂ .....	6
2.3. IMUNITATEA ÎNNĂSCUTĂ .....	7
2.4. IMUNITATEA DOBÂNDITĂ .....	9
3. VIRUSUL SARS-CoV-2: ASPECTE VIRUSOLOGICE .....	10
3.1. CONSIDERENTE GENERALE .....	10
3.2. STRUCTURA VIRIONULUI .....	11
3.3. ORGANIZAREA ȘI STRUCTURA GENOMULUI VIRAL .....	12
3.4. CICLUL DE REPLICARE VIRALĂ .....	13
CERCETARE PERSONALĂ .....	14
1. INTRODUCERE .....	14
2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII .....	15
3. MATERIAL ȘI METODĂ .....	16
3.1. SELECȚIA CAZURILOR .....	16
3.2. AUTOPSIA .....	16
3.3. PRELEVAREA MATERIALULUI TISULAR .....	16
3.4. PREGĂTIREA LAMELOR HISTOPATOLOGICE .....	17
3.5. PREGĂTIREA LAMELOR DE IMUNOHISTOCHEMIE .....	17
3.6. EXAMINAREA RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION) .....	18
3.7. DIGITALIZAREA LAMELOR MICROSCOPICE .....	18
3.8. DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC .....	18
3.9. ANALIZA REZULTATELOR .....	19
4. REZULTATE .....	19
4.1. DATE DE ORDIN GENERAL AL LOTULUI DE STUDIU .....	19
4.2. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ PULMONARĂ .....	20
4.3. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ CARDIACĂ .....	26

4.4.	EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ RENALĂ .....	29
4.5.	EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ HEPATICĂ .....	30
4.6.	EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ SPLENICĂ .....	32
4.7.	EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ INTESTINALĂ .....	33
4.8.	EXAMINĂRI MOLECULARE ÎN VEDEREA DETECȚIEI GENOMULUI VIRAL .....	34
4.9.	EXAMINAREA IMUNOHISTOCHEMICALĂ ÎN VEDEREA DETECȚIEI NUCLEOCAPSIDEI VIRALE .....	40
4.10.	ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ, IMUNOHISTOCHEMICALĂ ȘI MOLECULARĂ LA FEȚII MORȚI ANTE-PARTUM PROVENIȚI DE LA MAME CU INFECȚIE COVID-19.....	50
5.	DISCUȚII.....	50
6.	CONCLUZII .....	57
7.	ELEMENTE DE ORIGINALITATE .....	60
8.	LIMITE ALE CERCETĂRII .....	61
9.	DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE.....	61
	BIBLIOGRAFIE .....	62



# INTRODUCERE

Având în vedere contextul pandemic din anii precedenți și lupta continuă a autorităților de la nivel global cu noul coronavirus, încercând prin metode științifice deslușirea interacțiunii acestui virus cu corpul uman, este de maximă importanță cercetarea tuturor modificărilor pe care acest virus reușește să le producă la nivel tisular.

Printr-o analiză detaliată a modificărilor macroscopice obținute în urma autopsiilor, a modificărilor microscopice ale țesuturilor prelevate, precum și a interacțiunilor imunologice evidențiate prin tehnici imunohistochimice, lucrarea de față este o piesă de puzzle în lumea științifică, contribuind la înțelegerea vidului creat de această pandemie ce a surprins întreaga omenire. Amprenta microscopică a unui microorganism, precum și modalitatea de interacțiune cu fiecare celulă gazdă, pot dezvălui toate armele pe care acesta le deține și de care se poate folosi în crearea unor daune ireversibile la nivel tisular. De asemenea, cunoașterea cu exactitate a unui microorganism poate dezvălui până și armele ascunse prin care reușește să activeze mecanismele de evaziune imunologică, putând astfel să comparăm acest virus un „asasin din umbră.” Toate aceste „arme” ale virusului pot fi dezvăluite prin analize de nouă generație (imunohistochimie și analize moleculare).

Chiar dacă pandemia a ajuns la final, virusul încă este activ în populația generală și, cu toate că agresivitatea lui față de gazda umană este mult diminuată în prezent, în multe cazuri conduce la deces, în special în cazul persoanelor cu comorbidități. Odată cu trecerea anilor, s-a născut și conceptul de „long-COVID” ce se caracterizează prin persistența unor simptomatologii la unii pacienți infectați în trecut cu virusul SARS-CoV-2. Având în vedere că infectarea cu virusul sus-menționat a avut și încă are un impact la nivelul populației, ne dorim să identificăm modificările pe care acest agent patogen le produce la nivel celular, în încercarea de a răspunde la nevoile lumii medicale de a găsi noi arme în lupta cu virusul SARS-CoV-2.

## 1. NOȚIUNI FUNDAMENTALE DE VIRUSOLOGIE

### 1.1. SCURT ISTORIC AL VIRUSOLOGIEI MODERNE

Teoria microbiană a avut bazele conceptuale încă din secolul al XIX-lea, sub cercetările anatomistului Jacob Henle, care a descris pentru prima dată etiologia unor boli ca fiind cauzate de microorganisme prea mici pentru a putea fi observate la microscopul optic. [1] Cu toate acestea, a fost nevoie de cercetările lui Louis Pasteur și Robert Koch, de la sfârșitul anilor 1800, pentru ca teoria microbiană să fie general acceptată. Pasteur a făcut mari progrese prin analiza fermentației datorate diferitelor microorganisme, iar Robert Koch, tatăl mediilor de cultură solide, a fost primul care a descris agentul etiologic al antraxului, respectiv, al tuberculozei și care a compus un postulat ce reprezintă fundația microbiologiei moderne în care stipulează că: a) microorganismul trebuie să fie observat constant în leziune; b) trebuie să fie izolat în cultură pură; c) inocularea microorganismului într-o nouă gazdă trebuie să declanșeze boala; d) microorganismul trebuie să fie izolat din nou de la nivelul ultimei gazde. De altfel, descoperirea anumitor boli ce prezentau dovezi clare cu privire la etiologia infecțioasă, dar care dărau această structură de rezistență a teoriei microbiene descrise de Koch, a condus la evidențierea unui microorganism nou, de multe ori mult mai primejdios. [1]

Dimitri Iwanowsky a reușit să descopere, prin studierea bolii mozaicizmului frunzelor de tabac, că afecțiunea era cauzată de un agent patogen care reușea să treacă prin sistemul de filtrare de porțelan (filtrul Chamberlain) și nu se supunea legilor postulatului lui Koch, iar, prin repetarea experimentului de către Martinus Beijerinck, acesta din urmă a fost convins că are de-a face cu un agent patogen diferit față de bacterie, definindu-l *contagium vivium fluidum*. [3]

## **1.2. BIOMASA VIRALĂ: DE LA GENOMUL VIRAL ANTIC, LA VIRUSURI SIMBIOTICE ȘI VIRUSURI PATOGENE**

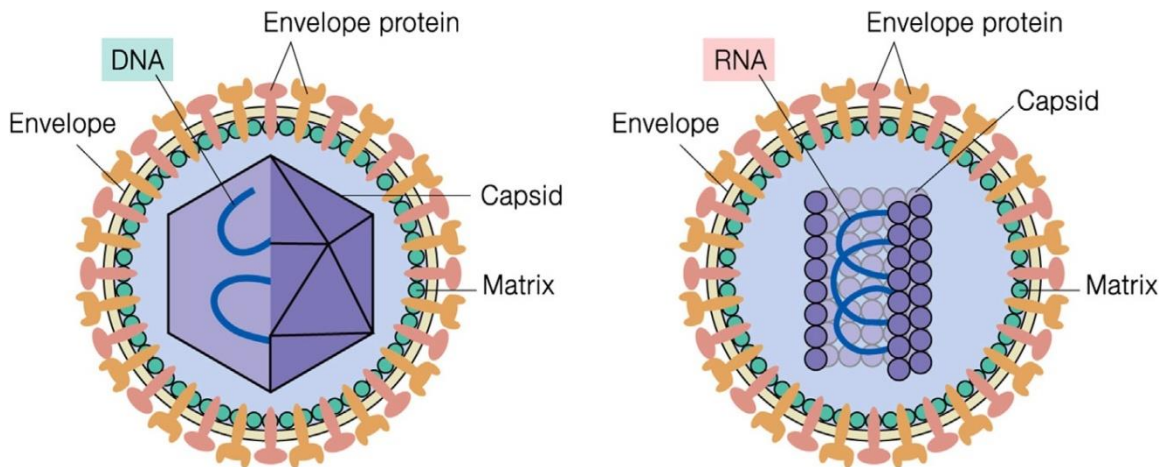
Noțiunea de virus provine din cuvântul latin „virus” care înseamnă „otravă” și reprezintă o nanoparticulă sau, mai bine zis, o structură moleculară compusă, incapabilă să se reproducă, necesitând să invadeze, să paraziteze și să preia controlul subunităților unei celule vii pentru a se multiplica. Biomasa virală este alcătuită din numeroase populații virale, majoritatea fiind inofensive pentru organismele vii, trăind într-o simbioză cu celula gazdă. Deși dacă puține la număr, unele virusuri sunt patogene, producând un spectru patologic ce se întinde de la infecții ușoare, chiar asimptomatice, până la infecții agresive, invalidante și chiar mortale. Pe lângă virusurile active atât patogene cât și cele aflate în simbioză cu celula gazdă, s-au descoperit și virusuri dormante sau chiar rămășițele genomice ale unor virusuri antice ce s-au integrat în genomul gazdă cu mult timp înainte. [4]

## **1.3. STRUCTURA MORFOLOGICĂ VIRALĂ**

Particulele virale pot fi definite ca fiind transportori de material genetic viral, o mașinărie biologică ce poate să pătrundă în celula gazdă, să-i preia parte din funcție, să se reproducă, să evadeze din celula infectată și să supraviețuiască extracelular până la următoarea „invazie”, când ciclul viral se reia [1].

Structural, o particulă virală este formată din materialul genetic viral aflat sub formă de ADN sau ARN în reprezentări variabile, înconjurat aproape întodeauna de subunități proteice care sunt lanțuri proteice pliate ce formează unități structurale asimetrice din care rezultă capsida sau nucleocapsida virală. Unele virusuri prezintă o carcasă externă lipidică numită anvelopă virală de care sunt legați receptori de suprafață cu rol major în mecanismele de adeziune și penetrare în celula gazdă. Când vorbim de nucleocapsidă facem referire la virusurile anvelopate în care capsida are rol subunitar, învelind materialul genetic fără contact direct cu mediul extraviral. Particulele virale sunt întodeauna metastabile, aflate sub formă stabilă în afara celulei gazdă, dar care trebuie să treacă într-o formă instabilă la poarta de intrare celulară pentru a fi dezasamblată [5].





**Figura 1.** Exemplu de structură morfologică virală. [2]

Fiecare moleculă de acid nucleic poate fi monocatenară sau dublu catenară. Pe baza acestui principiu un virus poate fi de tip ADN conținând material genetic fie monocatenar (ssDNA), fie dublu catenar (dsDNA) sau poate fi de tip ARN monocatenar (ssRNA) sau dublucatenar (dsRNA) [4]. Clasificarea Baltimore subgrupează virusurile pe baza materialului genetic în șapte clase și anume: dsDNA (ADN dublu catenar), ssDNA (ADN monocatenar), dsRNA (ARN dublu catenar), ss(-)RNA (ARN monocatenar în sens negativ, ss(+)RNA (ARN monocatenar în sens pozitiv, ssRNA cu ADN intermediar atașat și dsDNA cu ARN intermediar atașat, așa numitul „gapped DNA”. [6]

Capsida este constituită din mai multe copii ale aceleiași proteine, formând un complex menit să protejeze materialul genetic viral atât de factorii de mediu externi cât și de sistemul imunitar al celulei gazdă. Această structură proteică este codată de o singură secvență relativ scurtă din genomul viral, dar care poate încapsula un număr mare de acizi nucleici. De altfel, acest lucru este benefic pentru micororganism deoarece eliberează virusul de sarcina de a coda o proteină cu structură moleculară mare, dar generează dificultatea de asamblare a multiplelor subunități proteice [7].

Anvelopa virală nu are o prezență constantă la toate tipurile virale; aceasta este o membrană externă, o capsulă, menită să protejeze conținutul genetic viral și nucleocapsida (fie helicoidală, fie icosaedrică) și este formată dintr-un dublu strat lipidic ce derivă din celula gazdă. Genomul viral este incapabil să codeze informația necesară dezvoltării aparatului de sintetizare lipidică așa că virionul nou format de către celula gazdă infectată își însușește fie parte din membrana

citoplasmatică, membrana nucleară, a aparatului Golgi sau a reticulului endoplasmatic pentru a forma anvelopa virală.

Pentru ca un virus să fie activ este necesar ca acesta să prezinte, pe suprafața sa, glicoproteine de adeziune, fuziune și penetrare celulară. În unele cazuri, un singur tip de glicoproteină poate prezenta toate cele trei funcții combinate, cum este hemaglutinina (HA) virusului gripal. Alte funcții ale glicoproteinelor sunt de distrucție a receptorilor celulari după adeziune sau de mediere a evaziunii imune. [13]

Pe lângă structurile principale enumerate mai sus, o particulă virală poate să mai conțină și alte proteine cum ar fi enzime: polimerază, integrază, proteaze, topoizomeraze sau chiar și componente celulare ca ARN de transfer (tRNA), lipide sau histone.

## **2. RĂSPUNSUL IMUN AL GAZDEI ÎN INFECȚIILE VIRALE**

### **2.1. BARIERELE CHIMICE ȘI ANATOMICE**

Epiteliul pseudostratificat al mucoasei bronhiilor nu este expus doar la agenți microbiologici patogeni, ci și la particule toxice prezente în aerul inspirat. Din acest considerent, pe lângă celulele columnare, epiteliul mai conține și celule caliciforme care, împreună cu epiteliul glandular din submucoasă, secretă mucus, un fluid ce conține mucine formatoare de gel, dar și molecule antimicrobiene, antiproteaze, antioxidanți, formând o adevărată barieră chimică. Prin prezența mucinelor oligomerice MUC5AC și MUC5B, agenții patogeni și particulele străine sunt captate și inactivate, apoi eliminate prin intermediul aparatului ciliar. [16] La nivel alveolar, tapetul peretelui intern este format din două clase celulare: celule alveolare de tip I (ATI) și celule alveolare de tip II (ATII); primele câștigă detașat ca și răspândire, iar celulele alveolare de tip II (ATII), deși regăsite în număr redus, au rol major în defensiva locală antimicrobiană. Pe lângă faptul că secretă surfactant, necesar inflației alveolare, acestea au rol în regenerarea tisulară, în echilibrul fluidelor, precum și în transportul trans-epitelial de ioni. [17]

La nivel intestinal, mucoasa este tapetată de un epiteliu cilindric simplu format din mai multe subtipuri celulare, printre care celule M, celule caliciforme, celule Paneth, celule enterocromafine și celule columnare. Acest epiteliu preia funcția de barieră fizică ce separă mediul extern intraluminal de peretele intestinal, dar de multe ori se dovedește că această barieră este inefficientă. Pentru creșterea nivelului de protecție și la acest nivel, ca și în cazul epiteliului bronșic,

există o secreție de mucus constituit din numeroase molecule bioactive, mucine, glicoproteine, peptide antimicrobiene și imunoglobuline A. Datorită populării tractului digestiv cu numeroase bacterii comensale ce trăiesc în simbioză cu organismul gazdă, această barieră fizico-chimică capătă un statut special. Este necesară o interacțiune constantă și o colaborare strânsă între flora bacteriană saprofită, celulele epitelului intestinal și celulele imune locale în vederea menținerii homeostaziei.

## 2.2. IMUNITATEA INTRINSECĂ

Primele structuri evolute în cadrul acestui tip de imunitate se află sub coordonarea interferenței ARN-mediată (RNAi) și a secvențelor CRISPR (Grupări Palindromice Interspațiale Scurte Regulate). ARN-ul de interferență (RNAi) este mecanismul predominant de defensivă antivirală în plante și nevertebrate, dar acesta se poate observa și în cazul vertebratelor. Infecțiile cu virusuri ARN produc, la nivel celular, fragmente lungi de ARN dublu-catenar (dsRNA) care este diferit din punct de vedere structural de ARN-ul celulei gazdă, acesta fiind monocatenar, scurt.

Interferonii sunt o altă clasă de proteine cu rol în imunitatea intrinsecă, în sensul în care sunt puntea de legătură dintre imunitatea celulară autonomă și imunitatea înăscută. Aceștia fac parte din categoria citokinelor și sunt produși de celulele expuse la agentul patogen, iar caracteristica lor principală poate fi definită ca a unui sistem de alarmă biochimică. Există trei familii distincte de interferoni: tipul I format din INF- $\alpha$  (interferon alfa) și INF- $\beta$  (interferon beta), tipul II reprezentat de un singur membru și anume INF- $\gamma$  (interferon gamma), iar tipul III format din INF- $\lambda$  (interferon lambda) 1, 2, 3 și 4. [21]

Autofagia, un alt element cheie din cadrul imunității intrinseci reprezintă un mecanism de sechestrare și degradare lizozomală a unor structuri citoplasmice ce includ organite deteriorate sau microorganisme invadatoare. Autofagia se inițiază cu sechestrarea unei porțiuni din citoplasmă ce conține organite sau agenți patogeni, într-o veziculă cu dublă membrană, numită autofagozom. Ulterior, autofagozomul fuzionează cu lizozomii, formându-se autolizozomul, secundar conținutul acestuia fiind degradat. [23] Mecanismul care stă la baza autofagiei este reprezentat de *proteinele legate de autofagie* (atg-proteins). Proteinele-atg vizează toate stadiile de pătrundere, incluzând endozomul, de evaziune a virusurilor în citosol sau replicare în cadrul citosolului. [24]

Apoptoza sau moartea celulară programată are un rol vital în lupta împotriva agenților patogeni virali și se află la granița dintre imunitatea intrinsecă și cea adaptativă, sub stricta

coordonare atât a mecanismelor interne celulare, cât și a celulelor sistemului imunitar. Acestea fiind spuse, rezultă că apoptoza este declanșată prin două căi majore: o cale intrinsecă (coordonată de mașinăria genetică intracelulară) și o cale extrinsecă (coordonată de către sistemul imunitar), rolul central în ambele căi fiind reprezentat de caspazele apoptotice. [25]

### **2.3. IMUNITATEA ÎNNĂSCUTĂ**

Formarea complexului antigen-receptor conduce la eliberarea de citokine, în special interferoni, de la nivelul celulei surprinse de agentul patogen viral. Pentru a avea acest rezultat, complexul antigen-receptor activează anumite căi de semnalizare biochimică menite să conducă la descărcări masive de molecule cu rol de „alarmă” imunologică. După recunoașterea patternurilor moleculare asociate patogenilor (PAMPs) domeniul citoplasmatic TIR (receptori intercelulari Toll - Interleukina 1) recrutează adaptori de semnalizare MyD88 (răspuns primar al diferențierii mieloide 88), TIRAP (proteina adaptoare ce conține domeniul TIR), TRAM (molecula asociată receptorilor Toll) sau TRIF (domeniul TIR ce conține adaptorul inducției de interferon- $\beta$ ), apoi sunt recrutate și activate diverse kinaze de tipul IRAK1, IRAK2, IRAK4 (kinaze asociate receptorului interleukinei 1), TBK1 (kinaza de legare TANK), IKK1 (kinaza inhibitoare kappaB) sau ubiquitin-ligaze, cum ar fi TRAF6 (receptorul factorului de necroză tumorală asociat factorului 6) sau pellino1, necesare pentru transcripția genelor INF. [29,30]

Celulele dendritice fac parte din celulele sistemului imunitar înnăscut, dar ele sunt și veriga principală dintre imunitatea înnăscută și cea adaptativă. Aceste celule au o structură morfologică formată din numeroase prelungiri citoplasmatică ce le oferă aspectul dendritelor celulelor neuronale, de unde le și vine denumirea. Se găsesc în interstițiul fiecărui organ în afară de creier, dar și în sânge, limfonoduli, însă principala lor localizare este la nivelul mucoaselor, în imediata apropiere a epiteliiilor. De aici celulele dendritice își pot trimite prelungirile prin spațiul intercelular al celulelor epiteliale până la nivelul lumenului unde, prin intermediul numeroșilor receptori de suprafață, scanează zona pentru a detecta antigeni non-self. În momentul în care un antigen se leagă de un receptor de pe suprafața celulelor dendritice, acesta se activează și traversează țesutul până la nivelul vaselor limfatice, prin care migrează până la primul ganglion limfatic, în aria limfocitelor T pe care le activează folosind antigenul recoltat anterior. [5]

Celulele NK (natural killer) sunt limfocitele efectorii ale imunității înnăscute, celulele santinelă găsindu-se atât în țesuturile limfoide, cât și în cele nonlimfoide, iar scopul lor principal

este să distrugă celula infectată viral sau celula aflată într-o anumită suferință. Mecanismele reglatorii ale celulelor NK au ca fundație două tipuri de receptori: receptori activatori și receptori inhibitori. Receptorii activatori detectează prezența liganzilor pe suprafața celulelor aflate în suferință cum sunt liganzii induși de stres recunoscuți de către NKG2D (natural killer groups 2D), liganzi ai receptorului Toll-like sau liganzi infecțioși non-self. Celule NK exprimă totodată o afinitate scăzută pentru Fc (fragmentul cristalizabil) al receptorului CD16 (cluster de diferențiere 16) permițându-le detecția celulelor țintă acoperite de anticorpi și distrugerea lor prin citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi (ADCC). După cum le definește și denumirea, celulele NK sunt create pentru a distruge, iar sistemul lor de frânare este dependent de receptorii inhibitori, printre care observăm KIRs (receptori imunoglobulin-like ai celulelor killer) sau CD94-NKG2A heterodimeri. Capacitatea acestor receptori este de a detecta molecule MHC clasa I (complex major de histocompatibilitate clasa I) care sunt constant exprimate în celulele sănătoase. În cazul unei infecții virale, virusul inhibă producția MHC clasă I, iar celula NK nu mai poate fi oprită din a o distruge. Cu toate acestea, există virusuri care produc MHC clasă I ca mecanism de evaziune împotriva celulelor NK. [33]

Sistemul complement este format dintr-un grup heterogen de proteine ce fac parte din sistemul imunitar înăscut și care funcționează ca un sistem de supraveghere imunologică, cu răspuns rapid în cazul unei infecții. Calea de activare clasică este declanșată de anumite izotipuri ale anticorpilor de tipul IgM sau IgG legați de antigen. Calea de activare prin lectină este generată de PRR (receptori de recunoaștere a pattern-urilor), iar calea alternativă este activată de către hidroliza spontană a C3. Indiferent de calea de activare, efectele principale sunt: declanșarea sau susținerea inflamației, opsonizarea și liza directă celulară prin formarea complexului de atac al membranei.[34]

Neutrofilele sunt celule mici din rândul granulocitelor polimorfonucleare (cele mai numeroase dintre acestea) încadrate în acest fel datorită morfologiei nucleare bi sau trilobată și a numeroaselor granule enzimatică intracitoplasmatică. Migrarea lor pe câmpul de luptă se face indirect prin intermediul celulelor endoteliale, prin citokine cum sunt TNF (factorul de necroză tumorală) sau IL-1 $\beta$  (interleukina 1 beta) care stimulează celulele endoteliale să activeze moleculele de adeziune de care aderă neutrofilul, iar prin diapedeză acestea traversează bariera peretelui vascular și ajung la nivelul țesutului lezat. Un rol indirect al neutrofilului în infecțiile virale îl reprezintă secreția de citokine și chemokine care au rol major în activarea altor celule

imunologice și în susținerea inflamației. Un avantaj important al neutrofilelor pe câmpul de luptă îl reprezintă formarea NETs (capcane extracelulare ale neutrofilelor) care, conform ultimelor studii, pot capta inclusiv particule virale sau în orice caz încetinesc mobilizarea acestora. [35]

Combustibilii principali care antrenează imunitatea înăscută sunt citokinele care se eliberează în cantități mari în zonele lezate și care declanșează cele cinci semne celsiene: rubor, tumor, calor, dolor, functio lesa, dar care pot difuza în întreg organismul, producând simptome generale de tipul: febră, frison, astenie, artralgi, mialgi. Aceste citokine se împart în trei categorii: cele proinflamatorii de tipul IL-1, TNF, IL-6, IL-12, cele antiinflamatorii de tipul IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  (transforming growth factor) sau chemokine de tipul IL-8. [5]

#### **2.4. IMUNITATEA DOBÂNDITĂ**

Jucătorul cheie al imunității mediate celular este limfocitul T, iar procesul său de formare începe la nivelul măduvei osoase după care migrează la nivelul timusului pentru a trece prin numeroase procese de maturare, diferențiere și selecție. Producția limfocitelor T la nivelul timusului începe în fazele târzii ale dezvoltării embrionare și continuă până la pubertate. Genele care codifică lanțurile de receptori ale celulelor T (TCR) sunt formate în timocitele imature prin rearanjări constante și variabile ale segmentelor genice. Majoritatea limfocitelor T de la acest nivel vor exprima receptori  $\alpha\beta$  TCR, iar specificitatea clonelor limfocitelor T este de a recunoaște MHC (complex major de histocompatibilitate) clasa I sau clasa II. De-a lungul timpului, numeroase studii au identificat mai multe tipuri de limfocite T helper CD4<sup>+</sup> cum ar fi: T-helper 1 (Th1), T-helper 2 (Th2), T-helper 17 (Th17), T-helper foliculare (Tfh), T-reglatorii de tip 1 (Tr1), celule T-helper reglatorii induse (iTreg) sau celule T-helper 9 (Th9). Diferențierea lor este datorată unei rețele complexe de semnale citokinice și factori de transcripție specifice fiecărui tip, urmată de modificări epigenetice. [37]

Imunitatea umorală are un rol important atât în combaterea infecției virale acute, cât și în protecția organismului gazdă împotriva reinfecției cu același agent patogen, iar coordonatorul principal al acestui tip de imunitate este limfocitul B, coordonare mediată prin producția unor proteine speciale numite anticorpi. Limfocitul B este produs la nivelul măduvei hematogene iar, după maturare, se găsește în stare inactivă în aria foliculară a ganglionului limfatic. Activarea lui se face prin legarea unui antigen specific de receptorul celulei B (BCR). Este important de menționat faptul că limfocitul B poate recunoaște nu numai antigenul prezentat de către o celulă

prezentatoare de antigen, dar și antigenul solubil, iar întâlnirea între antigen și receptor se poate face atât în limfonodul cât și în splină. După activare, limfocitul B va procesa antigenul iar, la final, îl poate prezenta pe suprafața membranelor via MHC clasa II, exemplificând faptul că și celula B poate recruta limfocite T helper CD4<sup>+</sup> în lupta împotriva agentului patogen. [40]

Anticorpul, cea armă secretată a imunității mediate de limfocitul B, sunt molecule de natură proteică, cunoscute și cu denumirea de imunoglobuline. Structura clasică a acestor molecule este compusă din două lanțuri proteice ușoare și două lanțuri proteice grele, legate între ele prin punți disulfidice. Fiecare lanț conține regiuni constante (C<sub>H</sub> sau C<sub>L</sub>), nemodificabile și regiuni variabile, cu capacitate de modificare în timp (V<sub>H</sub> sau V<sub>L</sub>), ambele prezente la nivelul structurii Fab (antigen binding domain), iar la nivelul Fc (fragmentului cristalizabil) sunt prezente doar regiuni constante. Funcția Fab este de atașare efectivă a antigenului, iar Fc reprezintă regiunea de atașare pe receptorii membranari ai celulelor gazdă, cum ar fi macrofagele, dar și regiunea de legare a complementului.[5]

### **3. VIRUSUL SARS-CoV-2: ASPECTE VIRUSOLOGICE**

#### **3.1. CONSIDERENTE GENERALE**

Două caracteristici importante au fost descoperite în urma cercetărilor structurale. Virusul SARS-CoV-2 aparent este optimizat pentru a se lega de receptorii ACE2 (Angiotensin Conversion Enzyme 2), iar proteina Spike, folosită ca o cheie pentru a pătrunde în celula gazdă, are un sit de clivaj funcțional polibazic la nivel S1-S2 prin inserția a 12 nucleotide. Domeniul de legare de receptor (RBD) de la nivelul proteinei Spike reprezintă cea mai variabilă structură a genomului coronavirusului. Șase aminoacizi RBD au fost descoperiți ca având un rol critic în atașarea de receptorii ACE2, iar cinci dintre aceștia diferă în totalitate față de virusul precedent SARS-CoV. Cu toate că proteina Spike aderă cu afinitate înaltă de receptorii ACE2, analiza moleculară relevă faptul că această interacțiune nu este optimă, deci aceste modificări sunt, cel mai probabil, rezultatul selecției naturale, permițând, în timp, crearea altor soluții optime de atașare. [47] Tranziția virionului de la animal la om a avut ca stâlp de rezistență mutația rapidă a acestor șase aminoacizi de la nivelul RBD. Coronavirusul RaTG13 al liliacului potcoavă are o structură similară la nivel de nucleotide cu virusul SARS-CoV-2 într-o proporție de 96%, dar nu prezintă

niciuna din mutațiile celor șase aminoacizi, în schimb ele sunt identificate în probele obținute de la pangolin. Cu toate acestea, nu există elemente care să indice o recombinare genomică recentă. [48]

### **3.2. STRUCTURA VIRIONULUI**

Din punct de vedere structural, virusul SARS-CoV-2 are un diametru de circa 65-125 nm, încapsulat la exterior de o anvelopă pe suprafața căreia se observă numeroase glicoproteine numite proteine spike ce oferă aspectul virionului de coroană solară, iar genomul viral este format dintr-o singură catenă de ARN în sens pozitiv. Există patru componente structurale principale care formează particula virală: glicoproteina spike (S) pe care am amintit-o mai sus, glicoproteina membranară (M), glicoproteina anvelopei (E) și nucleocapsida (N), iar pe lângă acestea, mai sunt prezente și câteva proteine accesorii. [50]

Proteina S (spike) joacă un rol important în procesul de invazie celulară, fiind folosită efectiv în atașarea virionului de receptorii membranei celulare, în cazul virusului SARS-CoV-2 vorbind de receptorii ACE2 (receptorii enzimei de conversie a angiotensinei 2). Proteina spike este o glicoproteină membranară de tip I ce formează un trimer ancorat de anvelopa virală. După atașarea de receptorii ACE2 de pe celula gazdă, proteina suferă numeroase rearanjamente structurale pentru a permite fuziunea particulei virale și este puternic glicozilată, cu fiecare promotor conținând 22 de situri de glicozilare N-înlănțuite.

Proteina anvelopei (E) reprezintă o structură de o importanță considerabilă și un component cheie în faza de asamblare, evadare și virulență din ciclul reproductiv al virusului SARS-CoV-2. Este compusă din 75 de aminoacizi, deci este o proteină relativ mică, și conține două domenii distincte: un domeniu N-terminal transmembranar (TM) urmat de un domeniu C-terminal. Pe lângă rolul structural și de asamblare a virionului în coordonare cu proteina M, proteina E mediază și răspunsul imun al gazdei. [52] Fiind o proteină hidrofobă, aceasta oligomerizează în membrana celulei gazdă, formând pori hidrofilii care precipită remodelarea membranară și asamblarea virală. Coronavirusurile recombinare care se lipsesc de proteina E prezintă titruri scăzute și sunt incompetente din punct de vedere al propagării, demonstrând rolul crucial pe care îl deține această proteină structurală în procesul de replicare virală. [53]

Proteina M membranară reprezintă cea mai răspândită proteină de pe suprafața particulei virale, iar scopul ei principal este de a determina forma anvelopei virale. Totodată, această proteină



se poate atașa de celelalte proteine structurale, ca de exemplu de proteina N, ceea ce duce la stabilizarea nucleocapsidei și a complexului ARN - proteină N în interiorul virionului. [50] Structural, proteina M este constituită dintr-un domeniu N-terminal amino, un domeniu transmembrantar (TMD) și un domeniu C-terminal carboxil. Domeniul N conține 10 aminoacizi, urmând o regiune extinsă hidrofobă formată din aproximativ 90 de aminoacizi la nivel TMD și finalizându-se cu un terminal hidrofil carboxil format din 100 de aminoacizi. [54]

Proteina N este formată din 419 aminoacizi și se organizează modular, divizată în regiuni intrinseci dezordonate (IDRs) și regiuni structural conservate. Regiunile IDRs includ trei module: un braț - N, o regiune linker flexibilă centrală Ser/Arg (serină/arginină) bogată (LKR) și o coadă - C, în timp ce regiunea conservată este compusă dintr-un domeniu N - terminal (NTD) și un domeniu C - terminal (CTD). [55]

Pe lângă aceste patru proteine structurale, genomul viral codifică și o serie de proteine non-structurale (nsp), observate și la alte coronavirusuri, majoritatea având rol enzimatic, cum ar fi corectarea genomului viral, stimularea activității unor exoni, adeziune proteică, inhibarea semnalizării prin interferon, blocarea translației ARN-ului gazdă, replicare prin ARN - polimerază ARN dependentă, promovarea expresiei citokinice și clivajul poliproteinelor virale. [50]

### **3.3. ORGANIZAREA ȘI STRUCTURA GENOMULUI VIRAL**

După descoperirea primelor cazuri de pneumonie atipică, la sfârșitul anului 2019 în Wuhan, China, analiza secvențială a specimenelor recoltate din tractul respirator inferior a evidențiat prezența unui coronavirus nemaiîntâlnit până în acel moment, cu o secvență identică în proporție de 75% cu virusul SARS-CoV, iar până în ianuarie 2020 întreaga secvență genomică a noului virus a fost complet deslușită. La fel ca alte Coronaviridae, virusul SARS-CoV-2 este construit pe baza unui ARN monocatenar în sens pozitiv (+ssRNA) format din aproximativ 29 kb (kilobaze), mai exact puțin peste 29800 nucleotide. Materialul genetic este ambalat de către proteina N într-un complex ribonucleoproteic extins și încapsulat mai departe într-o anvelopă virală lipidică. [56] Genomul este compus din două cadre deschise de citire (ORF) pentru formarea proteinelor non-structurale (Nsp) și nouă cadre deschise de citire mai mici care codează proteinele structurale, dar și gene accesorii. Întreaga regiune ORF este flancată de către regiuni netranslate 5' și 3' ce conțin structuri ARN conservate cu rol funcțional important în ciclul de replicare virală. [57]

### 3.4. CICLUL DE REPLICARE VIRALĂ

În procesul de aderare la membrana celulară, virusul SARS-CoV-2 folosește proteina spike de la nivelul anvelopei virale, structura ei fiind formată dintr-un trimer cu trei capete de legare la receptor S1, așezate pe un peduncul trimeric de fuziune membranară S2. Capetele S1 conțin domeniul de legare la receptor (RBD), care recunoaște specific receptorii ACE2 (enzimei de conversie a angiotensinei 2) de pe suprafața celulei gazdă. În mod constant, RBD se comută între o poziție de ridicare necesară legării la receptor și o poziție culcată, de coborâre, pentru evaziunea imunologică. După legarea efectivă de receptor, proteina spike suferă modificări conformaționale mediate prin proteaze de suprafață celulară, cum este TMPRSS2 și proteaze lizozomale ca și cathepsinele, modificări necesare procesului de fuziune. Tot acest proces este mediat de preactivarea furinei, o enzimă proteolitică capabilă să crească afinitatea și, secundar, procesul de invazie în anumite celule prezentatoare de receptori ACE2. [63]

Eliberarea genomului viral în citoplasmă declanșează un program complex și bine organizat de expresie genică. Primul proces constituie translația secvențelor ARN pentru producția proteinelor non-structurale și, la fel cum am menționat în subcapitolul anterior, aceste secvențe sunt incluse în cadrele deschise de citire (ORF1a și ORF1b). Proteina pp1ab se produce ca urmare a unei schimbări de cadru ribozomal dintre ORF1a și ORF1b, specifică virusului SARS-CoV-2. Prin mecanisme co-translaționale și post-translaționale și, cu ajutorul proteazelor nsp3 și nsp5, 16 proteine non-structurale sunt eliberate din pp1a și pp1ab scindate, dintre care 15 formează complexul de replicare și transcripție (RTC) necesar etapei următoare. Replicarea genomică este inițiată de transcripția unui întreg ARN, dar de sens negativ, cu rol de matrice în producția de ARN în sens pozitiv. Acest nou ARN intermediar de sens negativ generează și el mai multe nsp și RTC. Secvențele TRS-L (secvență regulatorie transcripțională funcțională) constituie un semnal pentru transcripția ARN-ului mesager subgenomic, în timp ce fiecare unitate transcripțională a ARN-ului genomic este precedată de TRS-B. Odată ce particulele de mARN subgenomic sunt produse, nsp16, în strictă coordonare cu nsp10, metilează capătul 5' al mARN-urilor virale pentru a crea un capăt 5' - metil. Aceste molecule de ARN subgenomic sunt translatate mai departe pentru a forma proteine structurale, dar și câteva proteine nestructurale, iar întregul ARN intermediar de sens negativ este din nou transcris, de data aceasta în totalitate, într-un ARN de sens pozitiv care va sta la baza genomului virionului nou format. [61]



## 1. INTRODUCERE

Din momentul declarării pandemiei COVID-19 până în prezent, cercetătorii au încercat să deslușească toate mecanismele patogenice ce stau la baza acestei noi infecții virale ce a avut un impact marcant la nivel global. Deși în prezent numărul cazurilor de infectări nou înregistrate scade constant, începutul a fost devastator, raportându-se numeroase cazuri pe pacienți ce au rămas cu sechele post infecție cu virusul SARS-CoV-2 și chiar decese. De asemenea, așa cum s-a întâmplat cu virusul SARS-CoV original sau virusul MERS-CoV, SARS-CoV-2 a trecut de la animale la oameni, într-un mod foarte agresiv și repetat, rămânând o probabilitate constantă pentru un salt repetat către o altă specie de coronavirus. Mai mult, în timp ce morfologia virală, patogeniza și alterările clinice și patologice din faza acută sunt cunoscute într-un procent relativ înalt, același lucru nu se poate spune despre cazurile fulminante cu o rată mare de deces sau despre faza subacută sau „cronică”, denumită „COVID prelungit” de către clinicieni, în care pacienții suferă de daune ireversibile ale organelor și o serie de simptome nespecifice, de tip cronic. Nu în ultimul rând, este esențial ca cercetătorii, patologii și lucrătorii din domeniul medical să dispună de mai multe modele patologice ale bolii, în funcție de fiecare caz individual. Studiul nostru se bazează pe 56 de autopsii efectuate la pacienți care au decedat în cadrul Spitalul Clinic Județean de Urgență Sibiu, ca rezultat direct sau indirect al COVID-19, iar scopul nostru a fost de a creiona un pattern morfolopatologic al infecției cu SARS-CoV-2 la nivel sistemic, prin evaluarea fiecărui organ major din corp, utilizând tehnici de histopatologie, imunohistochimie și analiză moleculară. De asemenea, rezultatele obținute inițial vor fi comparate între ele și corelate cu vârsta și genul pacienților, comorbiditățile, intervalul de timp între debutul simptomelor și deces, precum și numărul de zile de spitalizare, stabilind astfel modelele histopatologice ale infecției cu SARS-CoV-2. În acest fel putem construi criteriile histopatologice necesare pentru diagnosticul histopatologic al bolii COVID-19.

## 2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul acestui studiu este de a determina principalele mecanisme patogenetice prin care virusul SARS-CoV-2 interacționează cu gazda umană, prin depistarea modificărilor microscopice tisulare și celulare survenite în urma infecției, dar și prin determinarea formelor evolutive morfopatologice, prin studiul leziunilor în dinamică.

Principalele obiective ale studiului sunt reprezentate de:

- Evidențierea leziunilor microscopice survenite la pacienții care au decedat ca urmare a infecției cu Virusul SARS-CoV-2.
  - Examinarea histopatologică, utilizând colorația hematoxilină-eozină, a speciemenelor recoltate de la nivel pulmonar, cardiac, renal, hepatic, splenic și intestinal.
- Stabilirea gradului de detecție a genomului viral la nivelul principalelor organe și sisteme studiate.
  - Analiza moleculară, folosind reacția de polimerizare în lanț cu detecție în timp real și transcripție inversă (rt-PCR), pe speciemenele recoltate de la nivel pulmonar, cardiac, renal, hepatic, splenic și intestinal, în vederea detecției genelor N, S și ORF1ab ale virusului SARS-CoV-2.
- Stabilirea gradului de invazie virală la nivelul diferitelor țesuturi și organe, dar și tipurile celulare, pentru care virusul SARS-CoV-2 are cea mai mare afinitate.
  - Analiza imunohistochimică pe speciemenele recoltate de la nivel pulmonar, cardiac, renal, hepatic, splenic și intestinal, folosind anticorpul monoclonal anti-nucleocapsidă SARS-CoV-2, în vederea detecției nucleocapsidei virale la nivel celular.
  - Analiza imunohistochimică, folosind anticorpi anti CK5/6, CK7, TTF1, CD68, CK AE1/AE3, CK MNF 116, CD3, CD5, CD20, pentru evidențierea tipului celular la care s-a observat prezența nucleocapsidei virale sau care are un rol major în mecanismul patogen al infecției virale.
- Tendința modificării pattern-ului histopatologic în dinamică și a gradului de detecție a nucleocapsidei virale, respectiv a genomului viral, în funcție de intervalul de timp ce a trecut de la debutul bolii și până la deces.
  - Clasificarea leziunilor microscopice detectate prin examinarea histopatologică clasică, a rezultatelor rt-PCR și a celor de imunohistochimie, în funcție de intervalul de timp dintre debutul bolii și deces.

### **3. MATERIAL ȘI METODĂ**

#### **3.1. SELECȚIA CAZURILOR**

Actuala cercetare doctorală realizează un studiu prospectiv, început în urmă cu aproximativ 4 ani, la începutul pandemiei SARS-CoV-2, respectiv din anul 2020, iar toate cazurile incluse în această teză provin din cazuistica Laboratorului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Sibiu, precum și din cea a Serviciului Județean de Medicină Legală Sibiu. Au fost selecționați pacienți ce au fost internați în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Sibiu, confirmați cu infecție cu virusul SARS-CoV-2 și care ulterior au decedat. Numărul autopsiilor la această categorie de pacienți a fost drastic limitat întrucât, la acel moment, reglementarea legislativă prevedea evitarea autopsierii cadavrelor SARS-CoV-2 pozitive, în vederea minimizării expunerii la agentul infecțios. Cu toate acestea, s-a reușit formarea unui lot de 56 de cazuri de autopsii ale cadavrelor pacienților cu infecție SARS-CoV-2, infecție confirmată într-un interval de timp cuprins între o zi și 68 de zile.

#### **3.2. AUTOPSIA**

Toate autopsiile din lotul de studiu au fost efectuate în cadrul Laboratorului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Sibiu, în zona roșie a - Compartimentul Prosectură, urmând cu strictețe prevederile legale din acea perioadă și utilizând echipamentul de protecție adecvat. S-a efectuat un număr de 56 de autopsii pentru lotul de studiu, din care 39 au fost toraco-abdomino-pelvine, 15 au cuprins și cavitatea craniană, iar 2 cazuri au fost minim-invazive, doar cu scopul de a preleva material tisular în vederea examinării complementare. Analiza descriptivă în timp real a examinărilor externe și interne a fost elaborată cu ajutorul unui reportofon, iar fotografiile din timpul autopsiei au fost efectuate cu ajutorul unei camere foto Sony alfa a6000. Principalele modificări au fost fotografiate și descrise în detaliu în cadrul protocolului de necropsie

#### **3.3. PRELEVAREA MATERIALULUI TISULAR**

În cursul fiecărei autopsii, s-a prelevat material tisular în vederea examinărilor de laborator din fiecare organ în parte, primul fiind preparat de volum mai mare (aproximativ 2,5/2,5/2 cm)

pentru includere în blocuri de parafină în vederea examinării histopatologice și imunohistochimice, probe care au fost scufundate în formaldehidă de concentrație 10%. Pentru examinările moleculare, materialul tisular prelevat a fost de volum redus (aproximativ 2 mm diametru). Acesta din urmă a fost prelevat imediat după deschiderea cavitațiilor, in situ, folosind ustensile sterile pentru fiecare organ pentru a evita contaminarea cu ARN viral de la un organ la celălalt. Imediat după prelevare, preparatul tisular a fost scufundat în reactiv de captare ARN (RNA-lock Reagent) pentru conservarea și stabilizarea ARN-ului viral iar, ulterior, materialele tisulare au fost depozitate la -30 de grade până când au fost evaluate molecular.

#### **3.4. PREGĂTIREA LAMELOR HISTOPATOLOGICE**

În vederea realizării lamelor histopatologice, materialul tisular prelevat de la fiecare autopsie a fost supus unor procese chimice de fixare, deshidratare și procesare, procese mecanice de includere și secționare micrometrică și, respectiv, procese de colorare. Înainte de procesarea propriu-zisă, după fixarea inițială a materialului tisular în formaldehidă de concentrație 10% pe o durată de cel puțin 48 de ore, țesuturile colectate au fost secționate la o grosime de circa 2-3 mm, fasonate și orientate macroscopic, apoi incluse în casete histologice clasice cu capac. După ce materialele tisulare au fost procesate, a urmat includerea acestora în blocuri de parafină pentru a putea fi ulterior secționate la microtom. Secțiunile au fost realizate cu ajutorul unui microtom manual apoi întinse cu ajutorul unei băi cu apă caldă și etalate pe lame încărcate cu sarcină pozitivă. Toate lamele histopatologice din studiul actual au fost colorate doar cu colorantul standard Hematoxilină-Eozină, cu ajutorul unui colorator histologic automat. [79]

#### **3.5. PREGĂTIREA LAMELOR DE IMUNOHISTOCHEMIE**

Analiza imunohistochimică de bază folosită în toate cazurile autopsiate, pe material tisular prelevat de la nivel cerebral, pulmonar, cardiac, renal, hepatic, splenic și intestinal, a fost pentru detecția nucleocapsidei virale a virusului Sars-CoV-2, folosind un anticorp monoclonal de șoarece, izotip IgG2b. Pentru controlul pozitiv, au fost achiziționate cinci țesuturi pulmonare infectate in-vitro cu virusul SARS-CoV-2 BSB-3701-CS SARS-CoV-2, secționate și montate pe lame Hydrophilic Plus. S-au obținut două controale negative pentru fiecare organ în parte și pentru fiecare caz în parte, unul folosind țesut de la aceiași pacienți, dar fără incubarea primară a

anticorpilor, iar celălalt folosind specimene recuperate de la un alt pacient, confirmat negativ prin tehnici moleculare.[79]

### **3.6. EXAMINAREA RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION)**

ARN-ul a fost extras din speciemenle aflate în reactiv de captare ARN la -20°C folosind kitul de extracție a ARN-ului viral QIAamp (Qiagen, Hilden, Germania), urmând recomandările producătorului, iar ARN-ul a fost eluat într-un volum final de 60 µL folosind soluție tampon de eluție. ARN-ul bacteriofagului MS2 (Emesvirus zinderi) creat in vitro a fost introdus în soluția tampon de liză a speciemenului și a servit drept control pentru etapa de extracție a ARN-ului, cât și pentru control în lipsa inhibitorilor în reacțiile RT-qPCR. Prezența și cantitatea genelor virale N (nucleocapsid), S (spike) și Orflab (Open Reading Frame 1ab) SARS-CoV-2 și controlul MS2 au fost determinate prin reacția de polimerizare în lanț cantitativă cu transcripție inversă folosind kitul TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR ( Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA), urmând recomandările producătorului privind sistemul QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, SUA).

### **3.7. DIGITALIZAREA LAMELOR MICROSCOPICE**

Fiecare preparat microscopic a fost evaluat utilizând un microscop clasic, după care, lamele ce au prezentat cele mai evidente și specifice modificări, au fost recatalogate și digitalizate în format 4K pentru o analiză histopatologică mai aprofundată. Digitalizarea preparatelor microscopice s-a efectuat cu ajutorul unui scanner digital Pannoramic Desk II DW (3dHistech).

### **3.8. DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC**

Fiecare preparat histopatologic a fost evaluat cu ajutorul unui microscop clasic, iar preparatele ce au prezentat modificările cele mai specifice și evidente au fost analizate și digital. După aceste evaluări amănunțite, s-a redactat descrierea microscopică a fiecărei lame histopatologice și imunohistochimice, precum și diagnosticul histopatologic și imunohistochimic.

### **3.9. ANALIZA REZULTATELOR**

Fiecare caz din lotul de studiu a fost inclus într-o bază de date ce a cuprins, în primul rând, structura lotului împărțită pe gen și grupe de vârstă, dar și date clinice și patologice cum ar fi perioada de internare (zile), intervalul de timp dintre apariția simptomatologiei și deces (zile), comorbidități, diagnostic de deces și diagnostice asociate. O altă colaterală a bazei de date a fost reprezentată de principalele modificări histopatologice evidențiate pe preparatele colorate cu Hematoxilină-Eozină, modificări împărțite pe fiecare organ în parte și, respectiv, pe fiecare caz din lotul de studiu. Următoarele structuri din baza de date au fost reprezentate de profilurile imunohistochimice sau, mai bine zis, prezența sau absența nucleocapsidei virale la nivelul specimenelor prelevate, împărțite pe fiecare organ în parte, pe fiecare tip de celulă ce a prezentat pozitivitate și, bineînțeles, pe fiecare caz din lotul de studiu. Ultima parte a bazei de date a cuprins analizele moleculare prin rt-PCR, unde rezultatele au fost împărțite în funcție de rezultatul pozitiv sau negativ pe fiecare dintre cele trei gene studiate, pe fiecare organ în parte, cuprinzând fiecare caz din lotul de studiu. După finalizarea bazei de date s-a trecut la realizarea analizei descriptive a fiecărei modificări microscopice. Rezultatele analizelor moleculare și imunohistochimice au fost descrise în detaliu. Totodată, corelația rezultatelor histopatologice cu durata spitalizării și intervalul de timp dintre debutul bolii și deces, a structurat informații valoroase cu privire la alterările microscopice în dinamică. Analiza statistică a datelor s-a realizat prin intermediul calculului chi-pătrat ( $X^2$ ) și a coeficientului phi ( $\Phi$ )

## **4. REZULTATE**

### **4.1. DATE DE ORDIN GENERAL AL LOTULUI DE STUDIU**

În lotul de studiu s-a evidențiat un număr total de 40 de pacienți de gen masculin, respectiv 16 pacienți de gen feminin. Din totalul cazurilor, 5 pacienți au avut vârsta cuprinsă între 21 și 40 de ani, 7 pacienți au avut vârsta cuprinsă între 41 și 60 de ani, iar 7 pacienți au avut vârstă peste 81 de ani. Cele mai numeroase cazuri au fost evidențiate la categoria 61-80 de ani, adică un număr de 33 de pacienți.

Cei mai mulți pacienți au avut o perioadă de internare cuprinsă între 1 și 3 zile. Următoarea categorie ca frecvență a fost reprezentată de pacienții spitalizați peste 21 de zile. Un număr de 10 cazuri au avut o perioadă de spitalizare cuprinsă între 15 și 21 de zile, 4 cazuri o perioadă de 4-7



zile, iar 3 cazuri o perioadă de 8-14 zile. Concluzionând, durata medie de spitalizare a fost de 12.3 zile.

În cazul intervalului de timp dintre debutul bolii și deces, rezultatele par mai echilibrate spre deosebire de precedentă clasificare, cu un număr de 11 cazuri de deces la categoria 1-3 zile, 8 cazuri de deces la categoria 4-7 zile, 5 cazuri de deces la categoria 8-14 zile, din nou 11 cazuri de deces, de data aceasta la categoria 15-21 de zile iar, cei mai numeroși, cei cu peste 21 de zile de la data apariției primelor simptome, însumând un număr de 21 de cazuri. La final, intervalul mediu dintre debutul infecției și deces a fost de 21.4 zile pe lotul de studiu actual.

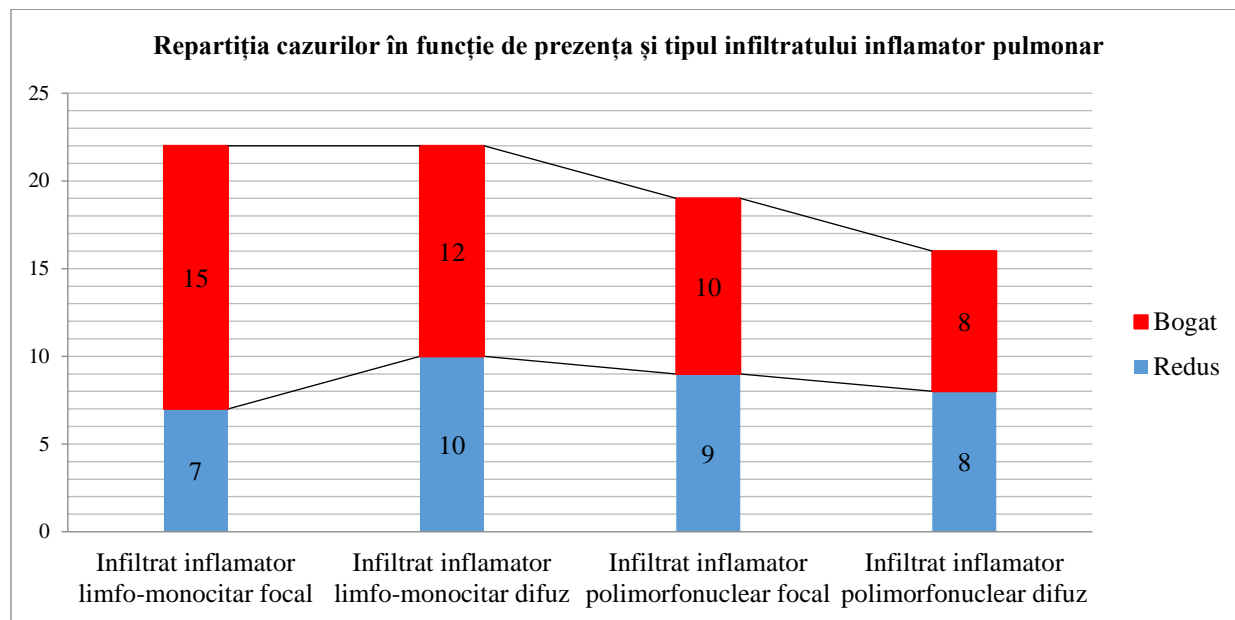
În ceea ce privește comorbiditățile, cei mai numeroși pacienți au prezentat boli cardiovasculare, cum ar fi boală aterosclerotică coronariană sau sistemică, hipertensiune arterială sau insuficiență cardiacă cronică, însumând un număr total de 26 de cazuri.

Cauza principală a decesului în urma efectuării autopsiei și a analizelor histopatologice s-a stabilit a fi pneumonia virală în cazul a 34 de pacienți din lotul de studiu. În cazul a doar 8 pacienți s-a stabilit că mecanismul tanatogenerator a fost declanșat de o suprainfecție bacteriană. 5 pacienți au suferit un tromboembolism pulmonar masiv care a declanșat decesul. La un număr de 4 cazuri, cauza principală de deces a fost stabilită ca fiind perforație sau necroze la nivelul tubului digestiv.

#### **4.2. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ PULMONARĂ**

Modificările acute s-au subîmpărțit mai departe în leziuni inflamatorii celulare (prezența infiltratului inflamator), leziuni alveolare, modificări sau leziuni vasculare și, respectiv, modificări hemodinamice. În cazul infiltratului inflamator, ponderea cea mai mare de cazuri a fost determinată de prezența infiltratului inflamator limfo-monocitar, observat într-un număr de 44 de cazuri. Forma difuză sau focală a fost reprezentată în mod egal în lotul de studiu și anume 22 de cazuri pentru fiecare categorie. Dintre acestea, într-un număr de 15 cazuri s-a putut observa un bogat infiltrat inflamator limfomonocitar cu dispoziție focală, iar într-un număr de 12 cazuri s-a constatat un bogat infiltrat inflamator cu dispoziție difuză. Într-o pondere mult mai mică au fost cazurile ce au prezentat un infiltrat inflamator limfo-monocitar doar ușor augmentat, acestea fiind în număr de 10 în ceea ce privește dispoziția difuză și doar în număr de 7 în ceea ce privește dispoziția focală. (Figura 10) În lotul de studiu s-a observat și un număr de 35 de cazuri în care, la examinarea microscopică pulmonară, s-a constatat prezența unui infiltrat inflamator

polimorfonuclear predominant neutrofilic. Dintre acestea, un număr de 19 specimene au avut o distribuție difuză a infiltratului, iar un număr de 16 specimene au prezentat o distribuție focală a infiltratului. 10 cazuri au prezentat un bogat infiltrat inflamator polimorfonuclear cu dispoziție focală, 9 cazuri au prezentat un redus infiltrat inflamator polimorfonuclear cu dispoziție focală și câte 8 cazuri au prezentat un infiltrat inflamator polimorfonuclear cu dispoziție difuză, atât bogat cât și ușor augmentat. (Figura 10)



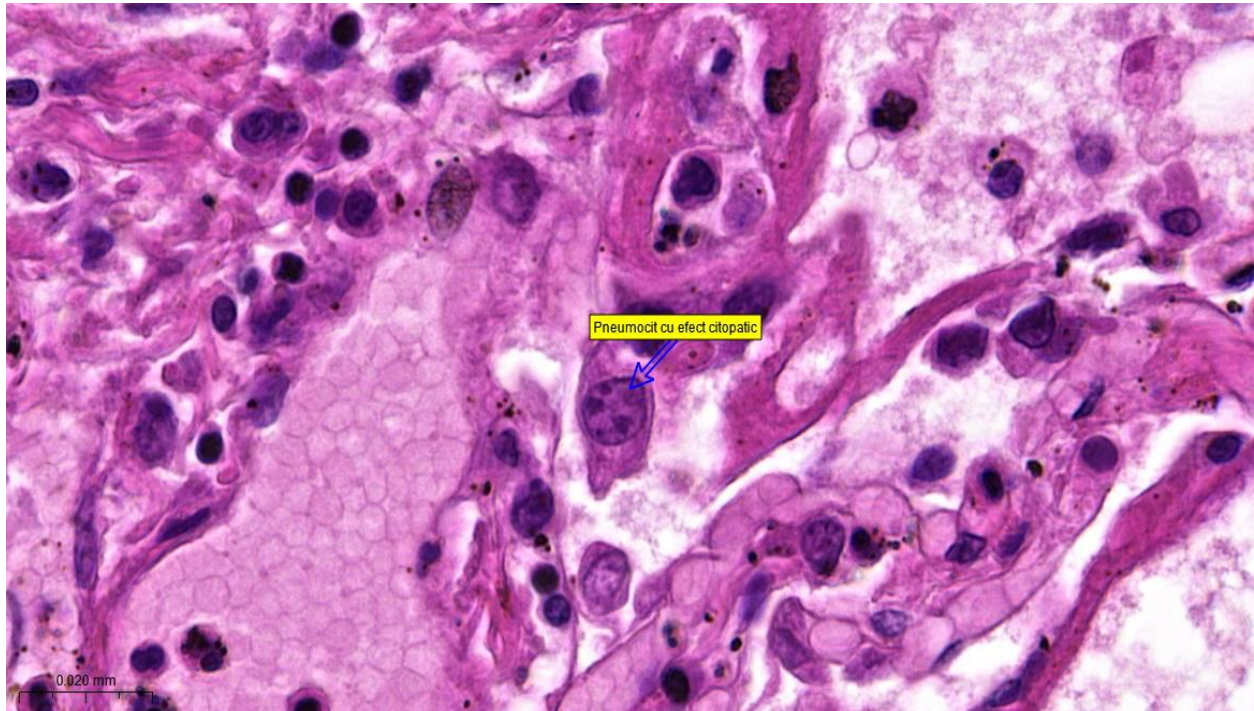
*Figura 10: Repartiția cazurilor în funcție de infiltratul inflamator pulmonar*

La un număr de 52 de pacienți, speciamentele examinate histopatologic au prezentat cel puțin o modificare survenită secundar leziunilor alveolare, cea mai frecventă fiind reprezentată de hiperplazia pneumocitelor de tip II. În 51 de cazuri din lotul de studiu s-a observat o creștere marcată a numărului de pneumocite de tip II, multe dintre ele fiind detașate de membrana bazală și observate la nivelul spațiilor alveolare. (Figura 11).

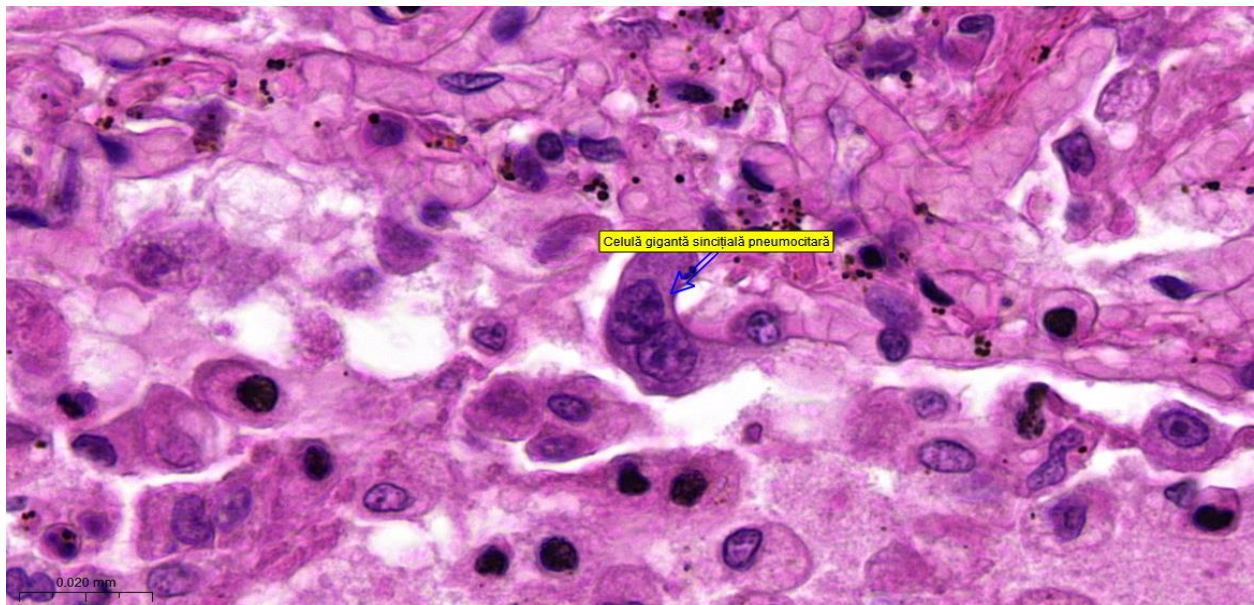
Dintre pacienții care au prezentat la analiza histopatologică modificări sugestive de hiperplazie de pneumocite de tip II, într-un număr de 38 s-a observat că, într-o proporție variabilă, pneumocitele hiperplaziate prezentau efecte citopatice (Imaginea 1).

Într-un număr de 31 de specimene recoltate care au prezentat hiperplazie pneumocitară cu efecte citopatice virale, s-a observat că, pe alocuri, aceste celule alterate au fuzionat și au format așa numitele sinciții, pe care le-am denumit ca fiind agregate pneumocitare cu formare de celule

gigant-like sau agregate sincițiale giant cell-like și care se pot confunda ușor cu celulele gigante multinucleate de origine histiocitară (Imaginea 2)



*Imaginea 1 - Colorație HE 73X (Plămân): Pneumocit cu efect citopatic viral*



*Imaginea 2 - Colorație HE 73X (Plămân): Celulă gigantă sincițială pneumocitară*

O altă modificare histopatologică importantă, care face parte tot din spectrul leziunilor alveolare difuze, este formarea membranelor hialine și a fost observată în 34 de cazuri. (Figura

11). Având în vedere caracterul lor difuz de formare și structura acestora, membranele hialine fac parte integrată din leziunile alveolare difuze.

O ultimă modificare histopatologică a fost inclusă în acest spectru al leziunilor alveolare și anume hiperplazia megacariocitară. În lotul de studiu personal au fost identificați 5 pacienți care prezentau această leziune (Figura 11)

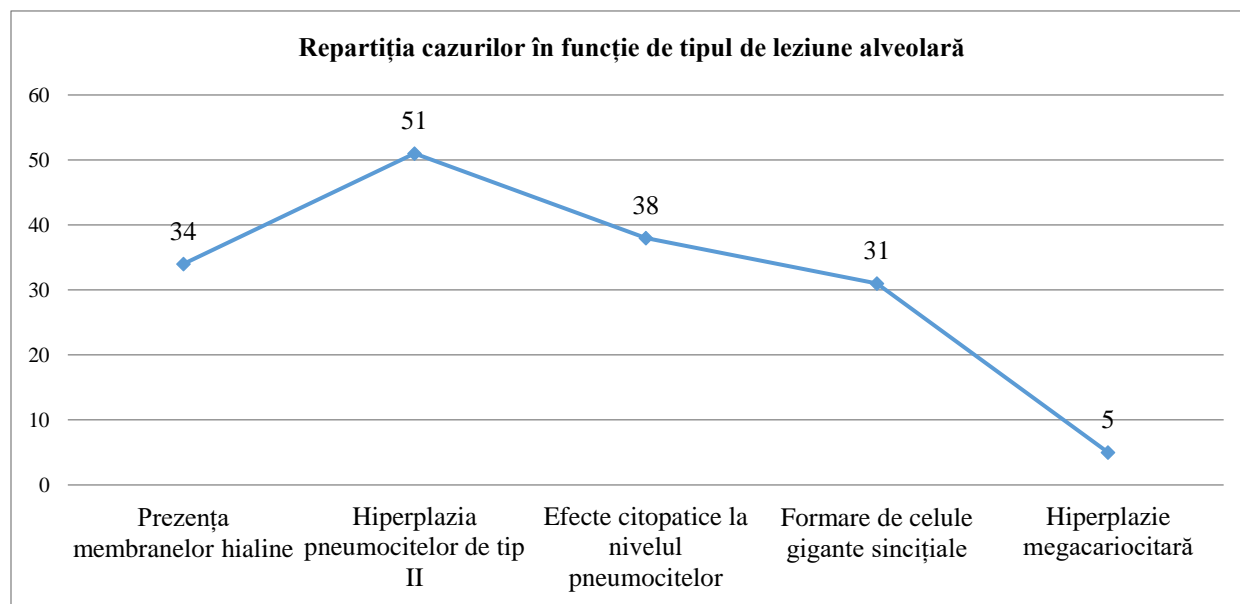


Figura 11: Repartiția cazurilor în funcție de tipul de leziune alveolară

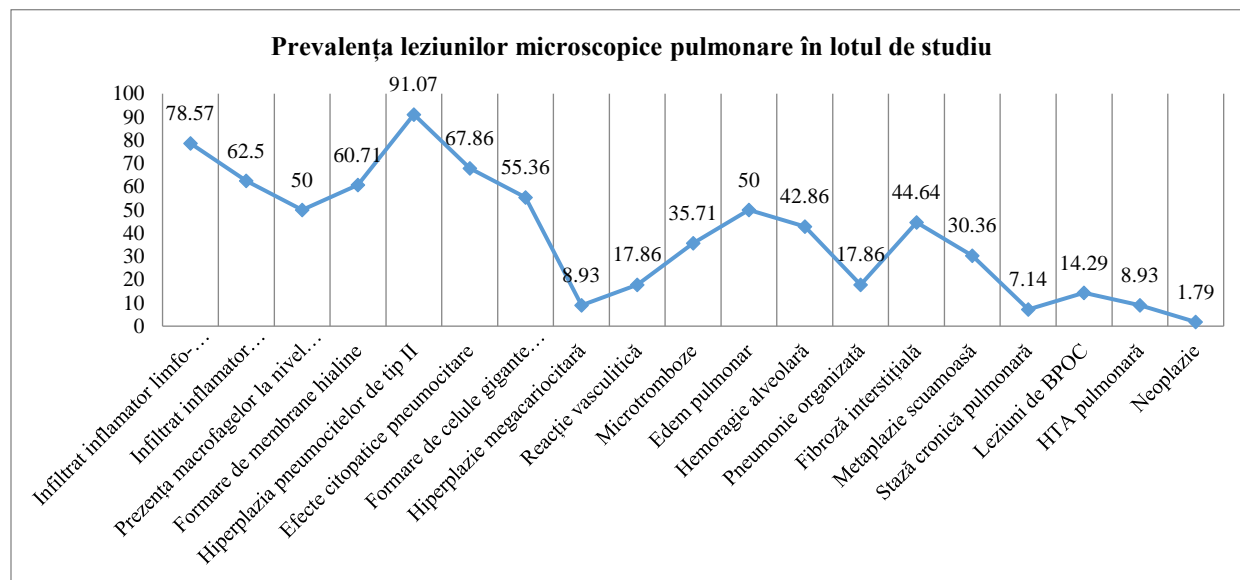
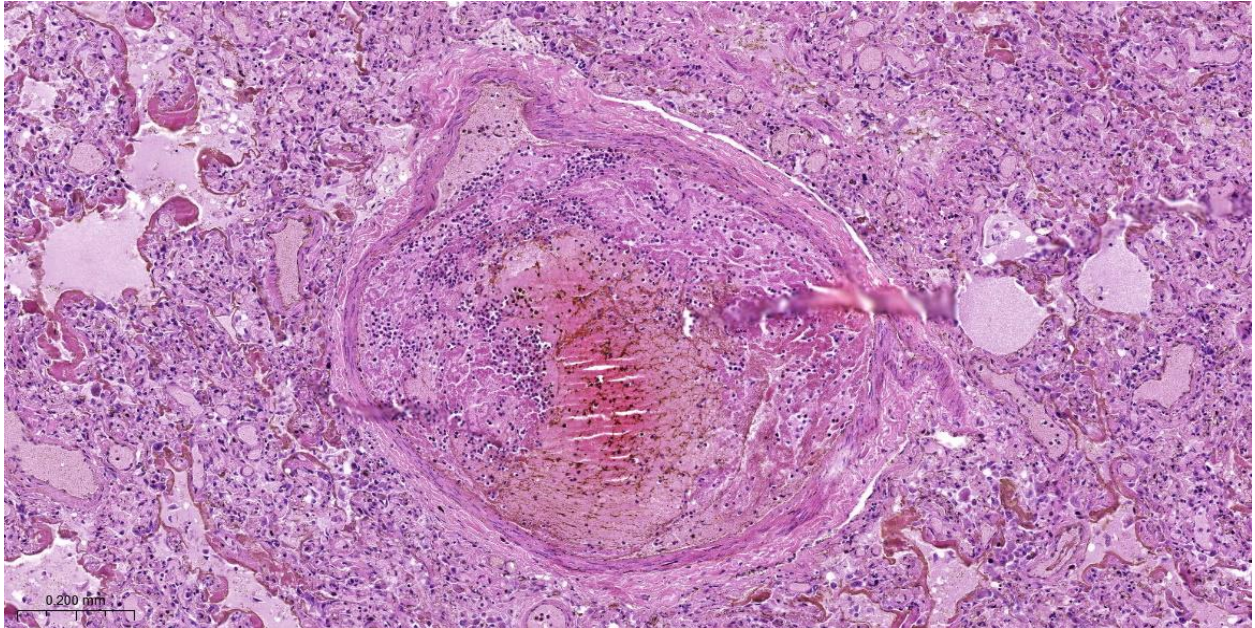
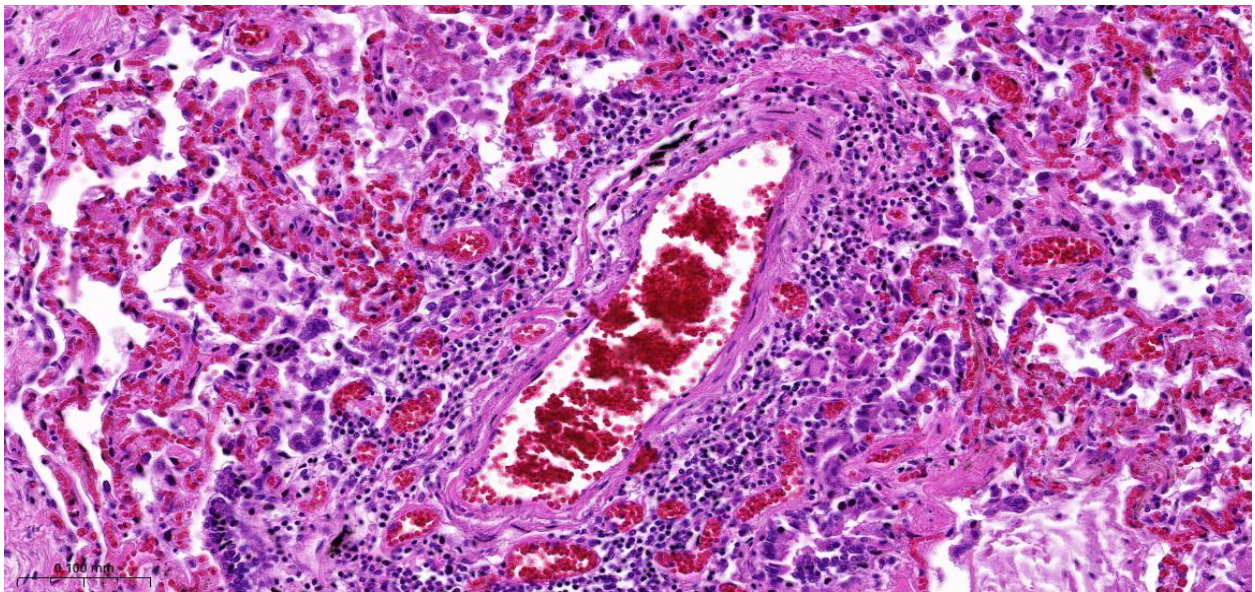


Figura 12: Prevalența leziunilor microscopice pulmonare în lotul de studiu

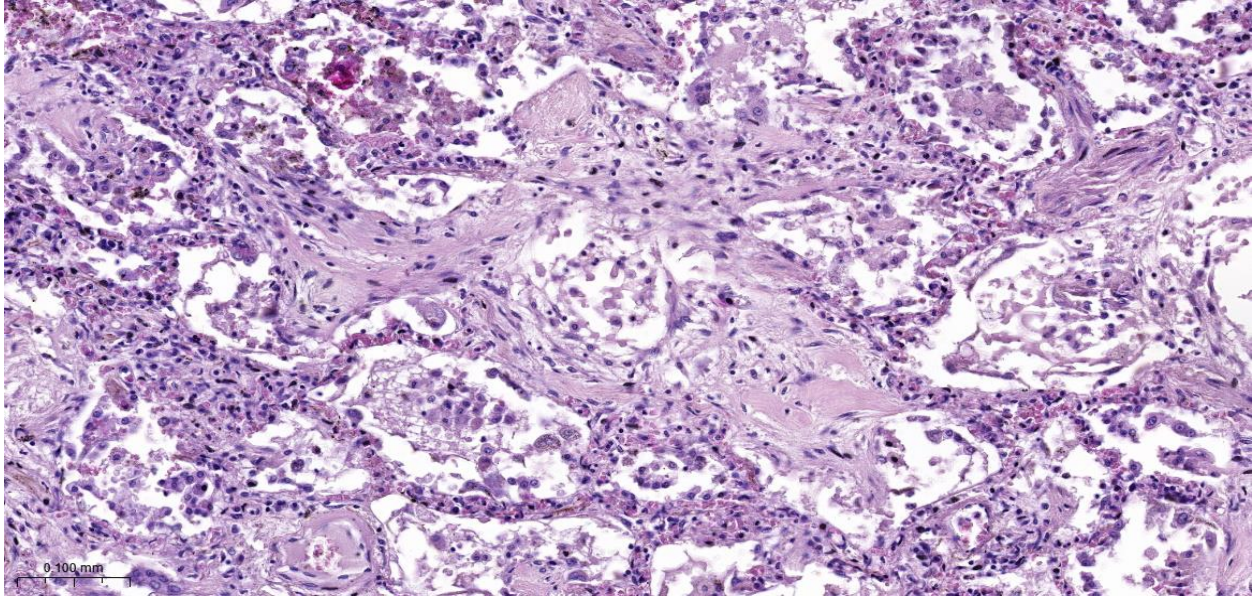
Următoarele modificări de natură acută abordate, observate în cazuistica actuală, au fost reprezentate de leziunile vasculare, aici făcând parte microtrombozele și reacția vasculitică. Prezența trombilor vasculari, fie de calibru mic, fie de calibru mai mare, a fost observată într-un număr de 20 de cazuri, dintre care 5 pacienți au suferit un trombembolism pulmonar masiv.



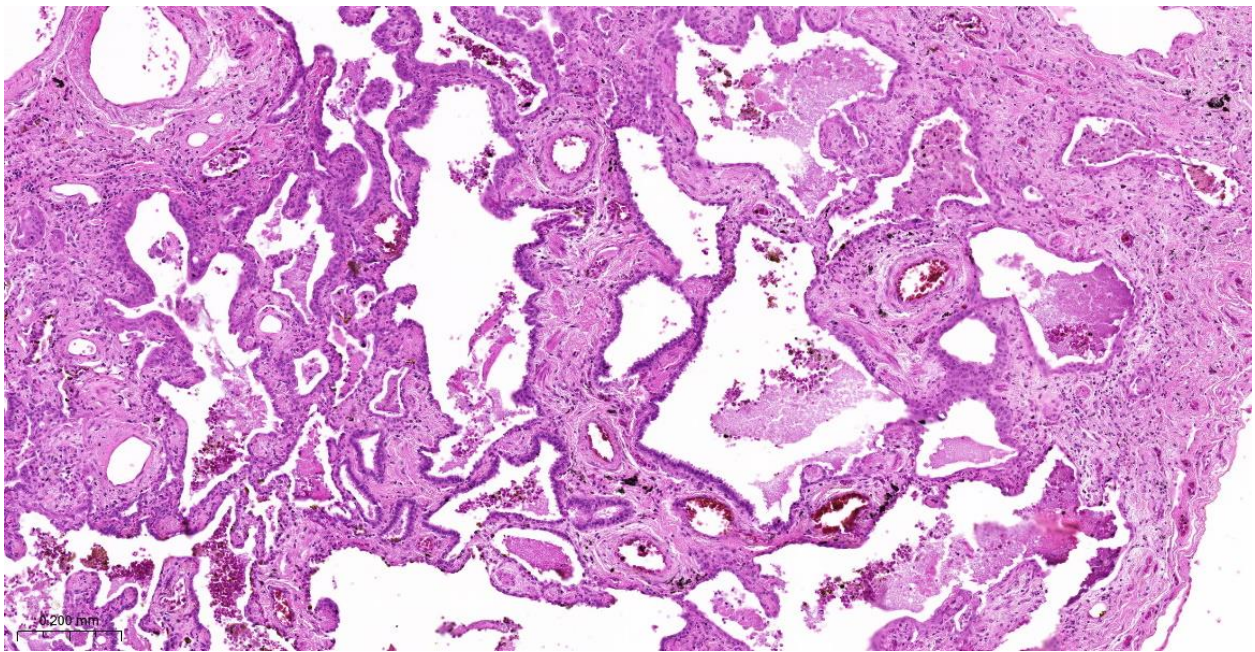
*Imaginea 3 - Colorație HE 6.4X (Plămân): Tromboză vas arterial pulmonar*



*Imaginea 4 - Colorație HE 14.6X (Plămân): Reacție inflamatorie limfocitară la nivelul și în jurul peretelui vascular*



*Imaginea 5 - Colorație HE 12.3X (Plămân): Pneumonie în fază de organizare*



*Imaginea 6 - Colorație HE 5.7X (Plămân): Fibroză interstițială cu arii extinse de metaplazie scuamoasă*

Leziunile regenerative aberante succed leziunile acute din faza exsudativă și anume membranele hialine, hiperplazia pneumocitelor de tip II, hemoragia alveolară, infiltratul inflamator și intră în spectrul fazei proliferative de organizare din cadrul leziunilor alveolare acute. [91] Astfel, în lotul de studiu s-a evidențiat un număr de 30 de cazuri care au prezentat cel puțin o formă de modificare regenerativă aberantă. (Figura 12) Dintre acestea, 10 cazuri au prezentat pneumonie

organizată, 25 de cazuri au prezentat fibroză interstițială și 17 cazuri au prezentat metaplazie scuamoasă. (Figura 15) Pneumonia organizată s-a observat într-un număr de 6 cazuri la pacienți cu debut de infecție cu peste 21 de zile înaintea decesului și la 3 cazuri cu debut între 15 și 21 de zile înaintea decesului. În 16 din 25 de cazuri cu fibroză interstițială, debutul a fost cu peste 21 de zile înaintea decesului, iar în 5 cazuri debutul a fost între 15 și 21 de zile înainte de deces. În 2 cazuri, leziunea a fost observată la un pacient cu debut simptomatic cuprins între 4 și 7 zile înainte de deces. Metaplazia scuamoasă a fost observată în 11 cazuri la pacienții cu debut infecțios de peste 21 de zile și în 4 cazuri cu debut în intervalul 15 - 21 de zile. (Figura 16)

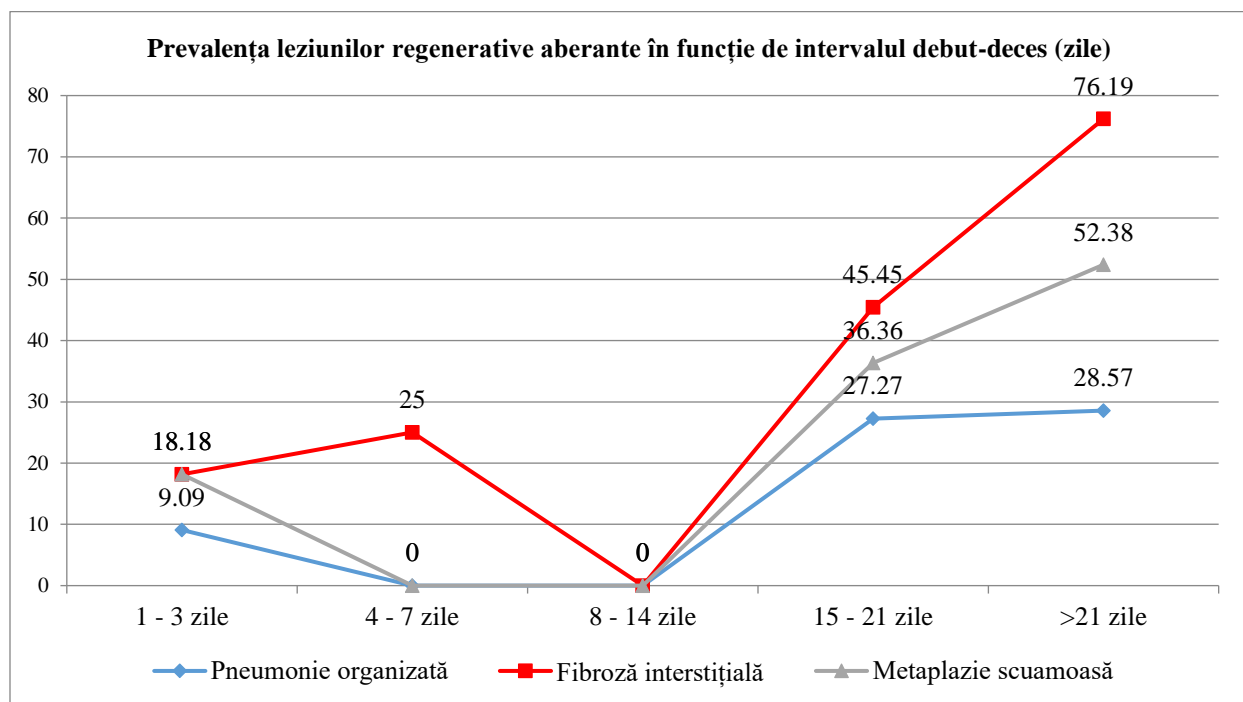
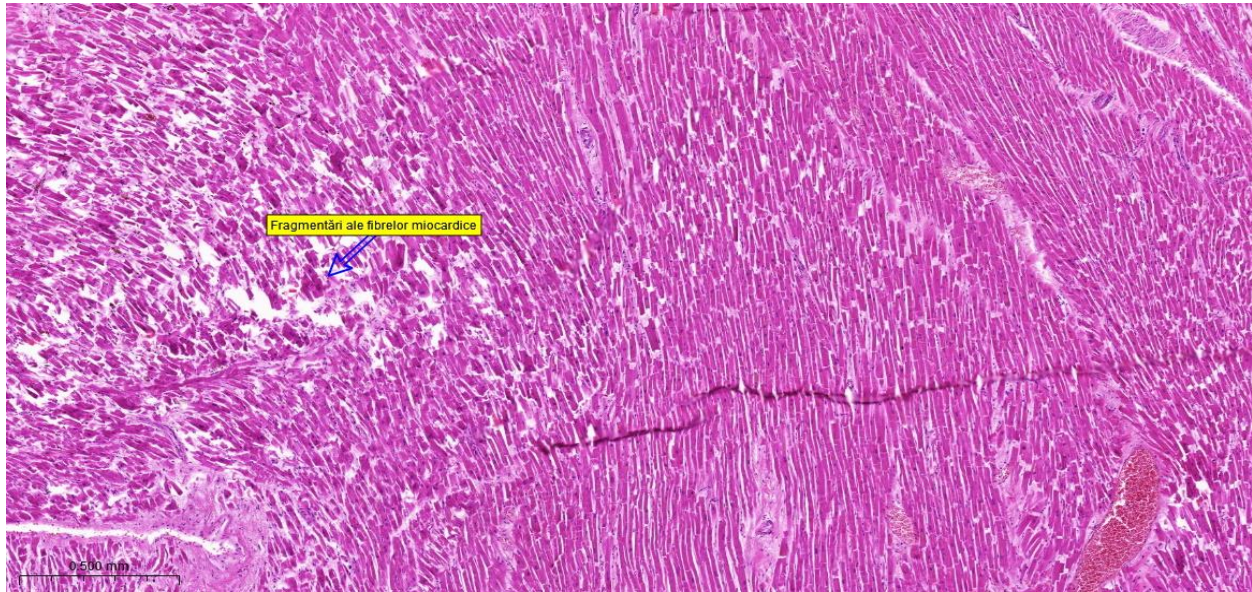


Figura 16: Prevalența leziunilor regenerative aberante în funcție de intervalul de zile dintre debutul infecției și deces

### 4.3. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ CARDIACĂ

În urma examinării microscopice a specimenelor recoltate de la nivelul cordului de la pacienții autopsiați, decedați în urma infecției cu virusul SARS-CoV-2, s-au descris mai multe leziuni, fiecare fiind clasificată în funcție de tipul de țesut afectat. Astfel, primele leziuni au cuprins țesutul miocardic, mai exact miocitele, și au fost catalogate ca fiind leziuni acute miocitare, observate la un număr de 37 de pacienți (Figura 18), fiind reprezentate de modificări microstructurale miocitare, necroză miocitară sau suferință miocitară (efecte citopatice miocitare).

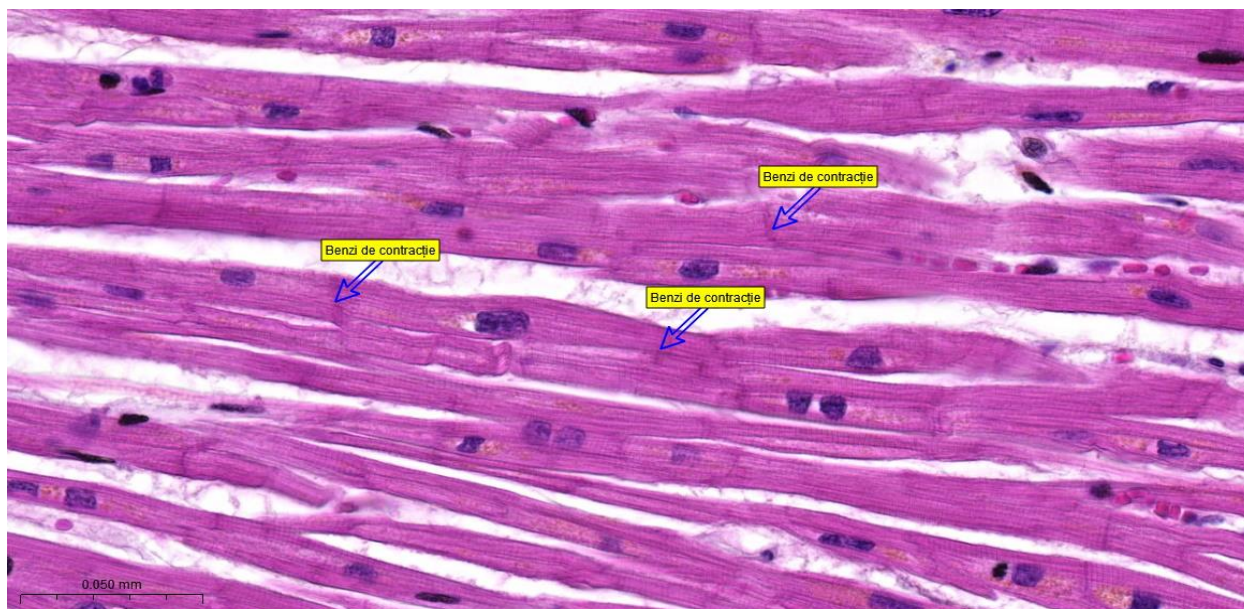
La toate cele 37 de cazuri s-a identificat cel puțin o formă de modificare microstructurală miocitară, transpusă prin fibre miocardice ondulate și/sau fragmentate, balonizări sau vacuolizări ale miocitelor, hipereozinofilie citoplasmatică sau pinoză nucleară. (Imaginea 7) Aceste modificări microstructurale sunt nespecifice și se observă în multe cazuri de deces cu perioadă lungă de agonie, generând multiple microischemii cardiace în teritorii nespecifice. (Figura 19)



*Imaginea 7 - Colorație HE 3.6X (Cord): Fragmentări ale fibrelor miocardice*

Necroza miocardică propriu-zisă a fost observată doar în cazul a 7 pacienți, 6 dintre ei fiind de gen masculin, iar unul de gen feminin, cu vârste cuprinse între 36 și 85 de ani. (Figura 19) Perioada de internare pentru acești pacienți a fost una scurtă, 4 cazuri având o perioadă de internare cuprinsă între 1 și 3 zile, un caz cu perioadă de internare de 5 zile, iar doi pacienți au fost internați 6 zile, respectiv 15 zile. Referitor la numărul de zile dintre debutul infecției și deces, nu se observă o corelație relevantă, pacienții la care s-a observat necroză miocardică având un interval debut-deces cuprins între 1 zi și 28 de zile.





*Imaginea 8 - Colorație HE 41.4X (Cord): Prezența benzilor de contracție*

Suferința miocitelor transpusă prin intumescență celulară, cu prezența de nuclei mari, patrulateri, angulați, neregulați, cromatină neomogenă și nucleol central a fost prezentă în 11 cazuri. Leziuni corespunzătoare unei miocardite au fost observate în cazul a doar 4 pacienți, trei dintre ei prezentând miocite aflate în suferință, cu intumescență celulară, cu prezența de nuclei mari, patrulateri, angulați, neregulați, cromatină neomogenă și nucleol central. Reacția inflamatorie limfocitară a spațiului subepicardic a fost observată în cazul a 15 pacienți și a cuprins atât modificări minime reprezentate de un infiltrat inflamator ușor augmentat cu dispoziție focală, cât și leziuni mai evidente de inflamație, cu prezența unei reacții limfocitare abundente, cu dispoziție difuză. Inflamația vasculară sau prezența conglomeratelor neutrofile în lumenul vascular a fost observată în 8 cazuri. În toate aceste 8 cazuri s-a observat în același timp și prezența infiltratului inflamator neutrofilic la nivel pulmonar. Prezența neutrofilelor în lumenul vaselor sanguine s-a asociat cu diagnosticul de bronhopneumonie bacteriană suprapusă în 3 cazuri și cu trombembolism pulmonar într-un caz, restul de patru cazuri asociindu-se cu diagnosticul de pneumonie virală. Ca și leziuni vasculare, în lotul de studiu, pe speciimenele cardiace recoltate, s-au evidențiat două modificări importante: o reacție vasculitică ușoară, mediată prin limfocite și microtromboze vasculare miocardice. 6 pacienți au prezentat microtrombi în lumenul arterelor mici și la toate aceste cazuri s-a observat și prezența microtrombilor la nivelul ramurilor vasculare pulmonare, iar la 3 dintre aceștia, în urma autopsiei, s-a stabilit diagnosticul de trombembolism pulmonar, restul având diagnosticul de pneumonie virală.

#### 4.4. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ RENALĂ

În cazul unui număr de 13 pacienți s-au putut evidenția leziuni ale nefronilor de tipul necrozei tubulare acute. (Figura 20) Nu s-a observat o asociere relevantă între prezența necrozei tubulare acute și vârsta sau genul pacienților. Totodată, perioada de internare a variat de la o zi până la 39 de zile, iar intervalul de timp de la debutul simptomatologiei infecțioase și până la deces a variat de la o zi la 68 de zile.

Modificările vasculare de la nivel renal au fost reprezentative pentru un număr de 20 de pacienți (Figura 21) și au fost subîmpărțite în trei forme principale: reacție vasculitică, microtromboze și congestie vasculară marcată. Cea din urmă a fost cea mai frecventă, observându-se la un număr de 16 pacienți. Microtrombozele vaselor mici renale au fost observate doar la 4 pacienți, iar reacția vasculitică a pereților vasculari mediată prin limfocite, doar la 3 pacienți. (Figura 20) Dintre aceștia, 2 pacienți au prezentat atât microtrombi la nivelul arborelui vascular renal, cât și pulmonar, fără însă să se fi putut depista acești microtrombi și la nivelul vaselor intramiocardice. Leziunile inflamatorii au constat în prezența limfocitelor sau a polimorfonuclearelor la nivel interstițial, în jurul glomerulilor sau a tubilor renali. Astfel, 21 de pacienți au prezentat leziuni inflamatorii reprezentate doar de infiltrarea interstițiului renal predominant cu limfocite și doar în cazul a 2 pacienți s-a putut decela un infiltrat inflamator compus doar din polimorfonucleare predominant neutrofile. (Figura 20)

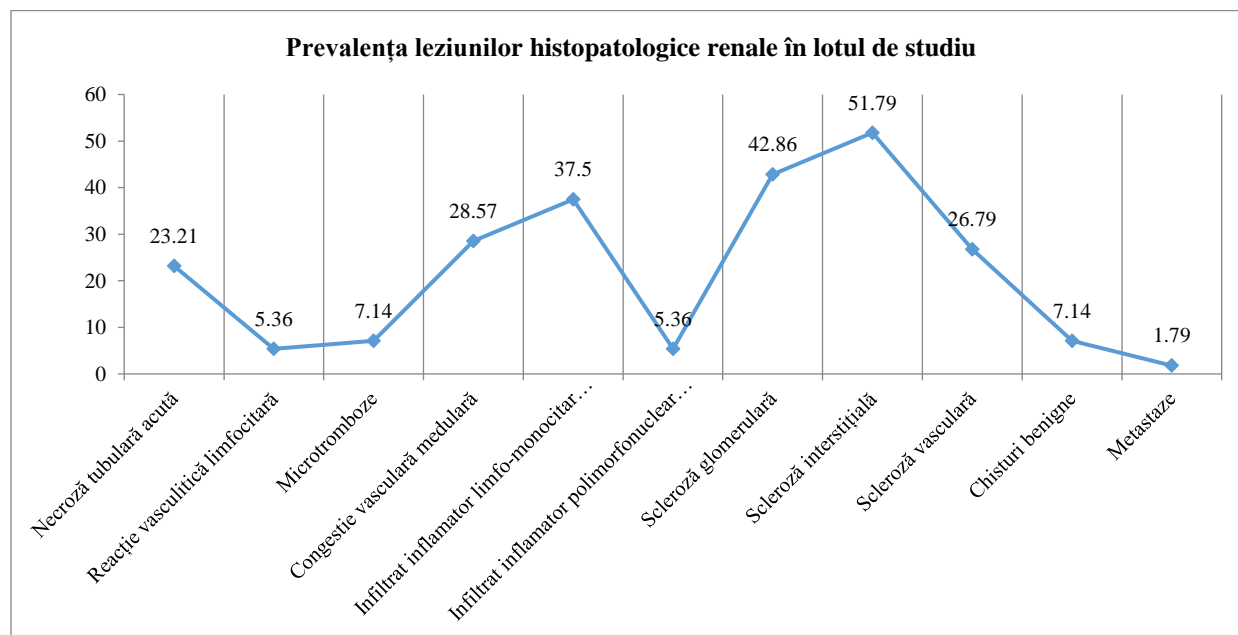
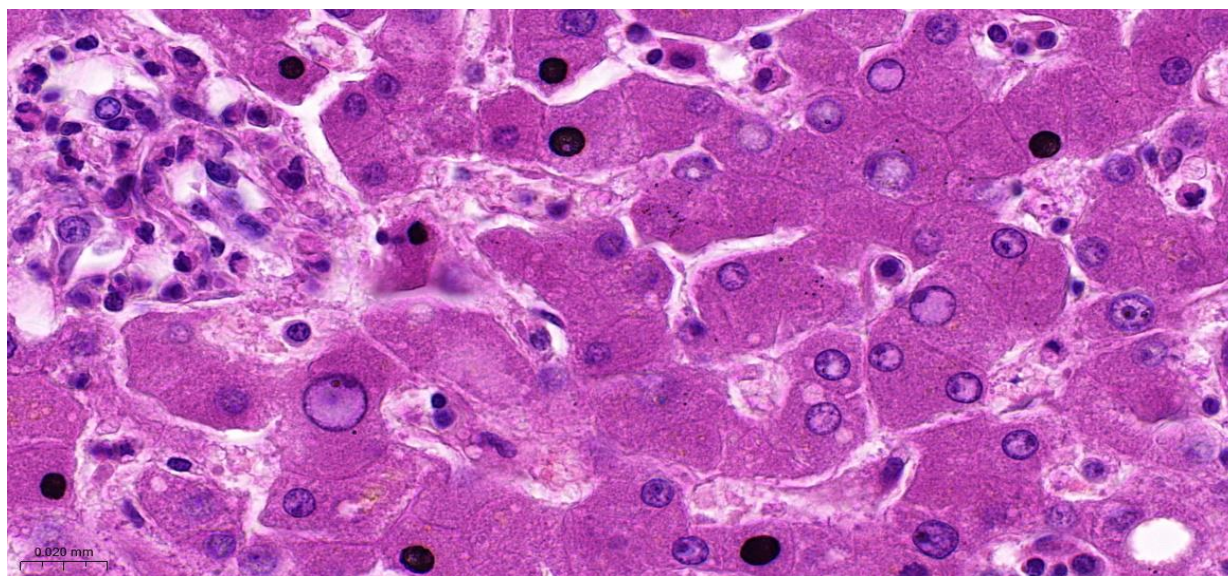


Figura 20: Prevalența leziunilor histopatologice renale în lotul de studiu

#### 4.5. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ HEPATICĂ

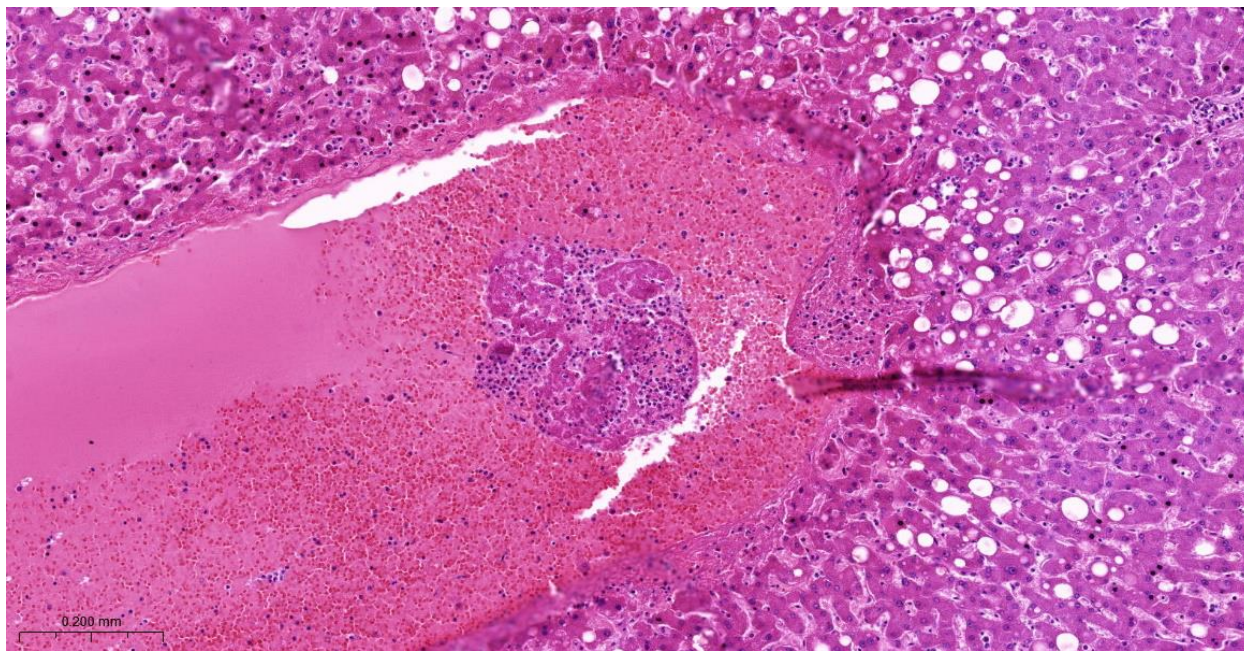
În cele mai multe cazuri, alterările microscopice au fost nespecifice, ponderea cea mai mare fiind reprezentată de prezența infiltratului inflamator limfo-monocitar la nivelul spațiului port sau la nivel subcapsular, într-un număr total de 23 de pacienți. (Figura 23) Modificări hepatocitare mai specifice observate în lotul de studiu și care pot demonstra reacția parenchimului hepatic la invazia virionilor, au fost reprezentate de efectele citopatice hepatocitare (Imaginea 10). Astfel, în lotul de studiu s-a observat prezența distrofiei granulo-vacuolare hepatocitare într-un număr de 11 specimene recoltate, numărul fiind același și pentru modificările citopatice hepatocitare. Dintre acestea, doar pe 3 specimene s-au putut decela ambele forme de leziuni hepatocitare. Efectul citopatic hepatocitar s-a asociat în 7 din 11 cazuri cu efectele citopatice de la nivelul pneumocitelor și în 6 cazuri cu prezența celulelor sincițiale multinucleate pneumocitare, adică în peste 50% din cazuri.



*Imaginea 10 - Colorație HE 48.4X (Ficat): Efecte citopatice hepatocitare*

A altă formă de leziune microscopică decelată la examinarea histopatologică hepatică a fost prezența neutrofilelor în lumenul vaselor hepatice, fie venă centrolobulară, capilare sinusoide sau vene și artere de la nivelul spațiului port, observată în 6 cazuri. (Figura 23) Prezența neutrofilelor în lumenul vaselor hepatice s-a asociat în 50% din cazuri cu prezența neutrofilelor de la nivelul vaselor miocardice și într-o proporție de 100% cu prezența infiltratului inflamator neutrofilic cu dispoziție difuză la nivel pulmonar. Leziunile vasculare, la fel ca și în cazul celorlalte

organe, au fost împărțite în reacții vasculitice sau microtromboze. (Imaginea 11) Cele dintâi nu au fost observate pe niciun specimen recoltat de la nivelul țesutului hepatic. Prezența trombilor în vasele hepatice, în principal vene centrolobulare sau vase sanguine de la nivelul spațiului port, s-a observat în 5 materiale tisulare prelevate de la nivel hepatic. (Figura 23)



Imaginea 11 - Colorație HE 8.2X (Ficat): Tromboză venoasă hepatică

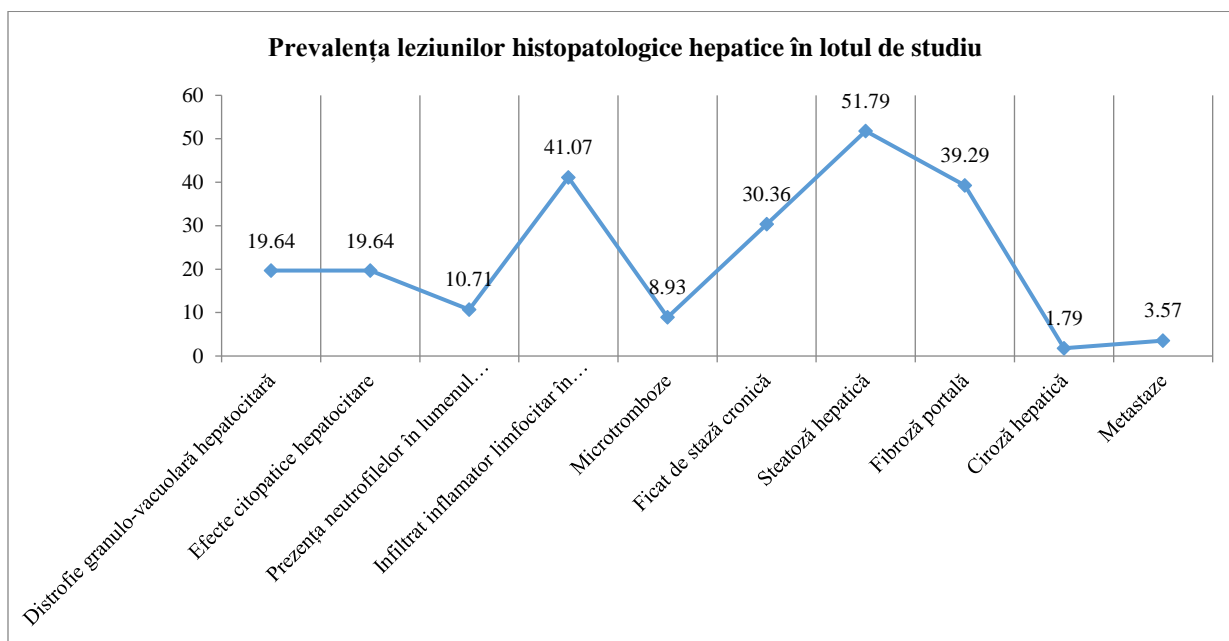


Figura 23: Prevalența leziunilor histopatologice hepatice în lotul de studiu

#### 4.6. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ SPLENICĂ

Modificările de la nivelul parenchimului splenic au cuprins, în cea mai mare parte, dezorganizare la nivelul pulpei albe, respectiv, cea roșii. Hipoplazia ușoară a pulpei albe a fost observată în 13 cazuri, iar atrofia într-un număr de 31 de cazuri. Hiperplazia țesutului limfoid de la nivel splenic s-a observat numai în 8 cazuri. (Figura 24) Dezorganizarea de la nivelul pulpei roșii a cuprins doar congestia marcată, reprezentată de creșterea sechestrării de eritrocite într-un volum mai mare. Această modificare a fost decelată la un număr de 43 de pacienți. (Figura 24) Atrofia pulpei albe a avut un raport direct proporțional cu evoluția lentă nefavorabilă a infecției virale, fiind prezentă la un procent puțin peste 50% din totalul cazurilor cu debut infecțios de peste 21 de zile înaintea decesului și doar la 7 din 19 pacienți cu evoluție rapidă, fulminantă, cu debut infecțios cuprins între 1 și 7 zile înainte de deces. În schimb, hipoplazia redusă a pulpei albe a fost corelată cu o evoluție infecțioasă pe termen mediu. Nu s-a putut demonstra o asocieră între hiperplazia pulpei albe și intervalul de timp dintre debutul infecțios și deces, acesta fiind cuprins la cei 6 pacienți într-un interval de 2 zile, respectiv 36 de zile. (Figura 25)

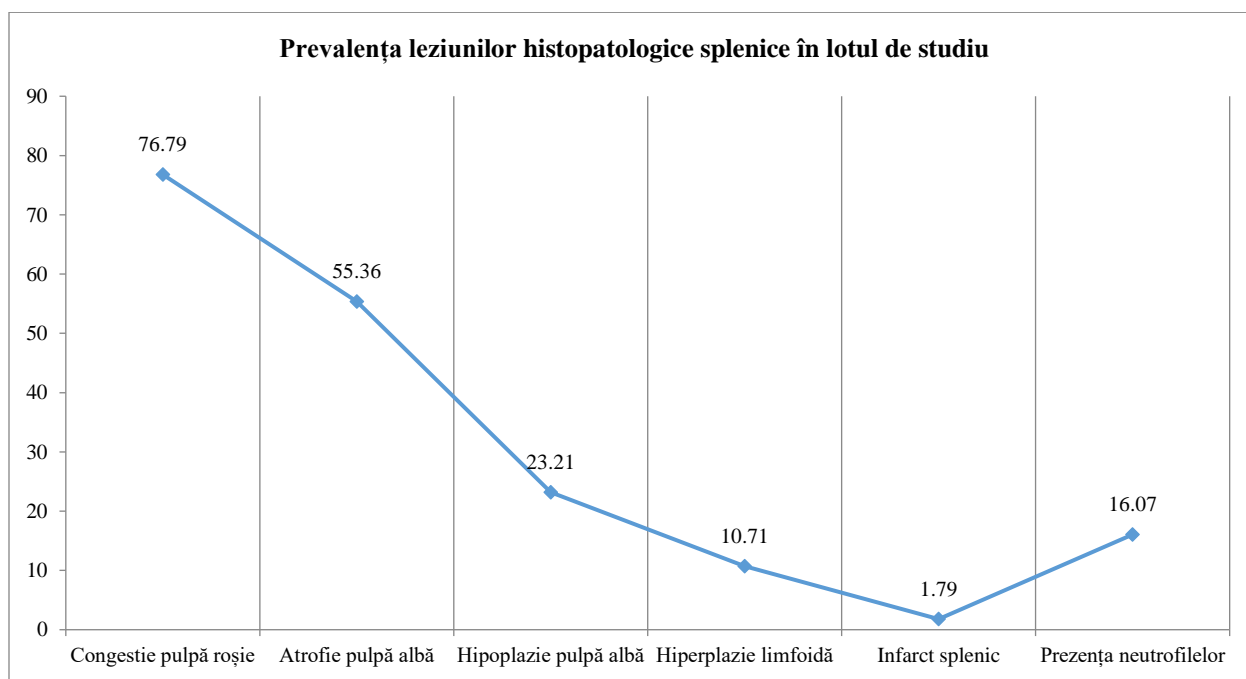
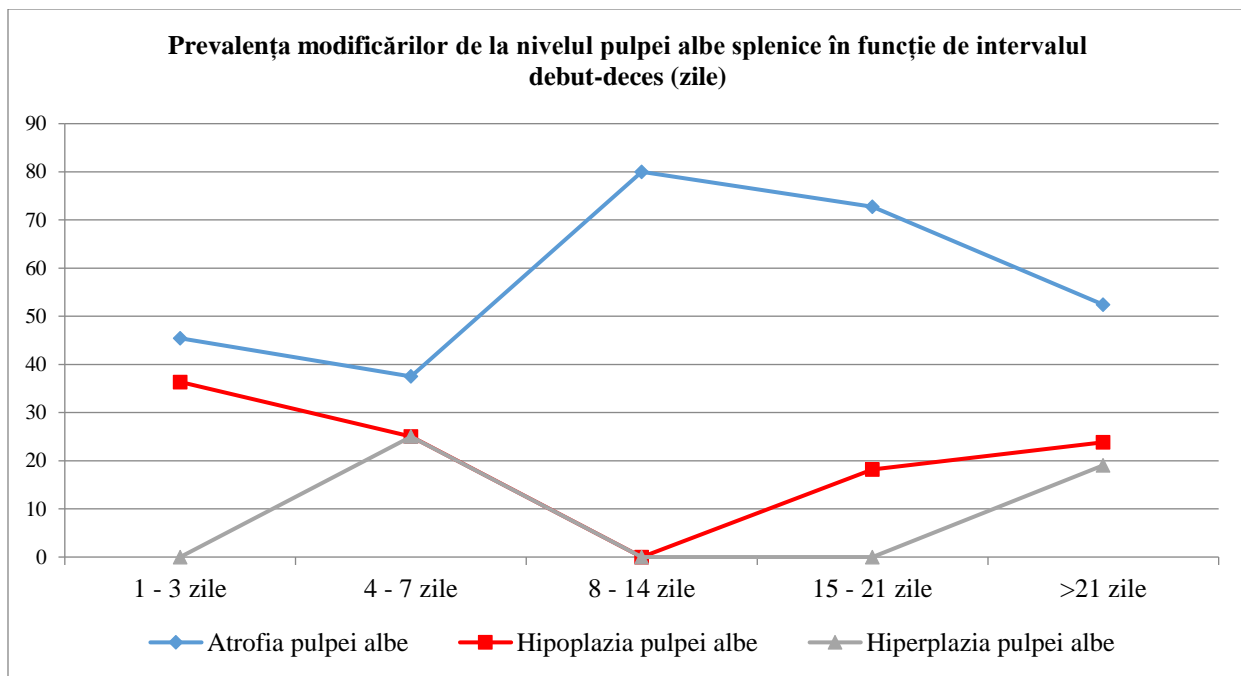


Figura 24: Prevalența leziunilor histopatologice splenice în lotul de studiu



*Figura 25: Prevalența modificărilor de la nivelul pulpei albe splenice în funcție de intervalul de zile dintre debutul infecției și deces*

#### 4.7. EXAMINAREA HISTOPATOLOGICĂ INTESTINALĂ

După ce toate speci­me­nele recoltate au fost analizate din punct de vedere histopatologic, pe colorația uzuală hematoxilină-eozină, a rezultat faptul că un număr de 2 pacienți au prezentat, la nivelul intestinului subțire, leziuni inflamatorii de tipul infiltratului inflamator neutrofilic, unul având o dispoziție difuză a infiltratului, iar celalalt având o dispoziție focală, par­celară. La nivelul colonului, același tip de leziune s-a observat într-o proporție mai mare, adică într-un număr de 6 speci­me­ne. Mai multe cazuri au prezentat leziuni inflamatorii mediate de un infiltrat inflamator limfo-monocitar, adică un total de 21 de cazuri la nivelul intestinului subțire și, respectiv, un total de 24 de cazuri la nivelul colonului. Dintre acestea, 6 cazuri au fost reprezentate de un infiltrat inflamator limfo-monocitar cu dispoziție focală/par­celară la nivelul intestinului subțire și, respectiv, 7 cazuri la nivelul colonului. Dispoziția difuză a limfocitelor a fost evidențiată în 15 cazuri la nivelul intestinului subțire și, respectiv, 17 cazuri la nivelul colonului. (Figura 27) Dintre toți acești pacienți, 18 au prezentat leziuni inflamatorii limfo-monocitare atât la nivel colonic, cât și la nivelul intestinului subțire. Eroziunile mucoasei au fost observate în cazul a 16 pacienți la nivelul intestinului subțire și în cazul a 17 pacienți la nivel colonic, asocierea dintre eroziunile intesinale și colonice fiind observată doar la 10 pacienți.

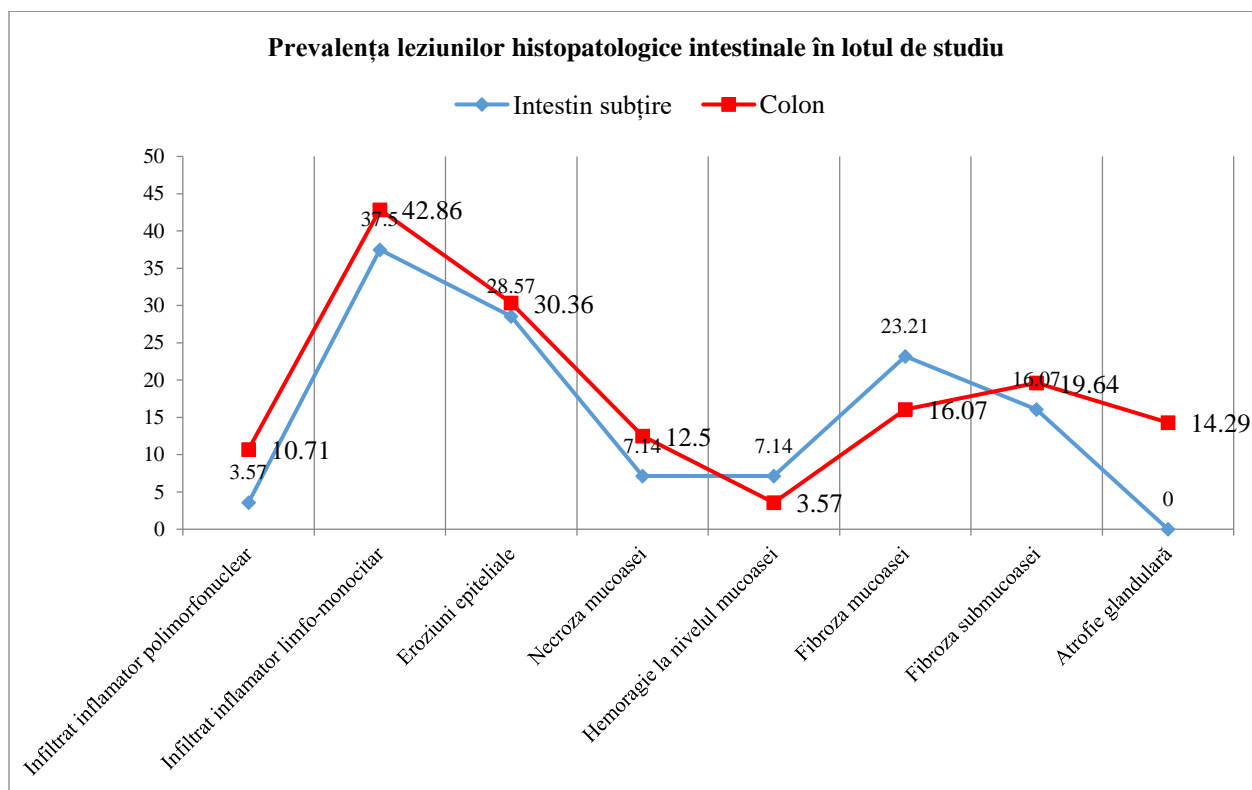
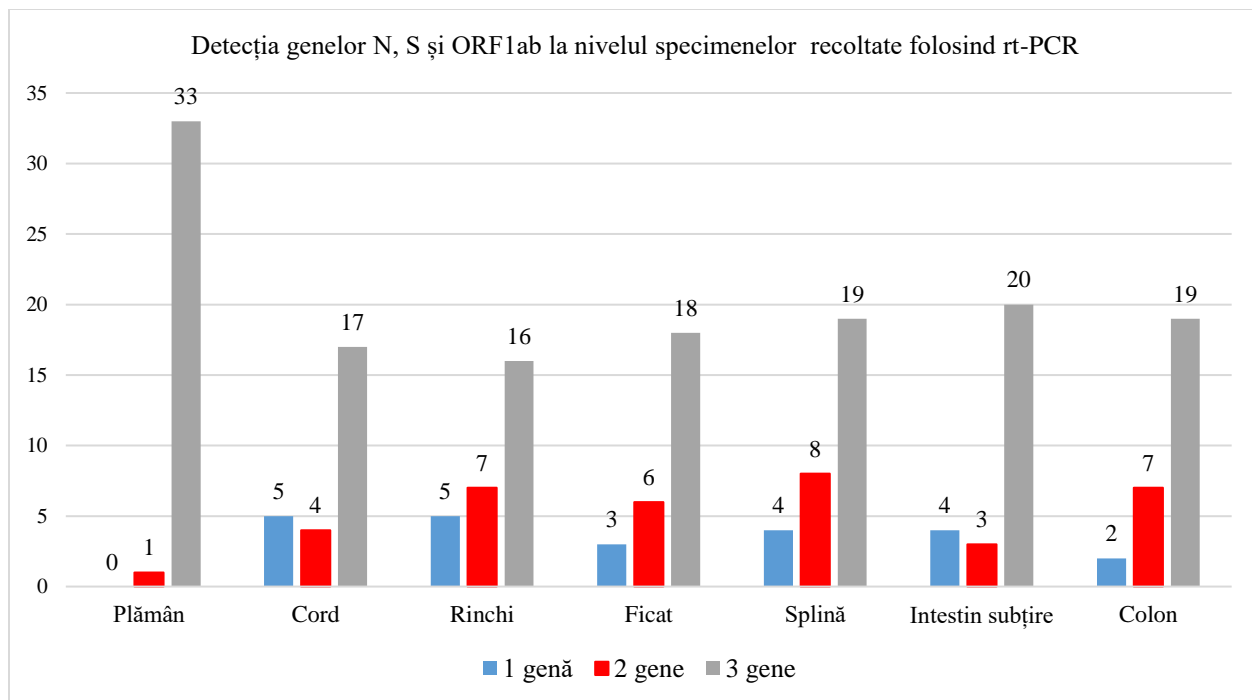


Figura 28: Prevalența leziunilor histopatologice intestinale în lotul de studiu

#### 4.8. EXAMINĂRI MOLECULARE ÎN VEDEREA DETECȚIEI GENOMULUI VIRAL

Examinările moleculare de tipul reacției de polimerizare în lanț cu transcripție inversă (rt-PCR) au fost efectuate pe un număr de 35 de pacienți din lotul de studiu, pe material tisular prelevat de la nivelul ambilor plămâni, dar și de la nivel miocardic, renal, hepatic, splenic și intestinal. Analiza moleculară a inclus detecția a trei gene virale, respectiv genele S, N și ORF1ab. Pentru ca un specimen să fie pozitiv, a fost nevoie de prezența a toate cele trei gene virale în materialul tisular examinat. La nivel pulmonar, detecția celor trei gene virale a fost determinată în cazul a 33 de pacienți din 35, un singur pacient a prezentat pozitivitate doar pentru două din trei gene virale, iar un pacient a fost complet negativ, detecția unei singure gene virale neputând fi stabilită. (Figura 29) Un aspect important este faptul că prezența celor trei gene virale la nivelul materialului tisular prelevat de la nivel pulmonar a fost observată și în cazul pacienților cu evoluție lentă nefavorabilă și au fost detectate inclusiv la un pacient cu debut infecțios cu 68 de zile anterior decesului.

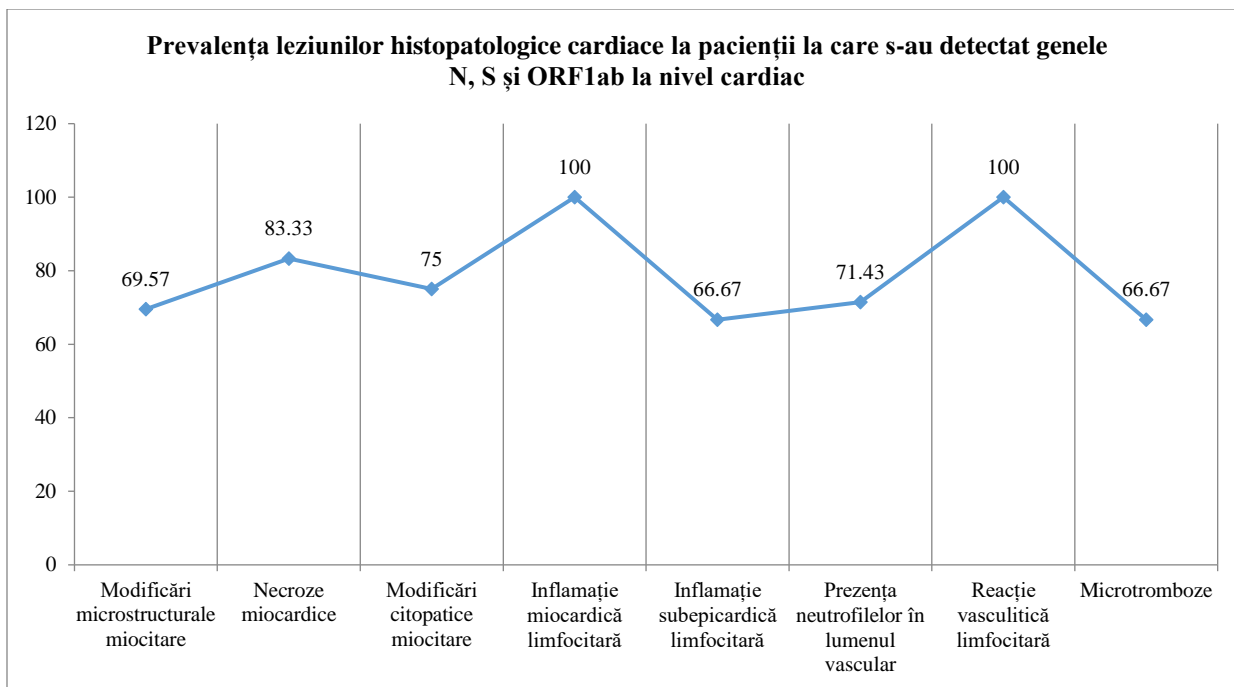


*Figura 29: Detecția genelor N, S și ORF1ab la nivelul speciemenelor recoltate folosind rt-PCR*

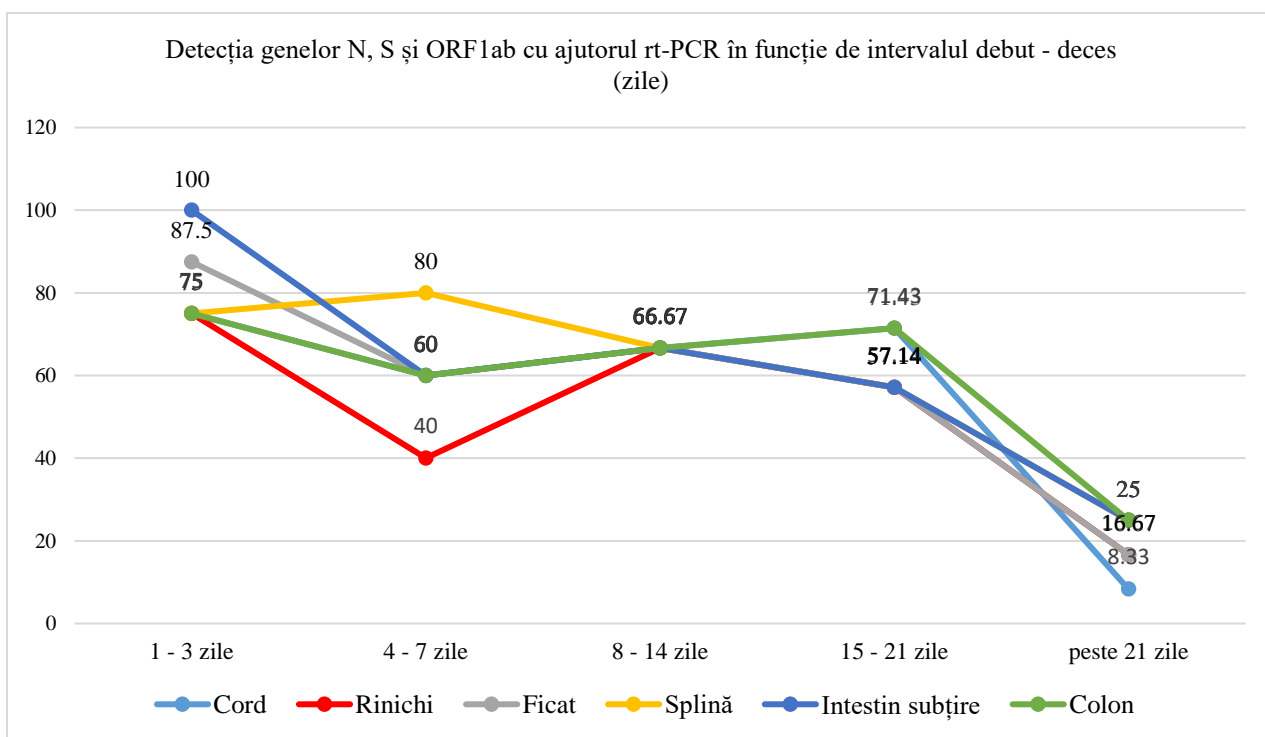
Examinarea rt-PCR de la nivel cardiac pentru cei 35 de pacienți din lotul de studiu, a evidențiat o pozitivitate pentru toate cele trei gene virale în cazul a 17 pacienți, 4 pacienți au prezentat pozitivitate pentru două din cele 3 gene virale studiate, iar 5 pacienți au prezentat pozitivitate doar pentru una dintre ele. (Figura 29) Pentru restul pacienților, 9 pacienți, nu s-a putut detecta nici măcar prezența unei singure gene virale dintre cele 3 studiate pe materialele tisulare prelevate de la nivel cardiac.

Suferința miocitară a fost observată la 8 pacienți din cei 35 testați inclusiv molecular, iar 6 dintre ei au prezentat pozitivitate pentru toate cele 3 gene virale, unul fiind pozitiv pentru 2 din 3 gene virale, iar unul fiind pozitiv doar pentru o singură genă virală. (Figura 31) Genomul viral a putut fi detectat și în 3 din 4 specimene tisulare care au prezentat leziuni ce corespund unei miocardite. În cazul a 8 din 12 specimene din lotul de studiu testat prin tehnici moleculare, a existat o asociere între prezența fenomenelor inflamatorii pericardice și detecția genelor S, N și ORF1ab. În 5 din 7 cazuri s-a observat o asociere între prezența neutrofilelor în lumenul vaselor miocardice și detecția celor trei gene virale. Leziunile vasculare de tipul microtrombozelor sau de tipul reacției vasculitice s-au asociat într-o proporție mare cu pozitivitatea țesutului miocardic la examinarea PCR, respectiv 3 din 4 cazuri. (Figura 31)





*Figura 31: Prevalența leziunilor histopatologice cardiace la pacienții la care s-au detectat genele N, S și ORF1ab la nivel cardiac*



*Figura 32: Detectia genelor N, S și ORF1ab în funcție de intervalul de zile dintre debutul infecției și deces*

În urma examinării prin tehnica rt-PCR a materialelor tisulare prelevate de la nivel renal s-a stabilit că 16 din 35 de cazuri au fost pozitive pentru genele S, N și ORF1ab, 7 cazuri au fost pozitive doar pentru două dintre acestea, iar 5 cazuri au fost pozitive doar pentru o singură genă. (Figura 29) În 7 cazuri nu s-a putut detecta nicio genă virală pe materialele tisulare examinate. Pe acest lot de 35 de pacienți testați molecular, 9 pacienți au avut descrise leziuni de necroză tubulară acută la nivel renal, din care 6 au prezentat pozitivitate pentru toate cele 3 gene virale studiate. Reacția vasculitică de la nivelul pereților vasculari renali și microtrombozele din patul vascular renal s-au asociat într-o proporție de 100% cu detecția genomului viral la PCR pe țesutul renal. (Figura 34) La fel ca și în cazul țesutului cardiac, detecția genelor N, S și ORF1ab a fost observată la pacienții cu infecție SARS-CoV-2 formă severă, cu evoluție fulminantă, dintre cele 16 cazuri pozitive, un număr de 6 cazuri au avut un interval debut infecțios-deces scurt, de 1 - 3 zile, 2 cazuri au avut un interval debut-deces de 4-7 zile, 2 cazuri cu debut între 8 și 14 zile înaintea decesului, 4 cazuri între 15 și 21 de zile, iar doar 2 cazuri cu debut cu peste 21 de zile înaintea decesului, cea mai lungă perioadă fiind de 68 de zile. (Figura 32) În urma analizei statistice s-a observat o corelație inversă, negativă, între detecția celor trei gene virale și intervalul debut-deces lung, de peste 21 de zile. (Figura 35)

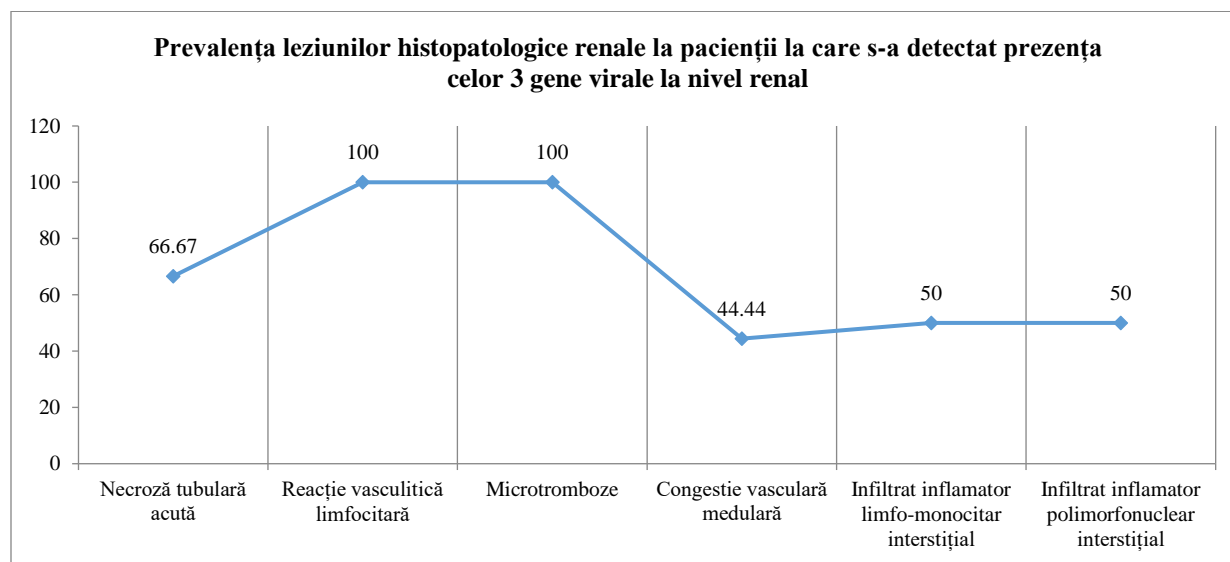
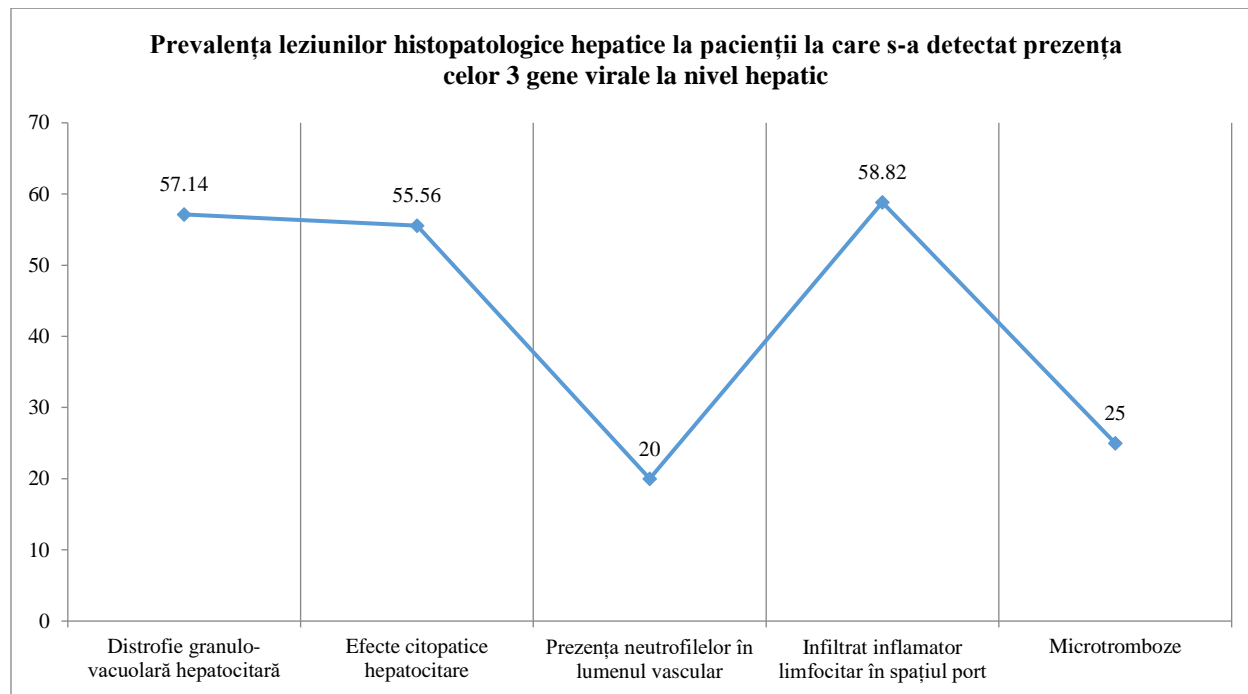


Figura 34: Prevalența leziunilor histopatologice renale la pacienții la care s-au detectat genele N, S și ORF1ab la nivel renal

În cazul țesutului hepatic prelevat, detecția celor trei gene virale a putut fi evidențiată în cazul a 18 pacienți din 35. Două gene virale au fost detectate la 6 pacienți, iar o singură genă virală a fost evidențiată la un număr de doar 3 pacienți. (Figura 29) O asocierie puțin peste 50% s-a observat în cazul detecției genomului viral la nivel hepatic și leziunile necroinflamatorii de tipul distrofiei granular-vacuolare (4 din 7 cazuri), suferinței hepatocitare (5 din 9 cazuri) și prezența infiltratului inflamator limfocitar la nivelul spațiului port (9 din 17 cazuri). Luând în considerare intervalul de zile dintre debutul simptomatologiei infecțioase și decesul, asemenea celorlalte organe studiate până în acest moment, s-a observat o pondere mai crescută a pozitivității țesutului hepatic la examinarea rt-PCR la pacienții cu interval debut deces scurt, 7 cazuri cu interval cuprins între 1 și 3 zile și doar două cazuri cu interval debut-deces de peste 21 de zile, cel mai lung interval fiind de 52 de zile. (Figura 32)



*Figura 36: Prevalența leziunilor histopatologice hepatice la pacienții la care s-au detectat genele N, S și ORF1ab la nivel hepatic*

Examinarea țesutului splenic prin tehnici moleculare de detecție a genomului viral a evidențiat o proporție destul de mare de pacienți din lotul de studiu testat care a prezentat pozitivitate pentru toate cele 3 gene studiate, și anume un număr de 19 cazuri din 35. Doua din cele trei gene virale au fost detectate la un număr de 8 pacienți, iar doar 4 cazuri au prezentat

pozitivitate pentru una din genele N, S sau ORF1ab. (Figura 29). Un procent puțin peste 50% din cazurile ce au prezentat atrofie marcată a pulpei albe, adică un număr total de 12 cazuri din 23 au prezentat pozitivitate la testarea rt-PCR a materialului tisular splenic pentru toate cele 3 gene virale. La fel, leziunile de tipul hipoplaziei pulpei albe, reprezentată de foliculi limfoizi detectați într-un număr mai scăzut, de volum mai mic, fără prezența centrilor germinativi, s-au asociat într-un număr total de 6 din 9 cazuri cu detecția celor trei gene virale la examinarea moleculară. (Figura 39) Pacienții cu evoluție infecțioasă rapidă, fulminantă, au prezentat pozitivitate pentru genele N, S și ORF1ab într-o proporție mult mai crescută față de cei cu evoluție lentă, nefavorabilă. La fel ca și în cazul celorlalte organe studiate, analiza statistică a evidențiat o corelație negativă strânsă între prezența genomului viral la nivel splenic și intervalul lung de timp scurs de la debutul infecției și până la deces, corelație demonstrată printr-un coeficient phi  $\Phi = -0.425$  și relevanță susținută printr-un chi-pătrat de  $X^2(1, 35) = 6.311$  ( $p = 0.012$ ). (Figura 40)

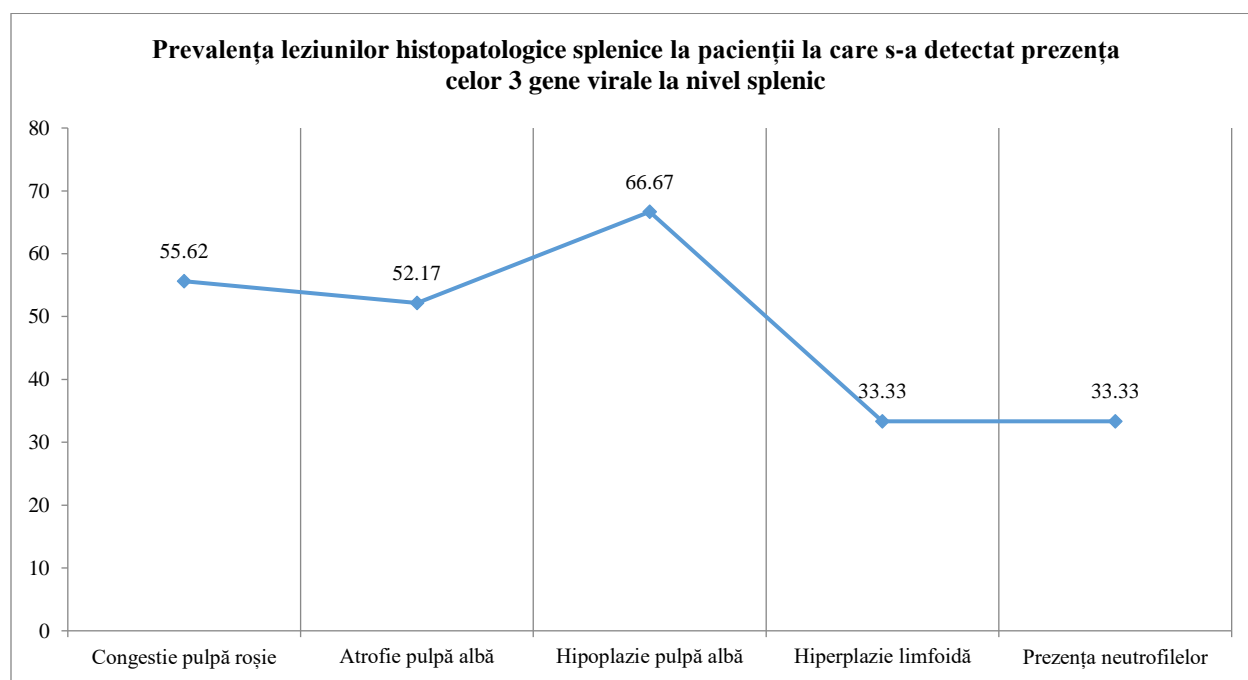
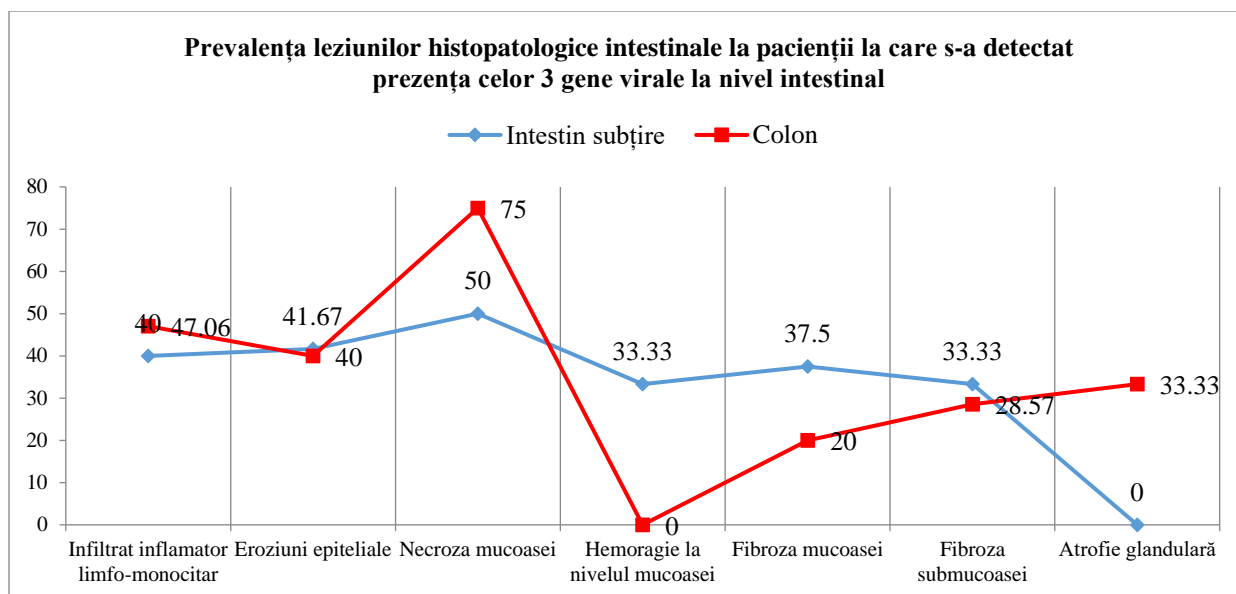


Figura 39: Prevalența leziunilor histopatologice splenice la pacienții la care s-au detectat genele N, S și ORF1ab

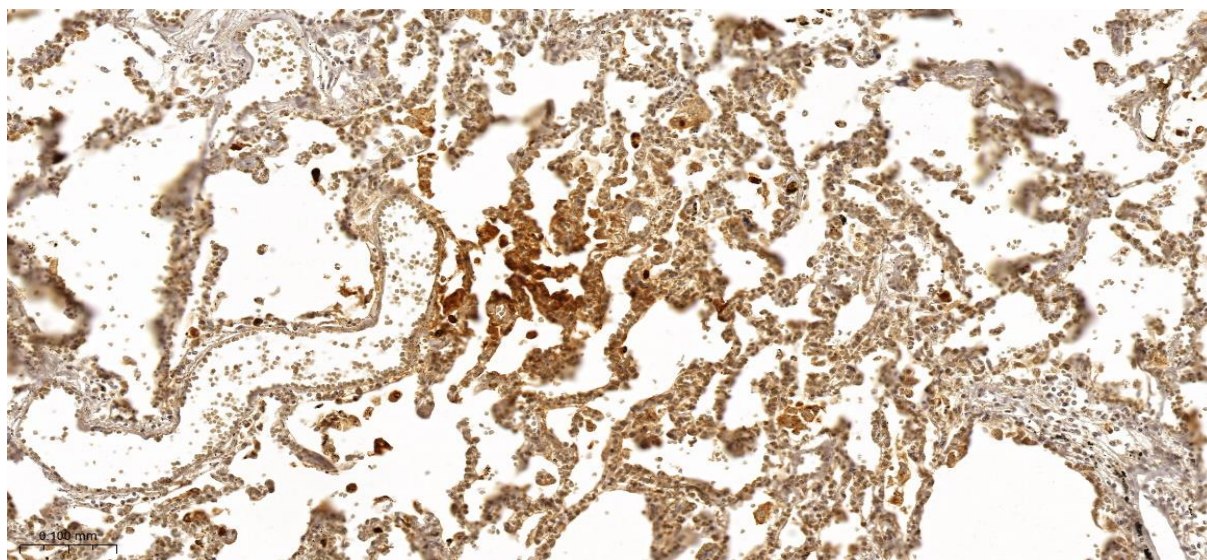
Examinarea, prin reacția de polimerizare în lanț a fragmentelor de intestin subțire prelevate post-mortem, a relevat faptul că după țesutul pulmonar, intestinul subțire are cea mai mare proporție de pozitivitate pentru cele 3 gene ale virusului SARS-CoV-2 studiate, adică un număr de 20 de cazuri dintr-un total de 35 examinate. Două din trei gene virale au fost detectate doar la 3 pacienți, iar o singură genă virală a fost prezentă la doar 4 pacienți. (Figura 29)



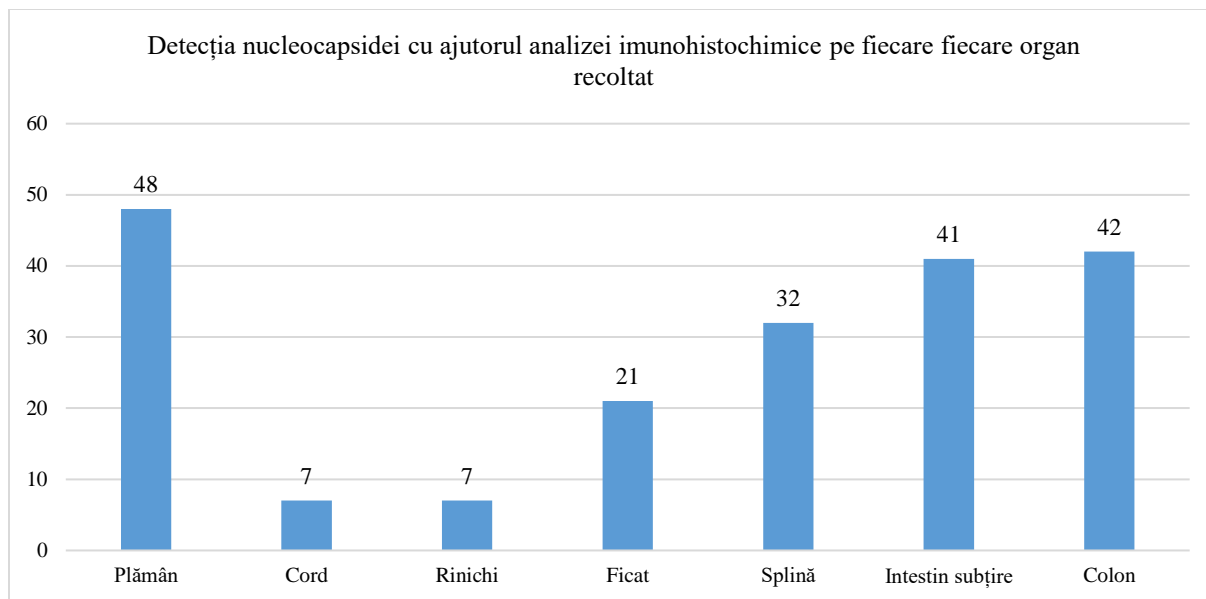
*Figura 41: Prevalența leziunilor histopatologice intestinale la pacienții la care s-au detectat genele N, S și ORF1ab la nivel intestinal*

#### 4.9. EXAMINAREA IMUNOHISTOCHEMICĂ ÎN VEDEREA DETECȚIEI NUCLEOCAPSIDEI VIRALE

Pozitivitatea cea mai intensă la anticorpii anti-nucleocapsidă SARS-CoV-2 a fost, cum era de așteptat, la nivel pulmonar. La un număr de 48 din 56 de cazuri s-a putut detecta prezența nucleocapsidei virale la nivel celular. (Figura 45) Cea mai intensă pozitivitate a fost observată la nivelul pneumocitelor, la un număr de 48 de cazuri. (Imaginea 13)



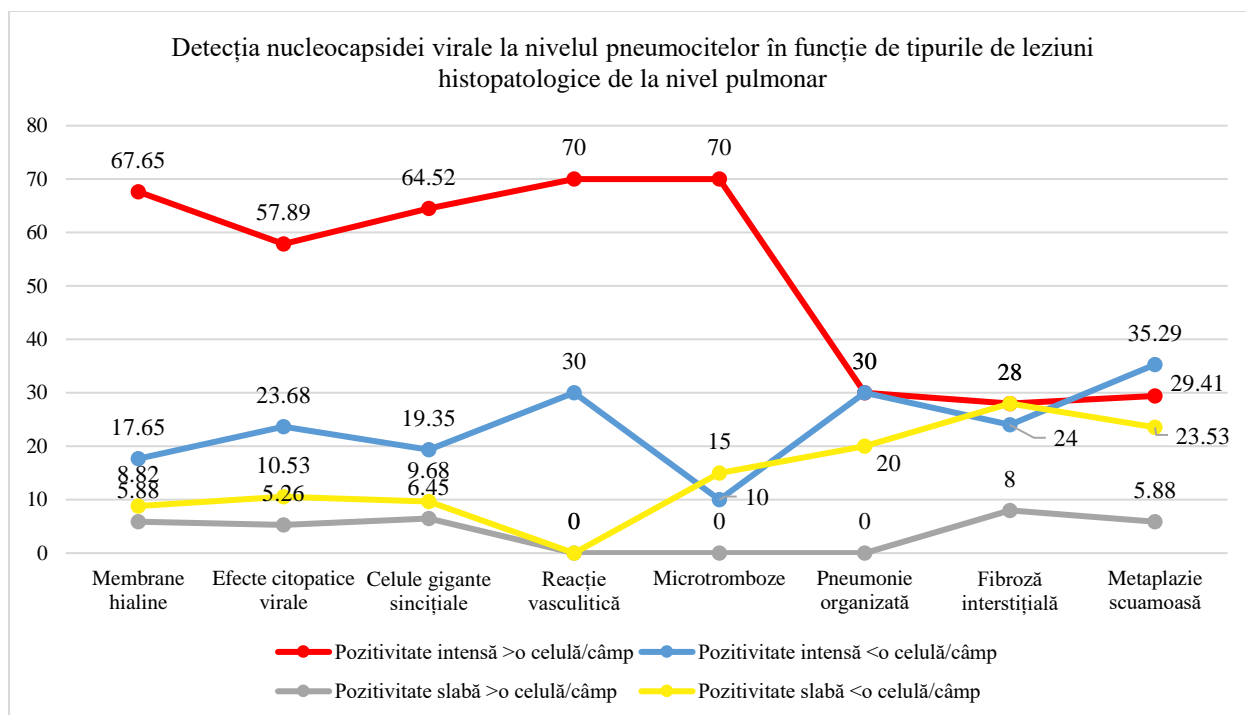
*Imaginea 13 - IHC SARS-CoV-2 11X (Plămân): Pozitivitate intensă, extinsă, pneumocitară*



*Figura 45: Detectia nucleocapsidei virale prin IHC pe fiecare organ recoltat*

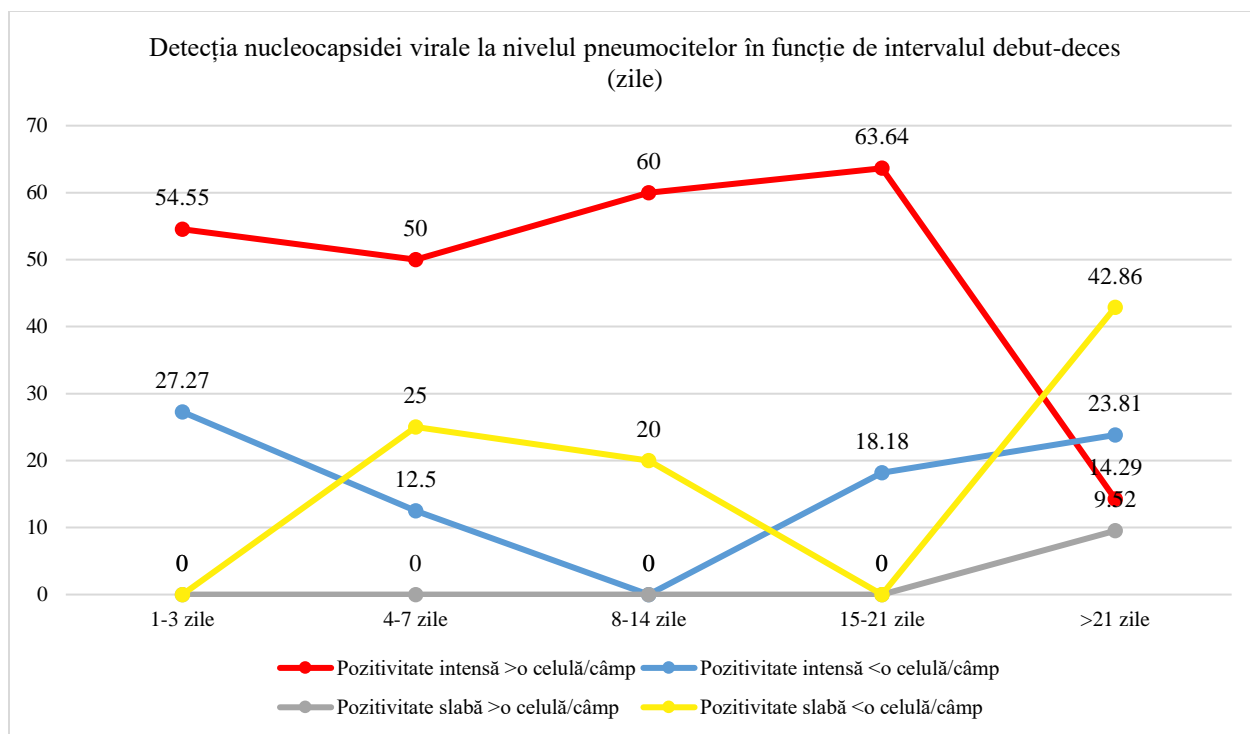
Următoarea frecvență a pozitivității, după cea a pneumocitelor, a fost observată la nivelul membranelor hialine, la pacienții care au prezentat aceste modificări histopatologice, unde un număr de 29 de cazuri au fost pozitive, dintre care 21 au prezentat pozitivitate intensă, iar 8 au prezentat pozitivitate slabă. (Figura 47). 22 de cazuri din lotul de studiu au prezentat pozitivitate la anticorpul anti-nucleocapsidă la nivelul macrofagelor alveolare. (Figura 48) Un alt tip celular de la nivel pulmonar care a prezentat afinitate pentru virusul SARS-CoV-2 a fost reprezentat de fibroblaste, detectia nucleocapsidei realizându-se într-un număr de 19 cazuri, dintre care 12 au prezentat o pozitivitate slabă și doar 7 au prezentat o pozitivitate intensă.

Microtrombii vasculari au fost observați la un număr de 20 de pacienți, dintre care, în cazul a 14 pacienți, la examinarea imunohistochimică s-au decelat numeroase pneumocite intens pozitive (>1celulă/câmp microscopic 400x). Relația strânsă dintre detectia extinsă a nucleocapsidei la nivelul pneumocitelor și formarea de microtrombi vasculari a fost demonstrată și prin analiza statistică ce a decelat chi-pătrat de  $X^2(1, 56) = 8.095$ ,  $p = 0.004$  și un coeficient phi  $\Phi = 0.380$ . În același timp, măsurătorile statistice au evaluat relația dintre detectia extinsă a nucleocapsidei la nivel pulmonar și detectia pneumocitelor cu efecte citopatice virale, respectiv formarea de celule gigante sincițiale pneumocitare.



*Figura 50: Detectia nucleocapsidei virale la nivelul pneumocitelor în funcție de tipurile de leziuni histopatologice decelate la nivel pulmonar*

În urma studierii cazurilor în cazul cărora s-a putut demonstra detectia nucleocapsidei virale la nivelul pneumocitelor în funcție de intervalul de zile dintre debutul bolii infecțioase și deces, s-a observat un pattern imunohistochimic de dinamică ce constă în faptul că intensitatea și extensia pneumocitelor pozitive în speciamentele recoltate depind în cea mai mare parte de numărul de zile care a trecut de la debutul infecției. Astfel, s-a observat că intensitatea și extensia pneumocitelor pozitive pentru virusul SARS-CoV-2 este mai mare la pacienții din lotul de studiu cu debut infecțios cu 1 - 3 zile înaintea decesului. Intensitatea și gradul de afectare pneumocitară ating un platou la pacienții cu debut infecțios cuprins între 4 și 21 de zile, cu mici fluctuații, ca mai apoi să scadă brusc în intensitate și în extensie după 21 de zile, unde se observă doar 3 cazuri din 21 cu pneumocite intens pozitive și extindere peste o celulă pe câmp (Figura 53)



*Figura 53: Gradul de detecție a nucleocapsidei virale la nivelul pneumocitelor în funcție de intervalul de zile dintre debutul bolii și deces*

În urma analizei imunohistochemice folosind anticorpii antinucleocapsidă pe speciamentele recoltate de la nivelul cordului, pozitivitatea a fost detectată doar în cazul a 7 pacienți. (Figura 45) Nucleocapsida a fost detectată la o intensitate crescută la nivelul fibroblastelor interstițiale în toate cele 7 cazuri, iar la nivelul macrofagelor interstițiale, în 6 din 7 cazuri. (Figura 48, Figura 49)

Dacă raportăm aceste rezultate la rezultatul analizei moleculare, din lotul de studiu testat PCR, doar la 5 pacienți s-a putut demonstra prezența nucleocapsidei la nivel celular. Dintre aceștia, la 4 cazuri s-au detectat toate cele trei gene virale studiate (N, S și ORF1ab). (Figura 56)



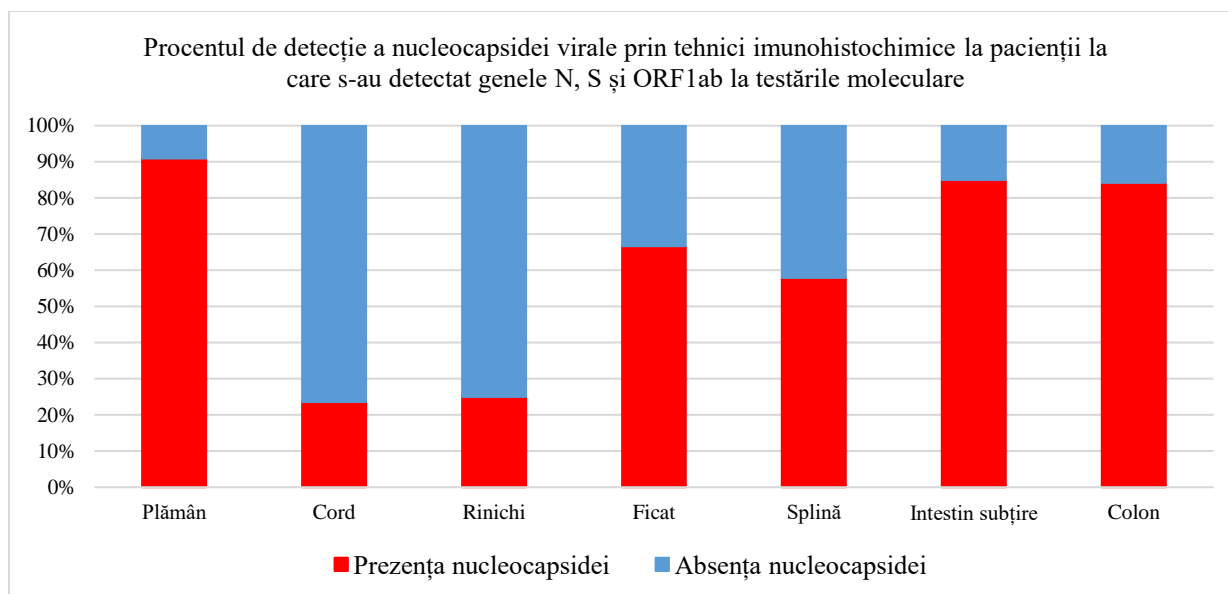


Figura 56: Procentul de detecție a nucleocapsidei virale prin IHC la pacienții la care s-au detectat genele N, S și ORF1ab

În ceea ce privește coroborarea rezultatelor imunohistochimice cu cele histopatologice, s-a observat că acestea din urmă nu au fost declanșate de prezența virusului la nivel miocardic, în afară de leziunile de miocardită, dar a existat o corelație între prezența nucleocapsidei virale și leziunile microstructurale miocitare și efectele citopatice miocitare. (Figura 57, Figura 58)

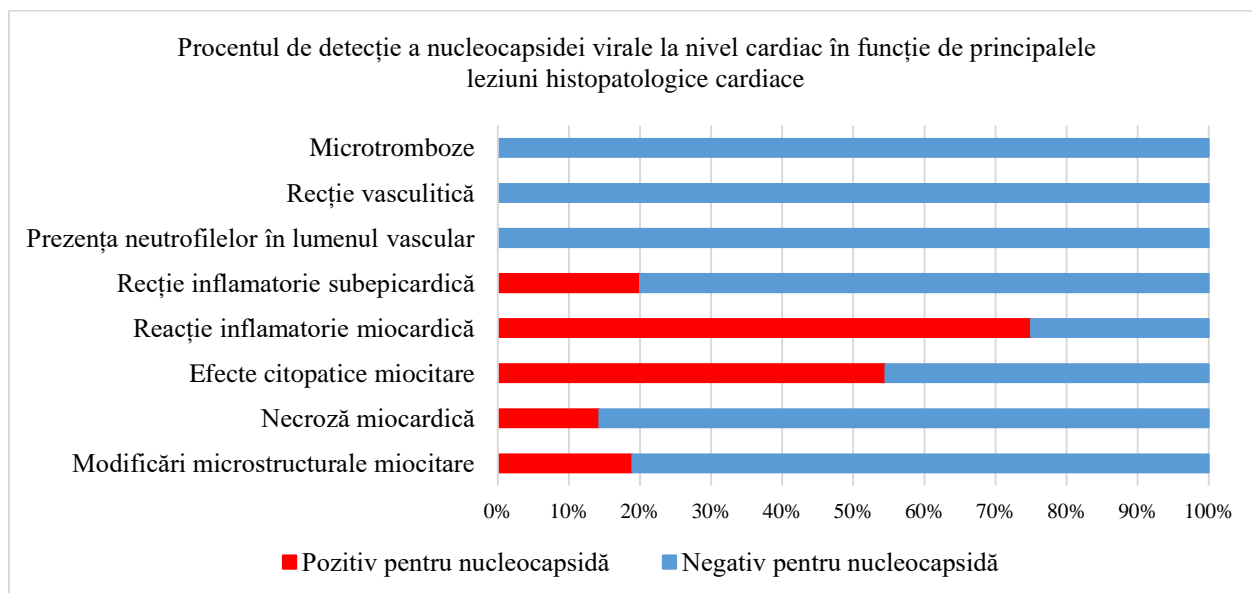
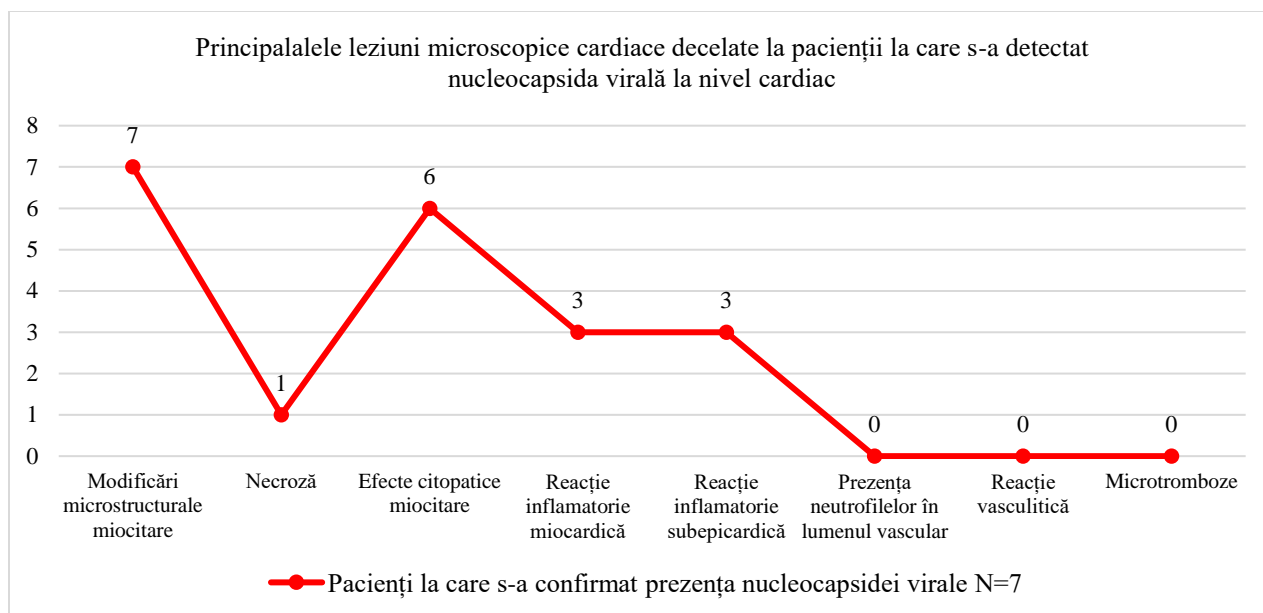
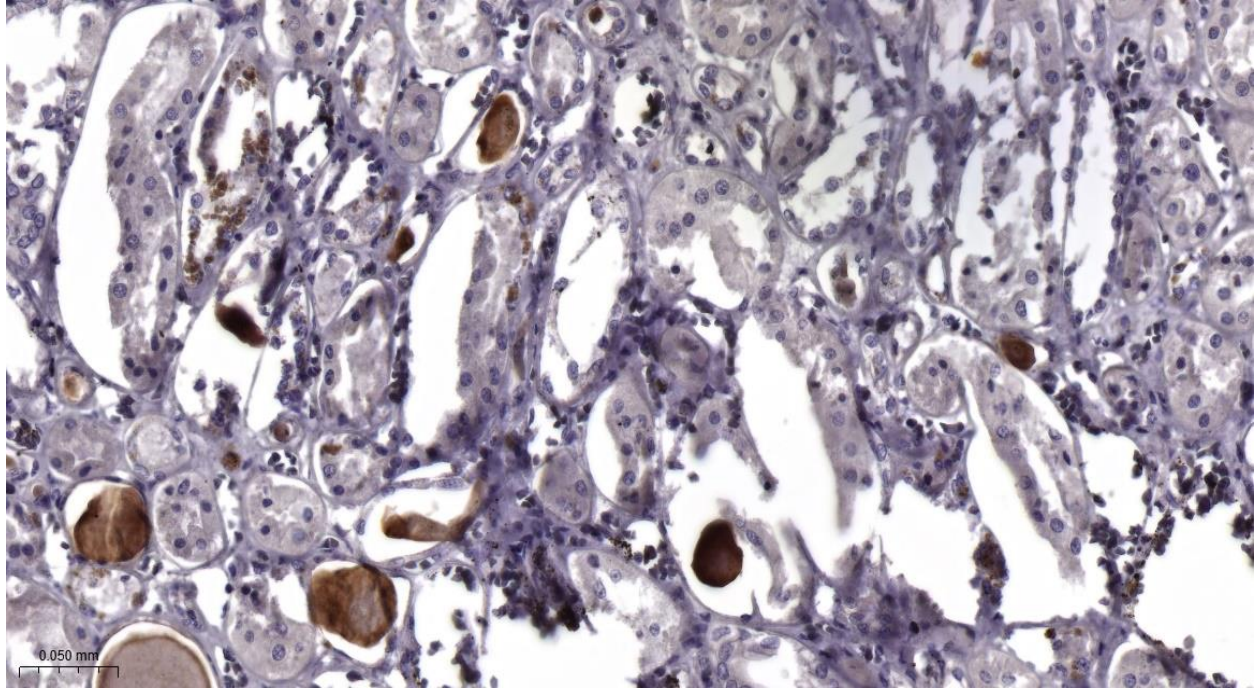


Figura 57: Procentul de detecție a nucleocapsidei virale la nivel cardiac în funcție de principalele leziuni histopatologice cardiace

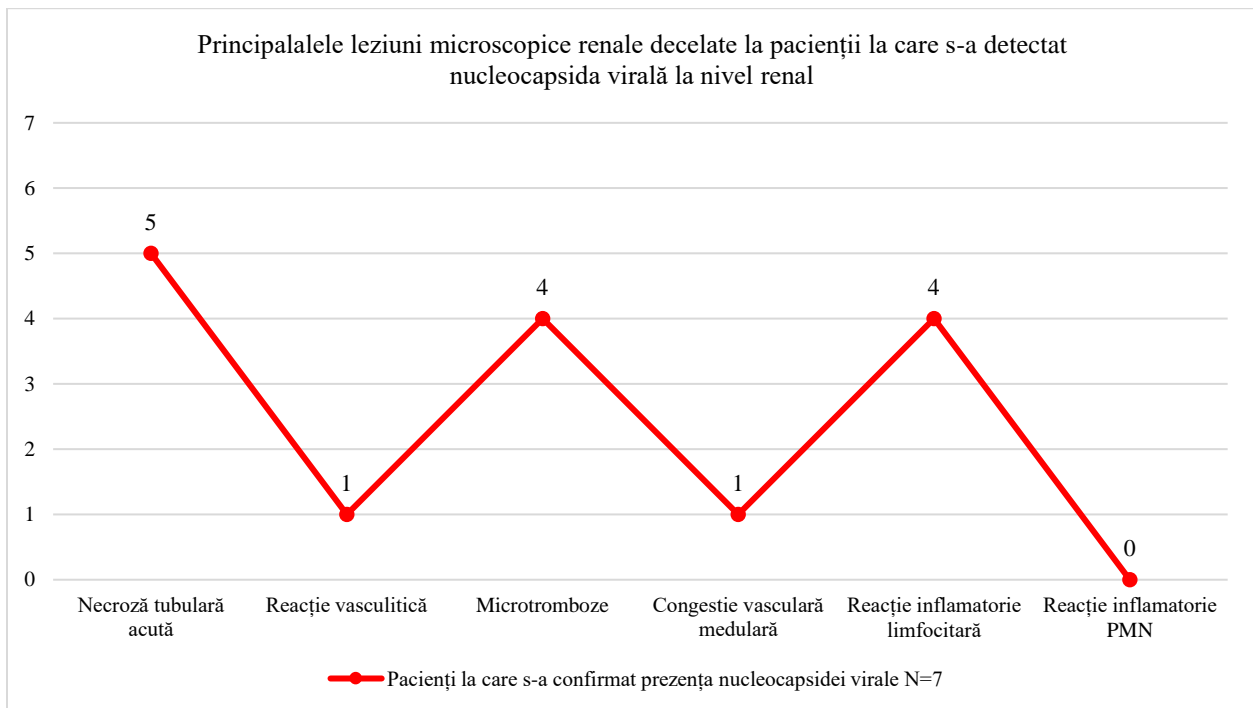


*Figura 58: Principalalele leziuni microscopice cardiace decelate la pacienții la care s-a detectat nucleocapsida virală la nivel cardiac*

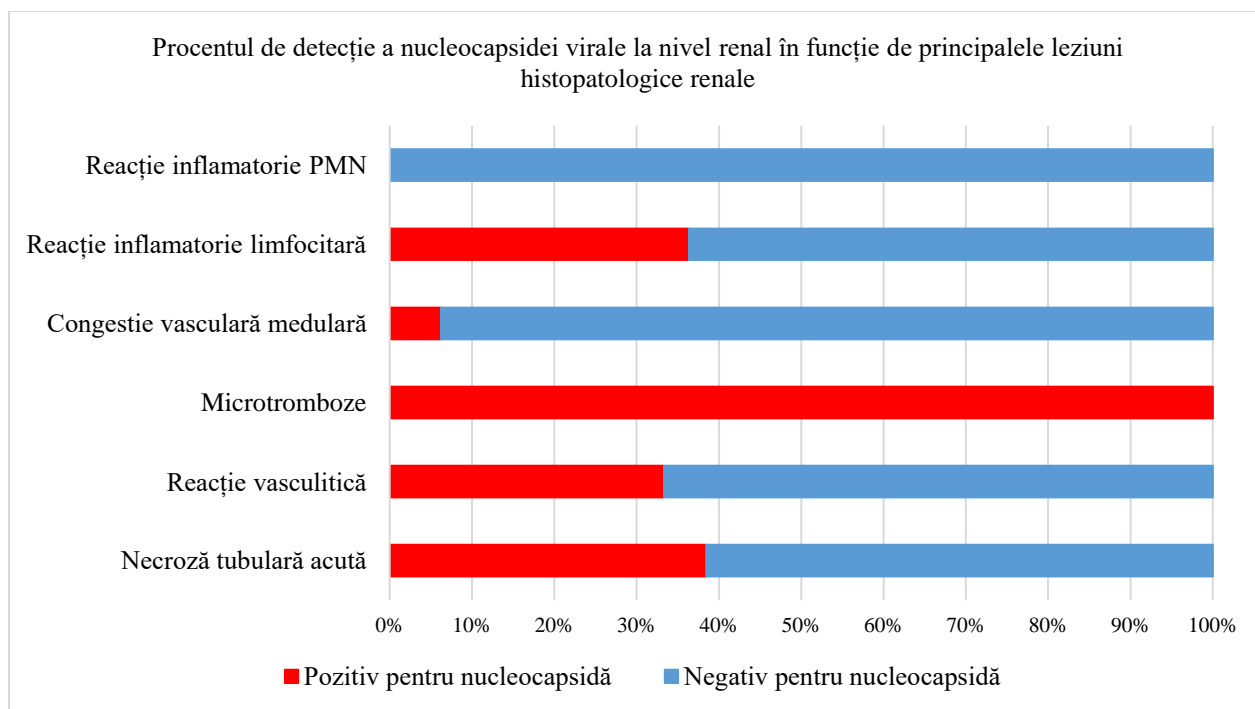
În urma analizei imunohistochimice pe țesutul renal prelevat post-necroptic, s-a observat o pozitivitate limitată, de intensitate slabă, doar la nivelul epiteliului tubular (Imaginea 14) în cazul a 7 din 56 de pacienți. (Figura 45) Comparând rezultatele imunohistochimice cu cele ale analizei moleculare, s-a observat același pattern ca și în cazul cordului. 5 pacienți din lotul testat molecular au prezentat pozitivitate la nivelul celulelor tubulare pentru nucleocapsida virală, iar la 4 dintre acești s-au putut detecta genele N, S și ORF1ab, cu ajutorul rt-PCR. (Figura 56) Coroborând rezultatele imunohistochimice cu analiza histopatologică, s-a observat că doar în cazul microtrombozelor a existat într-adevăr o asociere, unde 4 din 4 cazuri la care s-a observat prezența microtrombilor vasculari au prezentat și nucleocapsidă virală la nivelul epiteliului tubular. Necroza tubulară acută a fost prezentă la 5 din 7 pacienți (Figura 60) la care s-a putut observa prezența nucleocapsidei în parenchimul renal.



*Imaginea 14 - IHC SARS-CoV-2 21.7X (Rinichi): Pozitivitate la nivelul celulelor tubulare detașate și la nivelul cilindrilor hialini*

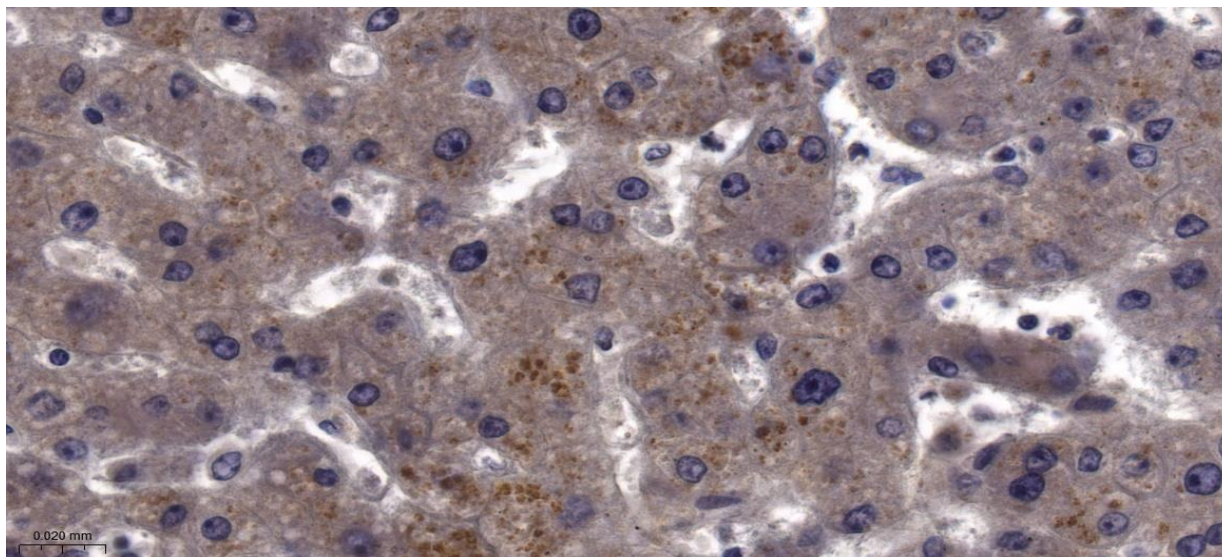


*Figura 60: Principalalele leziuni microscopice renale decelate la pacienții la care s-a detectat nucleocapsida virală la nivel renal*

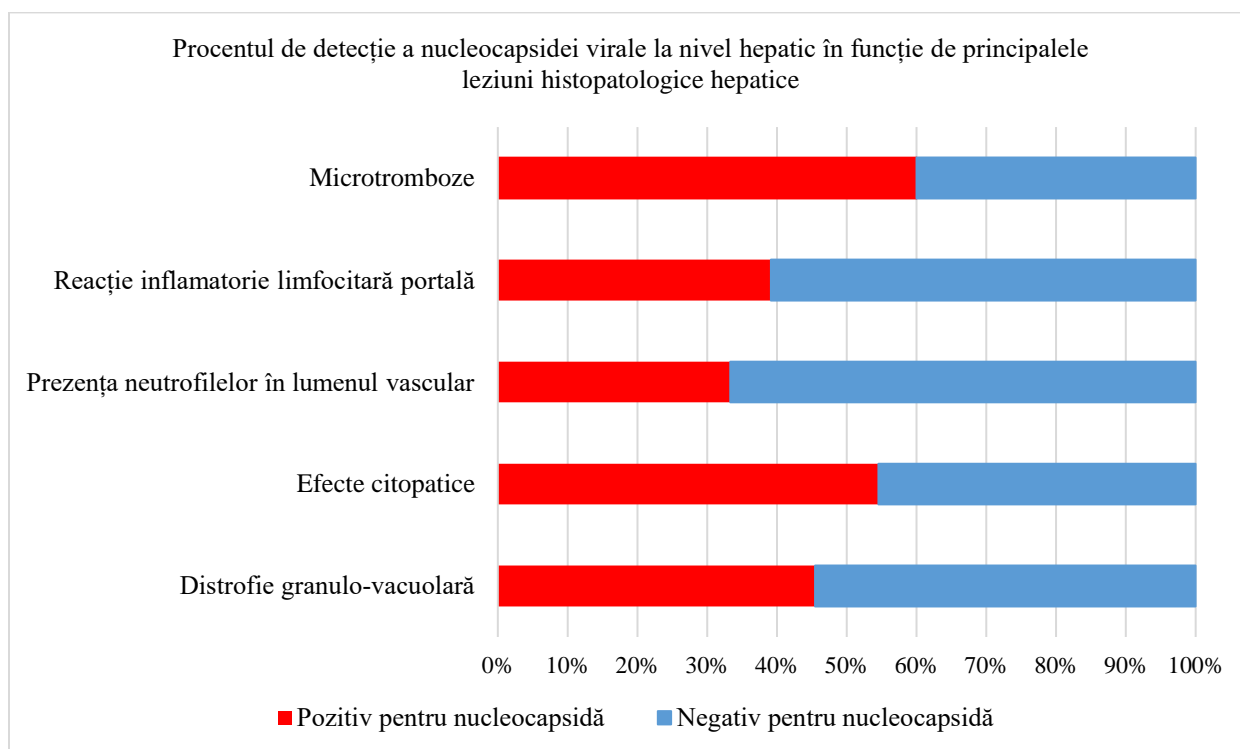


*Figura 61: Procentul de detecție a nucleocapsidei virale la nivel renal în funcție de principalele leziuni histopatologice renale*

Nucleocapsida virusului SARS-CoV-2 a putut fi detectată la nivel hepatic prin tehnici de imunohistochimie în trei tipuri celulare distincte cum ar fi hepatocitele, celulele Kuppfer și fibroblastele interstițiale. (Imaginea 15) Dintre acestea, cele mai numeroase celule pozitive au fost hepatocitele, într-un număr de 16 cazuri, dintre care 12 cazuri au prezentat pozitivitate intensă la acest nivel, iar 4 cazuri, o pozitivitate slabă. (Figura 55) Celulele Kuppfer au urmat hepatocitele în ceea ce privește frecvența pozitivității la nucleocapsidă, observate într-un număr de 15 cazuri, toate având o pozitivitate intensă la acest nivel. (Figura 48) Detecția nucleocapsidei la nivelul fibroblastelor a fost observată în 9 cazuri, din care 5 au fost intens pozitive, iar 4 slab pozitive la acest nivel. (Figura 49) Dintre cele 17 cazuri din lotul de studiu testat molecular care au prezentat pozitivitate pentru nucleocapsida virală în cel puțin un tip celular menționat anterior, la 13 dintre acestea s-a putut realiza detecția genelor N, S și ORF1ab la nivelul specimenelor hepatice recoltate, la 3 cazuri s-a observat prezența a două din trei gene virale, iar la un singur caz rezultatul a fost unul negativ pentru toate cele 3 gene virale. (Figura 56)



*Imaginea 15 - IHC SARS-CoV-2 48.4X (Ficat): Pozitivitate la nivel hepatocitar.*

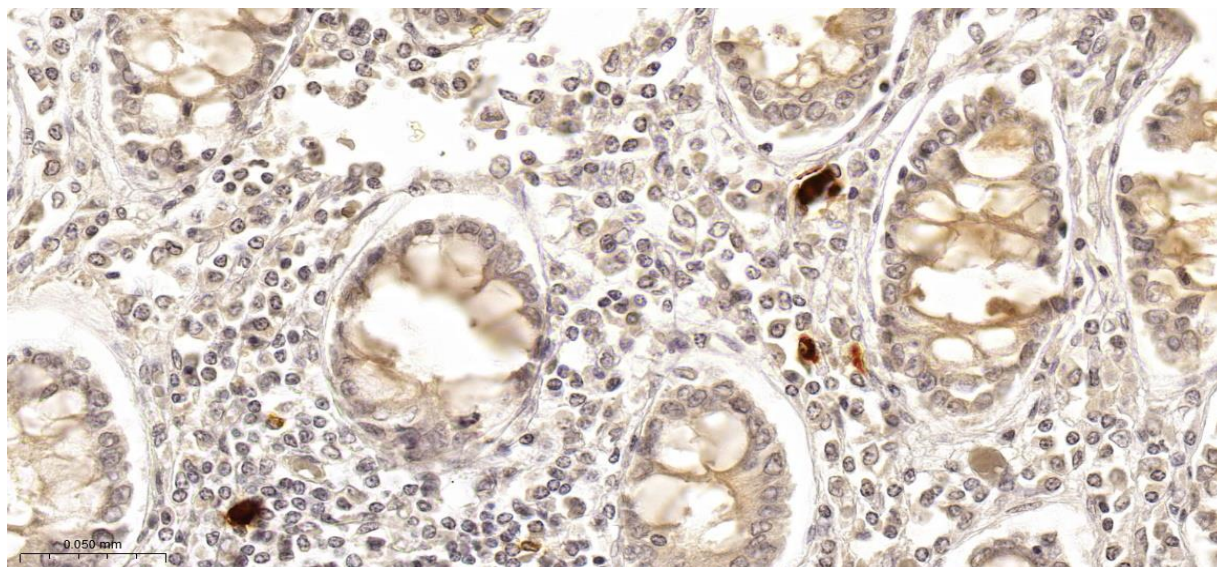


*Figura 63: Procentul de detecție a nucleocapsidei virale la nivel hepatic în funcție de principalele leziuni histopatologice hepatice*

La nivelul specimenelor recoltate de la nivel splenic, detecția nucleocapsidei prin tehnici de imunohistochimie a fost evidențiată la un număr de 32 de cazuri din lotul de studiu (Figura 45)

și la un număr de 20 de cazuri din lotul testat prin tehnici moleculare. Dintre acești 20 de pacienți, la un număr de 12 s-a putut detecta și prezența genelor N, S și ORF1ab la nivel splenic, la 5 dintre aceștia s-au detectat doar două din cele trei gene studiate iar la restul de 3 s-a detectat doar una din cele 3 gene ale virusului SARS-CoV-2. Din cele 19 cazuri pozitive pentru toate cele 3 gene virale la testarea rt-PCR, în doar 7 cazuri nu s-a evidențiat nucleocapsida la nivelul celulelor splenice. (Figura 56) Având în vedere intervalul dintre debutul infecției virale și deces, ponderea cea mai mare este reprezentată de categoria cuprinsă între 4 și 7 zile, cu 7 din 8 cazuri la care s-a putut determina prezența nucleocapsidei la nivelul țesutului splenic, urmată de categoria cuprinsă între 15 și 21 de zile, cu 7 din 11 cazuri pozitive la nucleocapsidă și de categoria cu debut de peste 21 de zile, reprezentate de 11 din 21 de cazuri pozitive la nucleocapsida virală.

În urma analizei imunohistochimice la nivel intestinal, 42 de pacienți au prezentat pozitivitate pentru anticorpul anti-nucleocapsidă SARS-CoV-2 la nivelul intestinului subțire, iar 41 de pacienți, la nivelul colonului. (Figura 45) Detecția nucleocapsidei s-a stabilit ca fiind în celulele stromale de la nivelul laminei propria, în principal la nivelul macrofagelor. (Imaginea 16) Dintre cei 20 de pacienți la care s-a putut realiza detecția celor trei gene la nivelul intestinului subțire, 17 au fost pozitivi și pentru nucleocapsida virală în urma analizei imunohistochimice. (Figura 56) Discrepanța este observată totuși la totalul de pacienți pozitivi la nucleocapsidă din lotul testat molecular, unde din 28 de pacienți, doar 17 au prezentat cele 3 gene virale. (Figura 65)



*Imaginea - IHC SARS-CoV-2 32.7X (Intestin): Pozitivitate la nivelul macrofagelor din lamina propria*

#### **4.10. ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ, IMUNOHISTOCHEMICĂ ȘI MOLECULARĂ LA FEȚII MORȚI ANTE-PARTUM PROVENIȚI DE LA MAME CU INFECȚIE COVID-19**

Lotul de studiu actual a cuprins și doi fetoși decedați antepartum, proveniți de la mame diagnosticate cu infecție cu virusul SARS-CoV-2. În urma examenului extern și intern al cadavrelor, nu au fost constatate anomalii specifice. Examenul histopatologic al placentei din cel de-al doilea caz, a evidențiat zone lezionale difuze la nivelul vililor, cu necroză trofoblastică, interviloasă cronică, depunere de fibrină periviloasă și infiltrat inflamator perivilos difuz, format din limfocite și câteva neutrofile. Am identificat, de asemenea, o zonă extinsă de hemoragie placentară în apropierea plăcii bazale. Toate aceste anomalii microscopice corespund cu diagnosticul de placentită acută. În urma analizei prin RT-PCR în timp real, placenta, cordonul ombilical, creierul, plămâni și ficatul au fost toate pozitive pentru genele N, S și ORF1ab ale virusului SARS-CoV-2. Intestinul gros a fost pozitiv exclusiv pentru gena N, în timp ce în rinichi a fost prezentă doar gena S. După analiza imunohistochemică folosind anticorpul anti nucleocapsidă SARS-CoV-2, placenta a prezentat o pozitivitate focală intensă a sincițiotrofoblastului. În ceea ce privește cordonul ombilical, prezența nucleocapsidei a fost detectată exclusiv la nivelul pereților vaselor de sânge, mai exact în citoplasma celulelor endoteliale. Plămâni au arătat, de asemenea, o pozitivitate intensă la nivelul pneumocitelor de tipul II. Primul caz prezentat a avut modificări nespecifice la analiza histopatologică, iar detecția genomului viral și a nucleocapsidei virale nu a putut fi demonstrată.

## **5. DISCUȚII**

În urma analizei histopatologice, imunohistochemice și moleculare a lotului de studiu actual, s-a reușit trasarea unui model patogenetic, fizio- și morfopatologic, coroborat și cu rezultatele altor studii de actualitate. Astfel, după finalizarea studiului, înțelegerea mecanismelor prin care virusul SARS-CoV-2 acționează în gazda umană au fost parțial deslușite, lăsând loc, bineînțeles, ca alte studii, pe aceeași temă, să îmbunătățească și să dezvolte cunoștințele privind noua infecție virală ce a reușit să oprească societatea în loc pentru o perioadă de timp.

Genul masculin cu vârsta cuprinsă între 60 și 80 de ani domină lotul de studiu actual. Un studiu epidemiologic publicat în 2021 oferă informații utile cu privire la epidemiologia infecției cu virusul SARS-CoV-2 în mai multe state ale lumii. Acest studiu face referire la numărul de

cazuri detectate pozitiv și nu la numărul de cazuri diagnosticate cu pneumonie severă sau numărul de cazuri de deces. Astfel, ponderea cea mai mare de cazuri pozitive a fost observată la grupa de vârstă 50-59 de ani, în China și Germania, la grupa de vârstă de 20-29 de ani în Coreea și la cei peste 80 de ani, în Italia. [105] În cazul deceselor, studiile din literatura de specialitate, pe eșantioane mari de pacienți din Germania, Belgia, Elveția, Norvegia, Spania, Italia, Franța sau România, au coroborat teoria că pacienții de gen masculin, cu vârste peste 60 de ani, au cel mai mare risc de deces secundar infecției cu virusul SARS-CoV-2.[106,107,108,109]

În cazul analizei statistice cu privire la perioada de internare la acești pacienți, majoritatea, adică un număr de 26 de cazuri, a avut o perioadă de internare scurtă cuprinsă între o zi sau câteva ore și 3 zile. Aceleași rezultate au fost exprimate și de un studiu din Belgia care a concluzionat că media de spitalizare la persoanele decedate în urma infecției cu virusul SARS-CoV-2 a fost de 5.7 zile, demonstrând astfel faptul că formele de pneumonie SARS-CoV-2 cu evoluție fulminantă au un risc înalt de deces. [111]

Cu privire la intervalul de zile dintre debutul bolii, respectiv confirmarea bolii infecțioase, la pacienții care nu au putut relata cu exactitate data apariției primelor simptome și deces, ponderea a fost una variabilă, fiecare interval debut-deces având aproximativ același număr de cazuri, cei mai mulți fiind incluși totuși în intervalul debut-deces peste 21 de zile. Rezultate similare au fost observate și în literatura de specialitate, cu un interval mai scăzut față de cel observat în studiul actual și anume: Verity R. et al. stabilesc o medie între debutul simptomatologic și deces de 17.8 zile [112]; Baud D. et al. elaborează un interval cuprins între 2 și 8 săptămâni ca având incidența cea mai mare de deces la pacienții confirmați cu infecție SARS-CoV-2 [113]; Madabhavi I. et al. studiază decesele cu interval debut infecțios - deces cuprinse între 6 și 41 de zile, cu o medie de 14 zile [114], iar Qiurong R. et al observă două vârfuri de incidență în cazul deceselor, unul la 14 zile, iar celalalt la 22 de zile de la debutul infecției. [115]

Principalele comorbidități decelate în lotul de studiu actual au fost reprezentate, în cel mai mare procentaj, de bolile cardiovasculare, urmate de cele metabolice, apoi de cele pulmonare. Aceste rezultate au fost susținute și de alte studii din literatura de specialitate, unde majoritatea autorilor au încoronat bolile cardiovasculare ca fiind cele mai frecvente la pacienții decedați în urma infecției cu virusul SARS-CoV-2, urmate de diabetul zaharat și obezitatea. [116,117,118,119,120,121,122,123]



În cadrul plămânului, întreg pachetul de leziuni depistate la examinarea microscopică a fost împărțit în trei mari categorii: leziuni acute (cele mai numeroase), modificări regenerative aberante și leziuni cronice asociate. În cadrul leziunilor acute s-au observat mai multe tipuri de modificări microscopice cuprinse fie în spectrul leziunilor inflamatorii sau alveolare, fie a leziunilor vasculare sau leziunilor hemodinamice. Incidența cea mai mare în lotul de studiu actual a fost reprezentată de infiltratul inflamator limfo-monocitar, prezent în 78.57% din cazuri, urmat de cel polimorfonuclear, prezent în 62.5% din cazuri, și, nu în ultimul rând, de cel macrofagic, cu un procent de 50%. În cadrul leziunilor alveolare, în 91.07% din totalul de cazuri s-a observat un grad de hiperplazie de pneumocite de tip II. Efectele citopatice pneumocitare au avut o pondere de 67.87% din totalul de cazuri, urmate de prezența membranelor hialine, cu un procent de 60.71% din cazuri. Celulele gigante multinucleate au fost observate în 55.36% din cazuri. Efectele citopatice virale ale pneumocitelor, observate într-un număr reprezentativ de cazuri, cât și prezența sincițiilor pneumocitare, sugerează infecția directă a acestor celule de către agentul patogen și a fost confirmată prin detecția nucleocapsidei virale, prin tehnici de imunohistochimie, la nivelul acestor celule, într-un număr de 48 de cazuri.

Leziunile vasculare au făcut parte din spectrul histopatologic al infecției cu virusul SARS-CoV-2 de la nivel pulmonar împreună cu leziunile alveolare descrise anterior. Acestea au fost reprezentate de prezența microtrombilor în lumenul vaselor mici sau medii într-o proporție de 35.71% din cazuri și de o reacție inflamatorie limfocitară la nivelul pereților vaselor mici intrapulmonare într-o proporție de 17.86% din cazuri. Există mai multe studii în literatura de specialitate ce confirmă prezența acestor leziuni, printre care Satturwar S. et al. ce descriu microtromboze în 59% din cazurile studiate și leziuni vasculare de tipul endotelitei limfocitare sau capilaritei, la fel mediate de limfocite și fără prezența necrozei fibrinoide, în 21% din cazuri. [151]

În lotul de studiu actual, leziunile regenerative aberante din cadrul leziunilor alveolare difuze au fost observate constant și au fost subîmpărțite în stadiile incipiente, în pneumonie în formă organizată, iar cele tardive, în fibroză interstițială extinsă și metaplazie scuamoasă a epitelului alveolar. Cele mai frecvente leziuni din această categorie au fost reprezentate de fibroza interstițială extinsă, cu un procent de 44.64% din cazuri, urmate de metaplazia scuamoasă, cu un procent de 30.36% din cazuri și, nu în ultimul rând, de pneumonia în formă organizată, cu un procent de 17.86% din cazuri. Raportat la intervalul dintre debutul bolii infecțioase și deces, s-a

observat că aceste leziuni au o creștere semnificativă la 15 zile de la debut și ating un vârf la pacienții decedați după 21 de zile de la debut. Aceleași rezultate au fost evidențiate și în alte studii din literatura de specialitate. [134,137,151]

Analiza moleculară pentru detecția celor trei gene virale N, S și ORF1ab folosind rt-PCR din speciunile recoltate de la nivel pulmonar în cazul a 35 de pacienți din lotul de studiu, a evidențiat o detecție marcat crescută la acest nivel. Astfel, în 33 de cazuri din 35 s-au evidențiat toate cele trei gene virale studiate la nivelul parenchimului pulmonar.

În cazul analizei imunohistochemice folosind anticorpul anti-nucleocapsidă SARS-CoV-2 s-a observat o detecție în 48 din 56 de cazuri. Cea mai intensă pozitivitate a fost observată la nivelul pneumocitelor, astfel detecția putându-se realiza la nivelul pneumocitelor de tip II, majoritatea prezentând efecte citopatice virale sau formând celule gigante sincițiale, la un număr de 48 de cazuri. Detecția intensă și difuză a nucleocapsidei la nivel pneumocitar s-a asociat într-o proporție extrem de mare cu leziunile alveolare difuze din fază exudativă, ca mai apoi intensitatea și extensia detecției la nivelul acestor celule să scadă brusc în faza fibrotică a leziunilor alveolare difuze.

Analiza histopatologică de la nivel cardiac a evidențiat o serie de leziuni care au fost categorizate ca fiind leziuni ale miocitelor în cazul a 37 de pacienți, leziuni de natură inflamatorie în cazul a 22 de pacienți, leziuni vasculare în cazul a doar 7 pacienți și, nu în ultimul rând, leziuni cronice asociate, evidențiate la un număr total de 42 de pacienți. În cadrul leziunilor acute miocitare, de natură inflamatorie sau vasculară, incidența cea mai mare o constituie modificările microstructurale miocitare de natură ischemică, cu un procent de 66.07% din cazuri, urmate de prezența unui infiltrat inflamator limfo-monocitar la nivel subepicardic, cu un procent de 26.79%, apoi de modificările de citopatie miocitară, sau așa numita suferință a miocitelor, într-o proporție de 19.05% din cazuri. Necroza miocardică propriu-zisă a fost observată doar în 12.05% din cazuri, iar microtrombozele doar în 10.71% din cazuri. Prezența neutrofilelor în lumenul vascular care relevă un status hiperinflamator a fost reprezentată de un procent de 14.29% din cazuri. În cazul cordului, detecția genelor N, S și ORF1ab au fost reprezentate doar de 17 cazuri din 35 studiate, cu 4 cazuri la care s-au detectat doar 2 din 3 gene virale, iar 5 cazuri la care s-a putut demonstra prezența unei singure gene virale. Analiza imunohistochemică a relevat faptul că doar la 7 din 56 de pacienți s-a putut detecta nucleocapsida la nivel tisular cardiac din care, în toate cele 7 cazuri,

deteția s-a realizat la nivelul fibroblastelor interstițiale, în 6 din 7 cazuri și la nivelul macrofagelor tisulare și doar într-un singur caz s-a observat o reacție slab pozitivă la nivelul miocitelor.

Principalele modificări histopatologice de la nivel renal au fost cele de natură cronică, reprezentative pentru un număr de 30 de cazuri, urmate de modificări de natură vasculară acută prezente la un număr de 23 de cazuri. Infiltratele inflamatorii au fost prezente la un număr de 20 de pacienți din lotul de studiu, iar leziunile tubulare acute doar la 13 pacienți. Ponderea cea mai mare a leziunilor acute a fost reprezentată de infiltratul inflamator limfomonocitar interstițial, cu o incidență de 37.5% din cazuri, urmată de congestia vasculară de la nivelul medularei renale, cu un procent de 28.57% și de leziunile tubulare acute, cu un procent de 23.21%. După studierea amănunțită a literaturii de specialitate, se observă același pattern histologic descris și în studiul nostru, doar că, anumiți autori au demonstrat o incidență mai mare a leziunilor acute, în principal cele ale tubilor renali. [175]

Pentru o mai bună imagine a mecanismelor care stau la baza leziunilor renale, s-au elaborat analize moleculare și teste imunohistochimice. În urma examinării prin tehnica rt-PCR a materialelor tisulare prelevate de la nivel renal s-a stabilit că un număr de 16 din 35 de cazuri au fost pozitive pentru genele S, N și ORF1ab, 7 cazuri au fost pozitive doar pentru două dintre acestea, iar 5 cazuri au fost pozitive doar pentru o singură genă virală. În urma analizei imunohistochimice pe țesutul renal prelevat post-necroptic, s-a observat o pozitivitate limitată, de intensitate slabă, doar la nivelul epitelului tubular în cazul a 7 din 56 de pacienți. Un număr total de 5 pacienți din lotul de 35 testat molecular au prezentat pozitivitate la nivelul celulelor tubulare pentru nucleocapsida virală, iar la 4 dintre aceștia s-au putut detecta toate cele 3 gene virale.

În urma examinării histopatologice hepatice s-a observat că ponderea cea mai mare de leziuni microscopice au fost reprezentate de cele cronice asociate, urmate de leziunile necroinflamatorii hepatocitare și, într-un număr foarte limitat, de leziunile vasculare. Prezența infiltratului inflamator limfo-monocitar la nivelul spațiului port a avut incidența cea mai mare dintre leziunile acute, cu 41%, urmate de distrofii granulo-vacuolare și efecte citopatice hepatocitare, fiecare cu o incidență de 20%. Prezența neutrofilelor în lumenul vascular a fost observată la un procent de 11% din cazuri, iar microtrombii vasculari la un procent de 9% din cazuri. Peste 50% din cazuri au avut ca modificări cronice asociate steatoza hepatică, urmată de fibroza portală cu 40% incidență. Același pattern lezional hepatocitar a fost descris și de alți autori în literatura de specialitate. [177,181]

Detecția celor trei gene virale prin rt-PCR a putut fi evidențiată în cazul a 18 pacienți din 35. O asociere puțin peste 50% s-a observat în cazul detecției genomului viral la nivel hepatic și leziunile necroinflamatorii de tipul distrofiei granulo-vacuolare (4 din 7 cazuri), suferinței hepatocitare (5 din 9 cazuri) și prezența infiltratului inflamator limfocitar la nivelul spațiului port (9 din 17 cazuri). Nucleocapsida virusului SARS-CoV-2 a putut fi detectată la nivel hepatic prin tehnici de imunohistochimie în trei tipuri celulare distincte, cum ar fi hepatocitele, celulele Kupffer și fibroblastele interstițiale. Dintre acestea, cele mai numeroase celule pozitive au fost hepatocitele, într-un număr de 16 cazuri.

Modificările histopatologice de la nivelul parenchimului splenic au cuprins în cea mai mare parte dezorganizare la nivelul pulpei albe. Atrofia pulpei albe a avut un raport direct proporțional cu evoluția lentă nefavorabilă a infecției virale, fiind prezentă la un procent puțin peste 50% din totalul cazurilor cu debut infecțios de peste 21 de zile înaintea decesului și doar la 7 din 19 pacienți cu evoluție rapidă, fulminantă.

Examinarea țesutului splenic prin tehnici moleculare de detecție a genomului viral a evidențiat o proporție destul de mare de pacienți din lotul de studiu testat care au prezentat pozitivitate pentru toate cele 3 gene studiate, respectiv un număr de 19 cazuri din 35. Două din cele trei gene virale au fost detectate la un număr de 8 pacienți, doar 4 cazuri prezentând pozitivitate pentru una din genele N, S sau ORF1ab. Detecția nucleocapsidei prin tehnici de imunohistochimie a fost evidențiată la un număr de 32 de cazuri din lotul de studiu total de 56 de pacienți și la un număr de 20 de cazuri din lotul testat prin tehnici moleculare (N=35) și a fost observată la nivelul macrofagelor, confirmate prin pozitivitate la CD68. Aproape 60% dintre pacienții la care s-a demonstrat prezența genomului viral au prezentat și nucleocapsida la nivel splenic. Atât detecția nucleocapsidei, cât și detecția celor trei gene virale studiate, au fost evidente în primele 21 de zile de la debutul infecției, ca mai apoi detecția să scadă brusc la pacienții cu debut peste 21 de zile înaintea decesului.

În cadrul examinării intestinului subțire și colonului s-au observat numeroase modificări, majoritatea nespecifice. Un număr de 2 cazuri au prezentat, la nivelul intestinului subțire, leziuni inflamatorii de tipul infiltratului inflamator neutrofilic, iar la nivelul colonului, același tip de leziune s-a observat într-o proporție mai mare, adică într-un număr de 6 specimene. O pondere mai ridicată de cazuri a prezentat leziuni inflamatorii mediate de un infiltrat inflamator limfomonocitar, adică un total de 21 de cazuri la nivelul intestinului subțire și, respectiv, un total de 24

de cazuri la nivelul colonului, fiind și cea mai frecventă leziune observată. Eroziunile epiteliale au fost observate într-o proporție de 29%, respectiv 30% la nivel intestinal. Necroza mucoasei intestinale a fost observată mai frecvent la nivelul colonului, cu o incidență de 12.5%, față de 7.14% în cazul intestinului subțire. În schimb, hemoragia de la nivelul mucoasei a avut o incidență mai crescută la nivelul intestinului subțire față de colon (7.14% față de 3.57%).

Detecția celor trei gene virale studiate a fost evidentă pentru un număr de 20 de cazuri dintr-un total de 35 examinate la nivelul intestinului subțire. Două din trei gene virale au fost detectate doar la 3 pacienți, iar o singură genă virală a fost prezentă la doar 4 pacienți. Examinarea PCR pe materialul tisular prelevat de la nivel colonic a relevat faptul că în cazul a 19 pacienți s-au putut detecta toate cele trei gene virale studiate. Un număr total de 42 de pacienți au prezentat pozitivitate la nivelul intestinului subțire și un număr total de 41 de pacienți la nivelul colonului pentru anticorpul anti-nucleocapsidă SARS-CoV-2 în urma analizei imunohistochimice.

Analiza RT-PCR a relevat prezența genelor N, S și Orflab în placentă și cordonul ombilical, precum și în unele organe fetale precum creierul, plămânii și ficatul. O analiză retrospectivă RT-PCR a dezvăluit, de asemenea, patru cazuri în care țesutul placentar era pozitiv pentru genele virale. [183]. După analiza moleculară, am dorit să confirmăm rezultatele noastre folosind tehnici imunohistochimice pentru detectarea nucleocapsidei virale. În acest fel, am putut confirma cu certitudine nu numai prezența genelor virale în placentă și organele fetale, dar și existența de virioni complet asamblați, argumentând în favoarea infecției active și replicării SARS-CoV-2 la nivel fetal. În ceea ce privește placenta, am detectat prezența nucleocapsidei virale în sincițiotrofoblast, asemănător cu câteva studii publicate în literatură. [185,186]. Pozitivitatea pentru nucleocapsida SARS-CoV-2 a fost detectată și în pneumocitele de tip II ale țesutului pulmonar fetal, confirmând nu numai transmiterea verticală, ci și procesul activ de replicare și afinitatea crescută a virusului pentru această clasă de celule. Rezultate similare au fost obținute și de către alți cercetători. [187,188] Creierul, cordul, ficatul, rinichii și intestinele au fost toate negative pentru nucleocapsida virusului SARS-CoV-2, chiar dacă creierul, plămânii și ficatul au prezentat pozitivitate pentru cele trei gene virale în urma examinării prin RT-PCR, sugerând că virusul a intrat în sistemul circulator al fătului, dar nu s-a replicat și nu a invadat celulele din aceste organe.

## 6. CONCLUZII

- Principala grupă de vârstă cu risc crescut de deces este cea cuprinsă între 61 și 80 de ani, urmată de cea cu vârste cuprinse între 41 și 60 de ani și de cea cu vârsta peste 80 de ani. Riscul cel mai scăzut este reprezentat de cei din grupa de vârstă sub 20 de ani.
- Genul masculin prezintă un risc mai crescut de deces în urma infecției cu virusul SARS-CoV-2 față de cel feminin.
- Perioada medie de internare a fost de 12 zile, iar perioada medie de timp dintre debutul bolii infecțioase sau a confirmării infecției virale și deces a fost de 21 de zile.
- Comorbiditățile cardio-vasculare precum hipertensiunea arterială, ateroscleroza și insuficiența cardiacă cronică s-au asociat cu cel mai mare risc de deces, urmate de cele metabolice, reprezentate în principal de obezitate și diabet zaharat și, mai apoi, de cele respiratorii cronice, cum e astmul bronșic sau BPOC-ul.
- Mecanismul tanatogenerator este declanșat, de cele mai multe ori, de pneumonia virală severă, urmată, la mare distanță, de bronhopneumonia bacteriană asociată sau starea septică, precum și de trombolismul pulmonar.
- Pacienții cu infecție SARS-CoV-2 cu formă severă pot suferi necroze sau perforații spontane la nivelul tubului digestiv, cel mai probabil, declanșate de leziunile peretelui vascular, de hipoxia sistemică, de microtrombozele sistemice sau de răspunsul inflamator exagerat.
- Din punct de vedere histopatologic, cel mai afectat organ în infecția virală este plămânul, dar leziuni microscopice, direct sau indirect mediate de infecția virală, se observă și la nivel cardiac, renal, hepatic, splenic sau intestinal.
- Pattern-ul histopatologic în infecția cu virusul SARS-CoV-2 la nivel pulmonar este cel al leziunilor alveolare difuze în fază exudativă, regenerativă sau fibrotică.
- Cele mai frecvente modificări microscopice decelate în cadrul leziunilor alveolare difuze au fost: hiperplazia pneumocitelor de tip II, multe dintre acestea prezentând efecte citopatice virale, distrucția epiteliului alveolar, cu formare de membrane hialine și formarea celulelor gigante multinucleate sincițiale pneumocitare.
- Reacția imunologică de la nivel pulmonar este mediată, de cele mai multe ori, de sistemul limfo-monocitar și macrofagic, dar, în cazurile cu evoluție rapidă, fulminantă, cu status

inflamator exagerat sau în cazurile cu evoluție lentă nefavorabilă, cu complicații septice, reacția imunologică poate fi mediată și prin prezența polimorfonuclearelor neutrofile.

- Infiltratul inflamator limfocitar este compus în cea mai mare parte de limfocite T CD3 +.
- Reacția vasculitică limfocitară pulmonară și microtrombozele sunt declanșate de macrofagele derivate din monocite infectate cu virusul SARS-CoV-2 sau de sindromul de răspuns inflamator sistemic.
- Microtrombozele localizate sunt asociate, cel mai frecvent, cu prezența virusului SARS-CoV-2 la acest nivel, iar microtrombozele observate în mai mult de un organ se asociază cu un sindrom de răspuns inflamator sistemic de intensitate crescută.
- Hemoragia alveolară difuză sau edemul pulmonar masiv pot precede decesul și apar secundar leziunilor peretelui vascular sau epiteliului alveolar de suprafață.
- Riscul de hemoragie alveolară este cel mai mare la pacienții cu debut infecțios cuprins între 15 și 21 de zile.
- Leziunile alveolare difuze de natură fibrotică apar, cel mai constant, după 21 de zile de la debutului infecției, dar, în cazuri limitate, se pot observa și în prima săptămână de infecție și sunt reprezentate, cel mai frecvent, de fibroza interstițială, urmată de metaplazia scuamoasă și, nu în ultimul rând, de pneumonia în formă organizată.
- Cele mai frecvente leziuni microscopice acute de la nivelul țesutului cardiac au fost modificările microstructurale ale fibrelor miocardice, urmate de inflamația limfomonocitară de la nivelul pericardului și a spațiului subepicardic, precum și de modificările citopatice ale miocitelor.
- Miocardita limfocitară borderline, microtrombozele și infiltratul inflamator de la nivelul pereților vasculari s-au observat la un număr limitat de pacienți și s-au asociat cu prezența virusului la nivel miocardic.
- Prezența neutrofilelor la nivelul lumenului vascular miocardic nu s-a asociat cu detecția virusului la acest nivel, în schimb a fost observată la pacienții cu pneumonie virală formă severă, fulminantă, cu deces rapid sau la pacienții cu evoluție lentă, nefavorabilă, cu complicații septice.
- Miocardofibroza a fost leziunea cronică asociată cel mai frecvent, observată la nivelul țesutului cardiac.

- Necroza tubulară acută este leziunea cea mai specifică de la nivelul parenchimului renal la pacienții cu infecție cu virusul SARS-CoV-2 și poate fi secundară infecției directe a virusului la acest nivel sau poate fi consecința hipoxiei sistemice, a leziunilor vasculare și a microtrombozelor, respectiv a răspunsului inflamator sistemic.
- Reacția inflamatorie de la nivelul parenchimului renal este mediată de prezența infiltratului inflamator limfo-monocitar interstițial și se poate asocia cu prezența virusului la nivelul parenchimului renal.
- Cea mai frecventă modificare histopatologică hepatică la pacienții cu infecție Covid-19 este prezența infiltratului inflamator limfo-monocitar la nivelul spațiului port, urmată de distrofii granulo-vacuolare hepatocitare și de efecte citopatice ale hepatocitelor.
- Leziunile cronice asociate de la nivel hepatic sunt reprezentate, în cea mai mare parte, de steatoza hepatică, urmată de fibroza periportală.
- Leziunile splenice sunt consecința dezorganizării pulpei roșii traduse prin congestie marcată la acest nivel, urmată de dezorganizări ale pulpei albe, cel mai frecvent secundare atrofiei foliculare care are un raport direct proporțional cu evoluția de lungă durată a infecției și care este, cel mai probabil, consecința limfopeniei sistemice observate la acești pacienți.
- Modificările histopatologice de la nivel intestinal au fost nespecifice și au fost reprezentate, în cea mai mare parte, de prezența infiltratului inflamator limfo-monocitar la nivelul mucoasei, urmată de eroziunile epiteliale și de fibroza mucoasei.
- Genele N, S și ORF1ab au fost cel mai frecvent detectate prin rt-PCR la nivel pulmonar, apoi la nivel intestinal, splenic, hepatic, cardiac și renal, respectând această ordine.
- Detectia nucleocapsidei virusului SARS-CoV-2 a fost cel mai frecvent realizată prin analiza imunohistochimică la nivel pulmonar, apoi la nivel intestinal, splenic, hepatic, cardiac și renal, în ordinea menționată.
- În urma corelației dintre rezultatele rt-PCR și imunohistochimie s-a concluzionat că virusul SARS-CoV-2 este prezent și replicativ cel mai frecvent la nivel pulmonar, apoi la nivel intestinal, hepatic și splenic.
- Discordanța cea mai mare între detectia genomului viral și a nucleocapsidei virale a fost observată la nivel cardiac și renal, unde s-a concluzionat că afinitatea virusului pentru



aceste două organe este scăzută, iar majoritatea pacienților la care s-a detectat genomul viral la acest nivel a fost în fază de viremie.

- Celulele care sunt direct țintite de virusul SARS-CoV-2 sunt pneumocitele, hepatocitele, celulele tubulare renale, macrofagele și fibroblastele pulmonare, macrofagele și fibroblastele interstițiale de la nivelul miocardului, fibroblastele și celulele Kupffer hepatice, precum și macrofagele de la nivel splenic și intestinal.
- Se confirmă transmiterea verticală prin detectarea genelor S, N și ORF1ab în placentă, cordon ombilical, creier, plămâni și ficat, precum și identificarea nucleocapsidei virale în placenta, cordonul ombilical și plămânii fetali.
- Celulele vizate de virusul SARS-CoV-2 la nivel fetal au fost sincițiotrofoblastele, celulele endoteliale ale cordonului ombilical și pneumocitele de tip II.

## **7. ELEMENTE DE ORIGINALITATE**

Chiar dacă de la debutul pandemiei și până în prezent au existat nenumărate lucrări științifice publicate în literatura de specialitate cu privire la modificările microscopice ale infecției cu virusul SARS-CoV-2, din cunoștințele noastre, până în momentul de față nu s-a elaborat un singur studiu care să cuprindă descrieri microscopice extinse, pe o paletă tisulară atât de largă, și la care să se asocieze atât analize moleculare, prin intermediul rt-PCR, în vederea detecției genelor N, S și ORF1ab, cât și analize imunohistochimice, în vederea detecției nucleocapsidei virale. De asemenea, s-a stabilit dacă leziunile descrise sunt consecința directă a invaziei virale la nivelul aceluși țesut sau sunt secundare răspunsului inflamator sistemic sau sunt consecința unor complicații precoce generate de procesul infecțios viral. Un alt element de originalitate a fost și elaborarea unui pattern histopatologic generat de infecția cu virusul SARS-CoV-2, construit în dinamică, în funcție de perioada de debut a infecției, pattern histopatologic ce poate constitui o bază în stabilirea unor criterii de diagnostic microscopic de certitudine în infecția Covid-19. De asemenea, am reușit să utilizăm elemente de patologie digitală, prin digitalizarea lamelor histopatologice și analiza acestora, folosind module de cuantificare.

## **8. LIMITE ALE CERCETĂRII**

Având în vedere prevederile legale din perioada pandemică, respectiv limitarea efectuării autopsiei în cazul pacienților decedați ce au fost în prealabil testați pozitiv pentru virusul SARS-CoV-2, lotul de studiu a fost într-un număr redus.

De asemenea, o altă limitare, ce a decurs tot din numărul scăzut de autopsii ce au putut fi efectuate, a fost cea a numărului mic de autopsii complete efectuate, care să cuprindă și cavitatea craniană în vederea prelevării de țesut cerebral. Dată fiind această situație, nu s-a putut evalua, din punct de vedere histopatologic, imunohistochimic și molecular, substanța cerebrală în cazul pacienților infectați cu virusul SARS-CoV-2.

De altfel, o altă limitare a acestui studiu a fost generată de lipsa unei finanțări sustenabile care să permită o analiză moleculară și imunohistochimică mai complexă. Din aceste considerente, analizele moleculare pentru detecția genelor N, S și ORF1ab au putut fi elaborate doar pe un eșantion de 35 de pacienți din 56.

## **9. DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE**

Studiul actual, prin complexitatea lui, vine ca un pilon de susținere pentru studii de specialitate viitoare menite să răspundă și la întrebările la care încă nu s-au găsit răspunsuri după finalizarea acestei cercetări. Astfel, s-ar putea elabora un studiu imunohistochimic, fie pe lotul actual, fie pe un lot nou de cazuri, cu privire la ce molecule inflamatorii există în țesuturile afectate de noul coronavirus. Se poate elabora un studiu cu privire la prezența receptorilor de suprafață cu rol major în mecanismele de fuziune și invazie celulară, cum ar fi receptorii ACE2 sau proteinele TMPRSS2. În același timp, detecția virală poate fi depistată și prin tehnici de hibridizare in-situ menite să detecteze ARN-ul viral direct în celulele infectate, rezultate care se pot adauga și la rezultatele studiului actual de detecție virală folosind imunohistochimia și reacția de polimerizare în lanț. Nu în ultimul rând, este necesară elaborarea unor studii de lungă durată privind pacienții care au suferit cel puțin o infecție generată de virusul SARS-CoV-2 și care au rămas cu o simptomatologie cronică nespecifică, în prezent fiind în discuție fenomenul de long-Covid. Aceste studii trebuie obligatoriu să cuprindă și analize histopatologice pentru a evidenția anumite focare lezionale cronice în anumite țesuturi și organe, dar și studii imunohistochimice sau moleculare pentru a confirma sau infirma prezența de lungă durată a ARN-ului viral sau a anumitor particule din genomul viral, respectiv a proteinelor virale.

# BIBLIOGRAFIE

1. Fields, Bernard N. Knipe, David M. Howley, Peter M. (2013) *Fields Virology - Volume I* (6-th Ed.) Lippincott Williams & Wilkins. ISBN-13: 978-1-4511-0563-6. pp: 1-3.
2. Wang-Shick R. (2007) *Molecular Pathology of Human Pathogenic Viruses* (1st ed.) Elsevier. ISBN: 978-0-12-800838-6. pp: 3-5.
3. Dimmock, N. J. Easton, A. J. Leppard . K. N. (2007) *Introduction to modern virology* (6-th ed.) Blackwell Publishing. ISBN-13: 978-1-4051-3645-7. pp: 4-5.
4. Carter, J. Saunders, V. (2013) *Virology. Principles and Applications* (2nd ed.) John Wiley & Sons Ltd. ISBN 978-1-119-99143-4. pp: 27-28.
5. Flint, S. J. Enquist, L.W Racaniello, V.R. Skalka, A.M. (2009) *Principles of Virology* (3rd ed.) ASM Press, Washington, DC. ISBN 978-1-55581-443-4. pg 4
6. Koonin EV, Krupovic M, Agol VI. 2021. The Baltimore classification of viruses 50 years later: how does it stand in the light of virus evolution? *Microbiol Mol Biol Rev* 85:e00053-21. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-21>.
7. Zlotnick A. Theoretical aspects of virus capsid assembly. *J Mol Recognit*. 2005 Nov-Dec;18(6):479-90. doi: 10.1002/jmr.754. PMID: 16193532.
8. Roos WH, Ivanovska IL, Evilevitch A, Wuite GJ. Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jun;64(12):1484-97. doi: 10.1007/s00018-007-6451-1. PMID: 17440680; PMCID: PMC2771126.
9. Choi YG, Rao AL. Packaging of brome mosaic virus RNA3 is mediated through a bipartite signal. *J Virol*. 2003 Sep;77(18):9750-7. doi: 10.1128/jvi.77.18.9750-9757.2003. PMID: 12941883; PMCID: PMC224604.
10. Catalano CE, Morais MC. Viral genome packaging machines: Structure and enzymology. *Enzymes*. 2021;50:369-413. doi: 10.1016/bs.enz.2021.09.006. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34861943.
11. Chelikani V, Ranjan T, Kondabagil K. Revisiting the genome packaging in viruses with lessons from the "Giants". *Virology*. 2014 Oct;466-467:15-26. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.022. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24998349.
12. Chelikani V, Ranjan T, Zade A, Shukla A, Kondabagil K. Genome segregation and packaging machinery in *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus is reminiscent of bacterial apparatus.

J Virol. 2014 Jun;88(11):6069-75. doi: 10.1128/JVI.03199-13. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24623441; PMCID: PMC4093880.

13. Braakman I, van Anken E. Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Traffic*. 2000 Jul;1(7):533-9. doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.010702.x. PMID: 11208140; PMCID: PMC7190097.

14. Harrison SC. Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Adv Virus Res*. 2005;64:231-61. doi: 10.1016/S0065-3527(05)64007-9. PMID: 16139596; PMCID: PMC7173036.

15. Bergelson JM. Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread. *Cell Host Microbe*. 2009 Jun 18;5(6):517-21. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.009. PMID: 19527879.

16. Davies DE. Epithelial barrier function and immunity in asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Dec;11 Suppl 5:S244-51. doi: 10.1513/AnnalsATS.201407-304AW. PMID: 25525727.

17. Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):13-21. doi: 10.1007/s00441-010-1043-z. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20848130.

18. Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev*. 2012 Jan;245(1):147-63. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01078.x. PMID: 22168418.

19. Tawar RG, Colpitts CC, Lupberger J, El-Saghire H, Zeisel MB, Baumert TF. Claudins and pathogenesis of viral infection. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Jun;42:39-46. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.04.011. Epub 2015 May 7. PMID: 25960372

20. Bieniasz PD. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1109-15. doi: 10.1038/ni1125. PMID: 15496950.

21. Majdoul S, Compton AA. Lessons in self-defence: inhibition of virus entry by intrinsic immunity. *Nat Rev Immunol*. 2022 Jun;22(6):339-352. doi: 10.1038/s41577-021-00626-8. Epub 2021 Oct 13. PMID: 34646033; PMCID: PMC8511856.

22. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol*. 2012 Feb 16;13(3):214-22. doi: 10.1038/ni.2229. PMID: 22344284; PMCID: PMC3549670.

23. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):211-27. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.017. PMID: 23973220.

24. Münz C. Autophagy in immunity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;172:67-85. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.03.005. Epub 2020 Mar 28. PMID: 32620251.
25. Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl 1:S61-70. doi: 10.1002/eji.200737462. PMID: 17972347.
26. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20404851.
27. Areschoug T, Gordon S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol.* 2008;15:45-60. doi: 10.1159/000135685. PMID: 18511855.
28. Suresh R, Mosser DM. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ.* 2013 Dec;37(4):284-91. doi: 10.1152/advan.00058.2013. PMID: 24292903; PMCID: PMC4089092.
29. Li P, Chang M. Roles of PRR-Mediated Signaling Pathways in the Regulation of Oxidative Stress and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 19;22(14):7688. doi: 10.3390/ijms22147688. PMID: 34299310; PMCID: PMC8306625.
30. Ordureau A, Enesa K, Nanda S, Le Francois B, Peggie M, Prescott A, Albert PR, Cohen P. DEAF1 is a Pellino1-interacting protein required for interferon production by Sendai virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem.* 2013 Aug 23;288(34):24569-80. doi: 10.1074/jbc.M113.479550. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23846693; PMCID: PMC3750155.
31. Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol.* 1999;72:255-324. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60023-1. PMID: 10361578
32. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52. doi: 10.1038/32588. PMID: 9521319
33. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):503-10. doi: 10.1038/ni1582. PMID: 18425107.
34. Stoermer KA, Morrison TE. Complement and viral pathogenesis. *Virology.* 2011 Mar 15;411(2):362-73. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.045. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292294; PMCID: PMC3073741

35. Naumenko V, Turk M, Jenne CN, Kim SJ. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* 2018 Mar;371(3):505-516. doi: 10.1007/s00441-017-2763-0. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29327081.
36. Kisielow P, von Boehmer H. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol.* 1995;58:87-209. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60620-3. PMID: 7741032.
37. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135. doi: 10.1155/2012/925135. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22474485; PMCID: PMC3312336.
38. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:23-45. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.23. PMID: 11244029.
39. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):32-41. doi: 10.1038/sj.jid.5700001. PMID: 16417215.
40. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jan;9(1):15-27. doi: 10.1038/nri2454. PMID: 19079135.
41. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Mar;15(3):149-59. doi: 10.1038/nri3802. Epub 2015 Feb 13. PMID: 25677494.
42. Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;210:167-79. doi: 10.1007/978-3-642-85226-8\_17. PMID: 8565555.
43. Racine R, Winslow GM. IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol Lett.* 2009 Aug 15;125(2):79-85. doi: 10.1016/j.imlet.2009.06.003. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19539648; PMCID: PMC2747358.
44. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520. PMID: 25368619; PMCID: PMC4202688.
45. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PMID: 20176268; PMCID: PMC3670108.
46. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Jun 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL):

47. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020 Apr;26(4):450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9. PMID: 32284615; PMCID: PMC7095063.

48. Day T, Gandon S, Lion S, Otto SP. On the evolutionary epidemiology of SARS-CoV-2. *Curr Biol*. 2020 Aug 3;30(15):R849-R857. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.031. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32750338; PMCID: PMC7287426.

49. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, Anthony SJ, Barclay WS, Boni MF, Doherty PC, Farrar J, Geoghegan JL, Jiang X, Leibowitz JL, Neil SJD, Skern T, Weiss SR, Worobey M, Andersen KG, Garry RF, Rambaut A. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*. 2021 Sep 16;184(19):4848-4856. doi: 10.1016/j.cell.2021.08.017. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34480864; PMCID: PMC8373617.

50. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Jul-Aug;14(4):407-412. doi: 10.1016/j.dsx.2020.04.020. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32335367; PMCID: PMC7165108.

51. Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol*. 2021 Oct;50:173-182. doi: 10.1016/j.coviro.2021.08.010. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34534731; PMCID: PMC8423807.

52. Chai J, Cai Y, Pang C, Wang L, McSweeney S, Shanklin J, Liu Q. Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction protein PALS1. *Nat Commun*. 2021 Jun 8;12(1):3433. doi: 10.1038/s41467-021-23533-x. PMID: 34103506; PMCID: PMC8187709.

53. Saville JW, Berezuk AM, Srivastava SS, Subramaniam S. Three-Dimensional Visualization of Viral Structure, Entry, and Replication Underlying the Spread of SARS-CoV-2. *Chem Rev*. 2022 Jul 21;acs.chemrev.1c01062. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c01062. Epub ahead of print. PMID: 35863749; PMCID: PMC9344915.

54. Alharbi SN, Alrefaei AF. Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species. *J King Saud Univ Sci*. 2021

Mar;33(2):101335. doi: 10.1016/j.jksus.2020.101335. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33432259; PMCID: PMC7787911.

55. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*. 2021 Jun 10;13(6):1115. doi: 10.3390/v13061115. PMID: 34200602; PMCID: PMC8227405.

56. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci*. 2021 Jul 19;11(1):136. doi: 10.1186/s13578-021-00643-z. PMID: 34281608; PMCID: PMC8287290.

57. Huston NC, Wan H, de Cesaris Araujo Tavares R, Wilen C, Pyle AM. Comprehensive in-vivo secondary structure of the SARS-CoV-2 genome reveals novel regulatory motifs and mechanisms. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 Jul 10:2020.07.10.197079. doi: 10.1101/2020.07.10.197079. Update in: *Mol Cell*. 2021 Jan 1;: PMID: 32676598; PMCID: PMC7359520.

58. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May 14;181(4):914-921.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32330414; PMCID: PMC7179501.

59. Lippi G, Mattiuzzi C, Henry BM. Updated picture of SARS-CoV-2 variants and mutations. *Diagnosis (Berl)*. 2021 Dec 23;9(1):11-17. doi: 10.1515/dx-2021-0149. PMID: 34958184.

60. Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA*. 2021 Feb 9;325(6):529-531. doi: 10.1001/jama.2020.27124. PMID: 33404586

61. Emrani J, Ahmed M, Jeffers-Francis L, Teleha JC, Mowa N, Newman RH, Thomas MD. SARS-COV-2, infection, transmission, transcription, translation, proteins, and treatment: A review. *Int J Biol Macromol*. 2021 Dec 15;193(Pt B):1249-1273. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.172. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34756970; PMCID: PMC8552795.

62. Hafiz M. N. Iqbal, Kenya D. Romero-Castillo, Muhammad Bilal and Roberto Parra-Saldivar, The Emergence of Novel Coronavirus and its Replication Cycle - An Overview, *J. Pure Appl. Microbiol.*, 2020; 14(1).

63. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 26;117(21):11727-11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117. Epub 2020 May 6. PMID: 32376634; PMCID: PMC7260975.



64. Zhao Z, Qin P, Huang YW. Lysosomal ion channels involved in cellular entry and uncoating of enveloped viruses: Implications for therapeutic strategies against SARS-CoV-2. *Cell Calcium*. 2021 Mar;94:102360. doi: 10.1016/j.ceca.2021.102360. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33516131; PMCID: PMC7825922.
65. Lu S, Ye Q, Singh D, Villa E, Cleveland DW, Corbett KD. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 Jul 31:2020.07.30.228023. doi: 10.1101/2020.07.30.228023. Update in: *Nat Commun*. 2021 Jan 21;12(1):502. PMID: 32766587; PMCID: PMC7402048.
66. Bailey AL, Diamond MS. A Crisp(r) New Perspective on SARS-CoV-2 Biology. *Cell*. 2021 Jan 7;184(1):15-17. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.003. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33338422; PMCID: PMC7746090.
67. Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr Med Sci*. 2021;41(6):1037-1051. doi:10.1007/s11596-021-2395-1
68. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [published correction appears in *Nat Rev Microbiol*. 2022 May;20(5):315]. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):141-154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
69. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
70. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(11):685-700. doi:10.1038/s41579-021-00630-8
71. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*. 2021;13(6):1115. Published 2021 Jun 10. doi:10.3390/v13061115
72. Chai J, Cai Y, Pang C, et al. Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction protein PALS1. *Nat Commun*. 2021;12(1):3433. Published 2021 Jun 8. doi:10.1038/s41467-021-23533-x
73. Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(21):11727-11734. doi:10.1073/pnas.2003138117

74. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(4):407-412. doi:10.1016/j.dsx.2020.04.020
75. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol.* 2021;12:708264. Published 2021 Jul 7. doi:10.3389/fimmu.2021.708264
76. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):270-284. doi:10.1038/s41579-022-00713-0
77. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-1115. doi:10.1016/j.it.2020.10.004
78. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1716. Published 2022 Feb 2. doi:10.3390/ijms23031716
79. Oprinca GC, Oprinca-Muja LA, Mihalache M, Birlutiu RM, Birlutiu V. Is SARS-CoV-2 Directly Responsible for Cardiac Injury? Clinical Aspects and Postmortem Histopathologic and Immunohistochemical Analysis. *Microorganisms.* 2022;10(7):1258. Published 2022 Jun 21. doi:10.3390/microorganisms10071258
80. Boeraş I, Curtean-Bănăduc A, Bănăduc D, Cioca G. Anthropogenic Sewage Water Circuit as Vector for SARS-CoV-2 Viral ARN Transport and Public Health Assessment, Monitoring and Forecasting-Sibiu Metropolitan Area (Transylvania/Romania) Study Case. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(18):11725. Published 2022 Sep 17. doi:10.3390/ijerph191811725
81. Chrétien J, Basset F, Jaubert F, Soler P, Danel C. Cellular biology and pathology of type II pneumocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1985;76 Suppl 1:49-61. doi:10.1159/000233735
82. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res.* 2001;2(1):33-46. doi:10.1186/rr36
83. Stanley MW, Henry-Stanley MJ, Gajl-Peczalska KJ, Bitterman PB. Hyperplasia of type II pneumocytes in acute lung injury. Cytologic findings of sequential bronchoalveolar lavage. *Am J Clin Pathol.* 1992;97(5):669-677. doi:10.1093/ajcp/97.5.669

84. Albrecht T, Fons M, Boldogh I, et al. Effects on Cells. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7979/>
85. Leroy H, Han M, Woottum M, et al. Virus-Mediated Cell-Cell Fusion. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9644. Published 2020 Dec 17. doi:10.3390/ijms21249644
86. Lin L, Li Q, Wang Y, Shi Y. Syncytia formation during SARS-CoV-2 lung infection: a disastrous unity to eliminate lymphocytes. *Cell Death Differ*. 2021;28(6):2019-2021. doi:10.1038/s41418-021-00795-y
87. Mandal RV, Mark EJ, Kradin RL. Megakaryocytes and platelet homeostasis in diffuse alveolar damage. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(3):327-331. doi:10.1016/j.yexmp.2007.08.005
88. von Ranke FM, Zanetti G, Hochhegger B, Marchiori E. Infectious diseases causing diffuse alveolar hemorrhage in immunocompetent patients: a state-of-the-art review. *Lung*. 2013;191(1):9-18. doi:10.1007/s00408-012-9431-7
89. Cordier JF. Organising pneumonia. *Thorax*. 2000;55(4):318-328. doi:10.1136/thorax.55.4.318
90. Smith ML. Update on Pulmonary Fibrosis: Not All Fibrosis Is Created Equally. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(3):221-229. doi:10.5858/arpa.2015-0288-SA
91. Ogino S, Franks TJ, Yong M, Koss MN. Extensive squamous metaplasia with cytologic atypia in diffuse alveolar damage mimicking squamous cell carcinoma: a report of 2 cases. *Hum Pathol*. 2002;33(10):1052-1054. doi:10.1053/hupa.2002.128246
92. Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(5):462-472. doi:10.1016/j.pupt.2006.04.003
93. Tudor RM, Stacher E, Robinson J, Kumar R, Graham BB. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med*. 2013;34(4):639-650. doi:10.1016/j.ccm.2013.08.009
94. Cooper LT Jr. Myocarditis. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1526-1538. doi:10.1056/NEJMra0800028
95. Roberts WC. Pericardial heart disease: its morphologic features and its causes. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2005;18(1):38-55. doi:10.1080/08998280.2005.11928030
96. Kossard S. Defining lymphocytic vasculitis. *Australas J Dermatol*. 2000;41(3):149-155. doi:10.1046/j.1440-0960.2000.00419.x

97. Espeland T, Lunde IG, H Amundsen B, Gullestad L, Aakhus S. Myocardial fibrosis. Myokardfibrose. Tidsskr Nor Laegeforen. 2018;138(16):10.4045/tidsskr.17.1027. Published 2018 Oct 12. doi:10.4045/tidsskr.17.1027
98. Tejado BSM, Jou C. Histopathology in HCM. Glob Cardiol Sci Pract. 2018;2018(3):20. Published 2018 Aug 12. doi:10.21542/gcsp.2018.20
99. Rosen S, Stillman IE. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. J Am Soc Nephrol. 2008;19(5):871-875. doi:10.1681/ASN.2007080913
100. Afsar B, Ortiz A, Covic A, Solak Y, Goldsmith D, Kanbay M. Focus on renal congestion in heart failure. Clin Kidney J. 2016;9(1):39-47. doi:10.1093/ckj/sfv124
101. Panqueva, L., & Pilar, R.D. (2016). Useful Algorithms for Histopathological Diagnosis of Liver Disease Based on Patterns of Liver Damage.
102. Amzolini AM, Forțofoiu MC, Barău Abu-Alhija A, et al. Triglyceride and glucose index: a useful tool for non-alcoholic liver disease assessed by liver biopsy in patients with metabolic syndrome?. Rom J Morphol Embryol. 2021;62(2):475-480. doi:10.47162/RJME.62.2.13
103. Suttie AW. Histopathology of the spleen. Toxicol Pathol. 2006;34(5):466-503. doi:10.1080/01926230600867750
104. Hermida MD, de Melo CVB, Lima IDS, Oliveira GGS, Dos-Santos WLC. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:394. Published 2018 Nov 13. doi:10.3389/fcimb.2018.00394
105. Salzberger B, Buder F, Lampl B, et al. Epidemiology of SARS-CoV-2. Infection. 2021;49(2):233-239. doi:10.1007/s15010-020-01531-3
106. Pantea Stoian A, Pricop-Jeckstadt M, Pana A, et al. Death by SARS-CoV 2: a Romanian COVID-19 multi-centre comorbidity study. Sci Rep. 2020;10(1):21613. Published 2020 Dec 10. doi:10.1038/s41598-020-78575-w
107. Gebhard C, Regitz-Zagrosek V, Neuhauser HK, Morgan R, Klein SL. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. Biol Sex Differ. 2020 May 25;11(1):29. doi:10.1186/s13293-020-00304-9. PMID: 32450906; PMCID: PMC7247289.
108. Néant N, Lingas G, Le Hingrat Q, et al. Modeling SARS-CoV-2 viral kinetics and association with mortality in hospitalized patients from the French COVID cohort. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(8):e2017962118. doi:10.1073/pnas.2017962118

109. Grippo F, Navarra S, Orsi C, et al. The Role of COVID-19 in the Death of SARS-CoV-2-Positive Patients: A Study Based on Death Certificates. *J Clin Med*. 2020;9(11):3459. Published 2020 Oct 27. doi:10.3390/jcm9113459
110. Bonafè M, Prattichizzo F, Giuliani A, Storci G, Sabbatinelli J, Olivieri F. Inflamm-aging: Why older men are the most susceptible to SARS-CoV-2 complicated outcomes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;53:33-37. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.04.005
111. Faes C, Abrams S, Van Beckhoven D, et al. Time between Symptom Onset, Hospitalisation and Recovery or Death: Statistical Analysis of Belgian COVID-19 Patients. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(20):7560. Published 2020 Oct 17. doi:10.3390/ijerph17207560
112. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis [published correction appears in *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr 15;:] [published correction appears in *Lancet Infect Dis*. 2020 May 4;:]. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):669-677. doi:10.1016/S1473-3099(20)30243-7
113. Baud D, Qi X, Nielsen-Saines K, Musso D, Pomar L, Favre G. Real estimates of mortality following COVID-19 infection. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(7):773. doi:10.1016/S1473-3099(20)30195-X
114. Madabhavi I, Sarkar M, Kadakol N. COVID-19: a review. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2020;90(2):10.4081/monaldi.2020.1298. Published 2020 May 14. doi:10.4081/monaldi.2020.1298
115. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China [published correction appears in *Intensive Care Med*. 2020 Apr 6;:]. *Intensive Care Med*. 2020;46(5):846-848. doi:10.1007/s00134-020-05991-x
116. Elezkurtaj S, Greuel S, Ihlow J, et al. Causes of death and comorbidities in hospitalized patients with COVID-19. *Sci Rep*. 2021;11(1):4263. Published 2021 Feb 19. doi:10.1038/s41598-021-82862-5
117. Qiu P, Zhou Y, Wang F, et al. Clinical characteristics, laboratory outcome characteristics, comorbidities, and complications of related COVID-19 deceased: a systematic review and meta-analysis. *Aging Clin Exp Res*. 2020;32(9):1869-1878. doi:10.1007/s40520-020-01664-3

118. Djaharuddin I, Munawwarah S, Nurulita A, Ilyas M, Tabri NA, Lihawa N. Comorbidities and mortality in COVID-19 patients. *Gac Sanit.* 2021;35 Suppl 2:S530-S532. doi:10.1016/j.gaceta.2021.10.085
119. Peña JE, Rascón-Pacheco RA, Ascencio-Montiel IJ, et al. Hypertension, Diabetes and Obesity, Major Risk Factors for Death in Patients with COVID-19 in Mexico. *Arch Med Res.* 2021;52(4):443-449. doi:10.1016/j.arcmed.2020.12.002
120. Phelps M, Christensen DM, Gerds T, et al. Cardiovascular comorbidities as predictors for severe COVID-19 infection or death. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2021;7(2):172-180. doi:10.1093/ehjqcco/qcaa081
121. Koya SF, Ebrahim SH, Bhat LD, et al. COVID-19 and Comorbidities: Audit of 2,000 COVID-19 Deaths in India. *J Epidemiol Glob Health.* 2021;11(2):230-232. doi:10.2991/jegh.k.210303.001
122. Khan MMA, Khan MN, Mustagir MG, Rana J, Islam MS, Kabir MI. Effects of underlying morbidities on the occurrence of deaths in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health.* 2020;10(2):020503. doi:10.7189/jogh.10.020503
123. Potere N, Valeriani E, Candeloro M, et al. Acute complications and mortality in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2020;24(1):389. Published 2020 Jul 2. doi:10.1186/s13054-020-03022-1
124. Fitzek A, Schädler J, Dietz E, et al. Prospective postmortem evaluation of 735 consecutive SARS-CoV-2-associated death cases. *Sci Rep.* 2021;11(1):19342. Published 2021 Sep 29. doi:10.1038/s41598-021-98499-3
125. Kim AR, Lee J, Park S, et al. Comparison of the causes of death associated with delta and Omicron SARS-CoV-2 variants infection. *J Infect Public Health.* 2023;16(1):133-135. doi:10.1016/j.jiph.2022.11.030
126. De Nardi P, Parolini DC, Ripa M, Racca S, Rosati R. Bowel perforation in a Covid-19 patient: case report. *Int J Colorectal Dis.* 2020;35(9):1797-1800. doi:10.1007/s00384-020-03627-6
127. Al Argan RJ, Alqatari SG, Al Said AH, et al. Gastrointestinal perforation secondary to COVID-19: Case reports and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(19):e25771. doi:10.1097/MD.00000000000025771

128. Chaugale SB, Singhal V, Kapoor D, Singh A. Gastrointestinal complications (gangrene or perforation) after corona virus disease 2019 - A series of ten patients. *Indian J Gastroenterol.* 2022;41(3):307-312. doi:10.1007/s12664-021-01218-z
129. Giuffrè M, Bozzato AM, Di Bella S, et al. Spontaneous Rectal Perforation in a Patient with SARS-CoV-2 Infection. *J Pers Med.* 2020;10(4):157. Published 2020 Oct 8. doi:10.3390/jpm10040157
130. Elhence A, Ghoshal UC. Gastrointestinal perforation and vascular thrombosis in patients with corona virus disease-19: A life-threatening problem. *Indian J Gastroenterol.* 2022;41(3):218-223. doi:10.1007/s12664-022-01265-0
131. Ranchal P, Yates E, Gupta R, Aronow WS. Tocilizumab-Associated Bowel Perforation in SARS-CoV-2 Infection. *Am J Ther.* 2022;29(6):e699-e702. doi:10.1097/MJT.0000000000001273
132. Vikse J, Henry BM. Tocilizumab in COVID-19: Beware the risk of intestinal perforation. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(1):106009. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106009
133. Rojo M, Cano-Valderrama O, Picazo S, et al. Gastrointestinal Perforation After Treatment With Tocilizumab : An Unexpected Consequence of COVID-19 Pandemic. *Am Surg.* 2020;86(6):565-566. doi:10.1177/0003134820926481
134. Yao XH, Luo T, Shi Y, et al. A cohort autopsy study defines COVID-19 systemic pathogenesis. *Cell Res.* 2021;31(8):836-846. doi:10.1038/s41422-021-00523-8
135. Poletti V, Casoni GL, Cancellieri A, Piciucchi S, Dubini A, Zompatori M. Diffuse alveolar damage. *Pathologica.* 2010;102(6):453-463.
136. Septimiu-Radu S, Gadela T, Gabriela D, et al. A Systematic Review of Lung Autopsy Findings in Elderly Patients after SARS-CoV-2 Infection. *J Clin Med.* 2023;12(5):2070. Published 2023 Mar 6. doi:10.3390/jcm12052070
137. Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, Xiao SY. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol.* 2020;33:1007–1014. doi: 10.1038/s41379-020-0536-x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
138. Zhang H, Zhou P, Wei Y, Yue H, Wang Y, Hu M, Zhang S, Cao T, Yang C, Li M, Guo G, Chen X, Chen Y, Lei M, Liu H, Zhao J, Peng P, Wang CY, Du R. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Annals of Internal*

Medicine. 2020;172(9):629–632. doi: 10.7326/M20-0533. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

139. Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, Ghosh S, Mukhopadhyay COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *Am J Clin Pathol.* 2020;153:725–733. doi: 10.1093/ajcp/aqaa062. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

140. Fitzek A, Spherhake J, Edler C, Schröder AS, Heinemann A, Heinrich F, Ron A, Mushumba H, Lütgehetmann M, Püschel K. Evidence for systematic autopsies in COVID-19 positive deceased: case report of the first German investigated COVID-19 death. *Rechtsmedizin.* 2020;30:184–189. doi: 10.1007/s00194-020-00401-4. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

141. Hanley LS, Lucas SB, Youd E, Swift B, Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol.* 2020;73:239–242. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206522. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

142. Suess C, Hausmann R (2020) Gross and histopathological pulmonary findings in a COVID-19 associated death during self-isolation. *Int J Leg Med.* 10.1007/s00414-020-02319-8 [PMC free article] [PubMed]

143. Buchrieser J, Schwartz O. Pregnancy complications and Interferon-induced transmembrane proteins (IFITM): balancing antiviral immunity and placental development. *C R Biol.* 2021;344(2):145-156. Published 2021 Jul 2. doi:10.5802/crbio1.54

144. Hernández JM, Podbilewicz B. The hallmarks of cell-cell fusion. *Development.* 2017;144(24):4481-4495. doi:10.1242/dev.155523

145. Zhang Z, Zheng Y, Niu Z, et al. SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination. *Cell Death Differ.* 2021;28(9):2765-2777. doi:10.1038/s41418-021-00782-3

146. Buchrieser J, Dufloo J, Hubert M, et al. Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *EMBO J.* 2021;40(3):e107405. doi:10.15252/embj.2020107405

147. Rajah MM, Bernier A, Buchrieser J, Schwartz O. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. *J Mol Biol.* 2022;434(6):167280. doi:10.1016/j.jmb.2021.167280



148. 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(11):2156-2168. doi:10.1038/s41379-020-00661-1
149. Damiani S, Fiorentino M, De Palma A, et al. Pathological post-mortem findings in lungs infected with SARS-CoV-2. *J Pathol.* 2021;253(1):31-40. doi:10.1002/path.5549
150. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch.* 2020;477(3):359-372. doi:10.1007/s00428-020-02886-6
151. 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(5):587-603. doi:10.1097/PAS.0000000000001650
152. Aguiar D, Lobrinus JA, Schibler M, Fracasso T, Lardi C. Inside the lungs of COVID-19 disease. *Int J Legal Med.* 2020;134(4):1271-1274. doi:10.1007/s00414-020-02318-9
153. Falasca L, Nardacci R, Colombo D, et al. Postmortem Findings in Italian Patients With COVID-19: A Descriptive Full Autopsy Study of Cases With and Without Comorbidities. *J Infect Dis.* 2020;222(11):1807-1815. doi:10.1093/infdis/jiaa578
154. Gawełek KL, Padera R, Connors J, Pinkus GS, Podznyakova O, Battinelli EM. Cardiac megakaryocytes in SARS-CoV-2-positive autopsies. *Histopathology.* 2022;81(5):600-624. doi:10.1111/his.14734
155. Iwamura C, Hirahara K, Kiuchi M, et al. Elevated Myl9 reflects the Myl9-containing microthrombi in SARS-CoV-2-induced lung exudative vasculitis and predicts COVID-19 severity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(33):e2203437119. doi:10.1073/pnas.2203437119
156. Iba T, Connors JM, Levy JH. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm Res.* 2020;69(12):1181-1189. doi:10.1007/s00011-020-01401-6
157. Damiani E, Carsetti A, Casarotta E, et al. Microvascular alterations in patients with SARS-COV-2 severe pneumonia. *Ann Intensive Care.* 2020;10(1):60. Published 2020 May 20. doi:10.1186/s13613-020-00680-w
158. Yang Y, Wu Y, Meng X, et al. SARS-CoV-2 membrane protein causes the mitochondrial apoptosis and pulmonary edema via targeting BOK. *Cell Death Differ.* 2022;29(7):1395-1408. doi:10.1038/s41418-022-00928-x

159. Löffler C, Mahrhold J, Fogarassy P, Beyer M, Hellmich B. Two Immunocompromised Patients With Diffuse Alveolar Hemorrhage as a Complication of Severe Coronavirus Disease 2019. *Chest*. 2020;158(5):e215-e219. doi:10.1016/j.chest.2020.06.051
160. Wendisch D, Dietrich O, Mari T, et al. SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis. *Cell*. 2021;184(26):6243-6261.e27. doi:10.1016/j.cell.2021.11.033
161. Parimon T, Espindola M, Marchevsky A, Rampolla R, Chen P, Hogaboam CM. Potential mechanisms for lung fibrosis associated with COVID-19 infection. *QJM*. 2023;116(7):487-492. doi:10.1093/qjmed/hcac206
162. Margaroli C, Benson P, Sharma NS, et al. Spatial mapping of SARS-CoV-2 and H1N1 lung injury identifies differential transcriptional signatures. *Cell Rep Med*. 2021;2(4):100242. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100242
163. Maffia-Bizzozero S, Cevallos C, Lenicov FR, et al. Viable SARS-CoV-2 Omicron sub-variants isolated from autopsy tissues. *Front Microbiol*. 2023;14:1192832. Published 2023 May 22. doi:10.3389/fmicb.2023.1192832
164. Caniego-Casas T, Martínez-García L, Alonso-Riaño M, et al. RNA SARS-CoV-2 Persistence in the Lung of Severe COVID-19 Patients: A Case Series of Autopsies. *Front Microbiol*. 2022;13:824967. Published 2022 Jan 31. doi:10.3389/fmicb.2022.824967
165. Musso N, Falzone L, Stracquadanio S, et al. Post-Mortem Detection of SARS-CoV-2 RNA in Long-Buried Lung Samples. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(7):1158. Published 2021 Jun 24. doi:10.3390/diagnostics11071158
166. Beltempo P, Curti SM, Maserati R, Gherardi M, Castelli M. Persistence of SARS-CoV-2 RNA in post-mortem swab 35 days after death: A case report. *Forensic Sci Int*. 2021;319:110653. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110653
167. Owusu D, Pomeroy MA, Lewis NM, et al. Persistent SARS-CoV-2 RNA Shedding Without Evidence of Infectiousness: A Cohort Study of Individuals With COVID-19. *J Infect Dis*. 2021;224(8):1362-1371. doi:10.1093/infdis/jiab107
168. 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(11):2104-2114. doi:10.1038/s41379-020-0595-z

169. Martines RB, Ritter JM, Matkovic E, et al. Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(9):2005-2015. doi:10.3201/eid2609.202095
170. Bussani R, Zentilin L, Correa R, et al. Persistent SARS-CoV-2 infection in patients seemingly recovered from COVID-19. *J Pathol.* 2023;259(3):254-263. doi:10.1002/path.6035
171. Zou X., Fang M., Li S., Wu L., Gao B., Gao H., Ran X., Bian Y., Li R., Yu S., et al. Characteristics of Liver Function in Patients With SARS-CoV-2 and Chronic HBV Coinfection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2021;19:597–603. doi: 10.1016/j.cgh.2020.06.017. [PMC free article]
172. Lindner D., Fitzek A., Bräuninger H., Aleshcheva G., Edler C., Meissner K., Scherschel K., Kirchhof P., Escher F., Schultheiss H.-P., et al. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases. *JAMA Cardiol.* 2020;5:1281–1285. doi: 10.1001/jamacardio.2020.3551.
173. Kawakami R., Sakamoto A., Kawai K., Gianatti A., Pellegrini D., Nasr A., Kutys B., Guo L., Cornelissen A., Mori M., 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. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.031
174. Zhang X., Tan Y., Ling Y., Lu G., Liu F., Yi Z., Jia X., Wu M., Shi B., Xu S., et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature.* 2020;583:437–440. doi: 10.1038/s41586-020-2355-0.
175. Das M, Bristow MR, Chung MK. The Essential Vulnerability of Human Cardiac Myocytes to SARS-CoV-2. *JACC Basic Transl Sci.* 2021;6(4):346-349. Published 2021 Apr 27. doi:10.1016/j.jacbts.2021.02.010
176. Rivero J, Merino-López M, Olmedo R, et al. Association between Postmortem Kidney Biopsy Findings and Acute Kidney Injury from Patients with SARS-CoV-2 (COVID-19). *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;16(5):685-693. doi:10.2215/CJN.16281020
177. Mahjani M, Parvin M, Ghobadi S, et al. Postmortem Histopathologic Findings and SARS-CoV-2 Detection in Autopsy Kidneys of Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Pathol.* 2023;159(5):429-436. doi:10.1093/ajcp/aqad001

178. orge D, Bernardi S, Arcangeli M, Bianchi S. Histopathological Features of SARS-CoV-2 in Extrapulmonary Organ Infection: A Systematic Review of Literature. *Pathogens*. 2022;11(8):867. Published 2022 Jul 31. doi:10.3390/pathogens11080867
179. Wang M, Xiong H, Chen H, Li Q, Ruan XZ. Renal Injury by SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review. *Kidney Dis (Basel)*. 2021;7(2):100-110. doi:10.1159/000512683
180. Massoth LR, Desai N, Szabolcs A, et al. 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*. 2021;45(1):14-24. doi:10.1097/PAS.0000000000001563
181. Lau WL, Zuckerman JE, Gupta A, Kalantar-Zadeh K. The COVID-Kidney Controversy: Can SARS-CoV-2 Cause Direct Renal Infection?. *Nephron*. 2021;145(3):275-279. doi:10.1159/000513789
182. Pesti A, Danics K, Glasz T, et al. Liver alterations and detection of SARS-CoV-2 RNA and proteins in COVID-19 autopsies. *Geroscience*. 2023;45(2):1015-1031. doi:10.1007/s11357-022-00700-6
183. Bahadur G, Bhat M, Acharya S, et al. Retrospective observational RT-PCR analyses on 688 babies born to 843 SARS-CoV-2 positive mothers, placental analyses and diagnostic analyses limitations suggest vertical transmission is possible. *Facts Views Vis Obgyn*. 2021;13(1):53-66. Published 2021 Mar 31. doi:10.52054/FVVO.13.1.001
184. Marinho PS, da Cunha AJLA, Chimelli L, et al. Case Report: SARS-CoV-2 Mother-to-Child Transmission and Fetal Death Associated With Severe Placental Thromboembolism. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:677001. Published 2021 Aug 16. doi:10.3389/fmed.2021.677001
185. Dubucs C, Groussolles M, Ousselin J, et al. Severe placental lesions due to maternal SARS-CoV-2 infection associated to intrauterine fetal death. *Hum Pathol*. 2022;121:46-55. doi:10.1016/j.humpath.2021.12.012
186. di Gioia C, Zullo F, Bruno Vecchio RC, et al. Stillbirth and fetal capillary infection by SARS-CoV-2. *Am J Obstet Gynecol MF*. 2022;4(1):100523. doi:10.1016/j.ajogmf.2021.100523
187. Lesieur E, Torrents J, Fina F, et al. Congenital Infection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 With Intrauterine Fetal Death: A Clinicopathological Study With Molecular Analysis. *Clin Infect Dis*. 2022;75(1):e1092-e1100. doi:10.1093/cid/ciab840

188. Patanè L, Cadamuro M, Massazza G, et al. Evidence of vertical transmission of SARS-CoV-2 and interstitial pneumonia in second-trimester twin stillbirth in asymptomatic woman. Case report and review of the literature. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2022;4(3):100589. doi:10.1016/j.ajogmf.2022.100589
189. Linehan L, O'Donoghue K, Dineen S, White J, Higgins JR, Fitzgerald B. SARS-CoV-2 placentitis: An uncommon complication of maternal COVID-19. *Placenta*. 2021;104:261-266. doi:10.1016/j.placenta.2021.01.012
190. Mao Q, Chu S, Shapiro S, Young L, Russo M, De Paepe ME. Placental SARS-CoV-2 distribution correlates with level of tissue oxygenation in COVID-19-associated necrotizing histiocytic intervillitis/perivillous fibrin deposition. *Placenta*. 2022;117:187-193. doi:10.1016/j.placenta.2021.12.002.