



Praca oryginalna
Original paper

Michał Szczepański¹, Rafał Skowronek^{1,2}, Beata Sarecka-Hujar³, Ilona Kopyta⁴

Sądowo-lekarska analiza przypadków dzieci zmarłych nagle z powodu nierozpoznanego za życia zapalenia płuc

Medico-legal analysis of cases of children who died suddenly due to pneumonia undiagnosed in their lifetime

1 Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

2 Pracownia Histopatologii, Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu

3 Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Biomedycznych, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

4 Katedra i Klinika Neurologii Dziecięcej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Zapalenie płuc jest jedną z najczęstszych przyczyn hospitalizacji i zgonów dzieci. Celem pracy była sądowo-lekarska analiza przypadków dzieci zmarłych nagle z powodu nierozpoznanego za życia zapalenia płuc. Praca miała charakter retrospektywny i polegała na analizie akt spraw prokuratorskich. Badaniem objęto 47 dzieci zmarłych w latach 2011-2018, u których jako przyczynę zgonu po przeprowadzeniu badań pośmiertnych wskazano zapalenie płuc, a także dzieci, u których przyczyna zgonu, pomimo przeprowadzenia pośmiertnych badań dodatkowych, w tym histopatologicznych, nie została określona. W części przypadków w badaniach dodatkowych pośmiertnych dla postawienia rozpoznania wykonano dodatkowo ukierunkowane barwienia immunohistochemiczne wybranych wycinków płuc. U dzieci z objawami prodromalnymi w badaniu histopatologicznym istotnie częściej występowała niedodma niż u dzieci bez objawów prodromalnych. Zapalenie płuc to istotny problem kliniczny. Zwłaszcza u małych dzieci może ono przebiegać bez żadnych objawów, które pozwoliłyby na postawienie takiego rozpoznania. Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka pośmiertna, uzupełniona o badania immunohistochemiczne, pozwala zredukować liczbę niewyjaśnionych pod względem przyczyny zgonów dzieci.

Słowa kluczowe: zapalenie płuc, dzieci, badania pośmiertne, immunohistochemia

Abstract

Pneumonia is one of the most common causes of children's hospitalization and death. The aim of the study was a medico-legal analysis of children who died suddenly due to pneumonia undiagnosed in their lifetime. The research was of a retrospective character and consisted in an analysis of prosecution files. The study included 47 children who died between 2011-2018 in whom pneumonia after post-mortem examination was indicated as the cause of death, as well as children in whom the cause of death, despite additional post-mortem examinations, including histopathological tests, was not established. In some cases, under additional post-mortem examinations, additional targeted immunohistochemical staining of selected lung sections was performed to establish the diagnosis. In children with prodromal symptoms, histopathological examination showed significantly more frequent atelectasis than in children without prodromal symptoms. Pneumonia is a significant clinical problem. Especially in young children, it may proceed without any symptoms that would cause such a diagnosis to be made. A properly conducted post-mortem diagnosis supplemented by immunohistochemical examinations allows to reduce the number of unexplained deaths in children.

Key words: pneumonia, children, post-mortem examination, immunohistochemistry

Wprowadzenie

Zapalenia płuc należą do najczęstszych przyczyn zgonów wśród chorób układu oddechowego populacji ogólnej. Śmiertelność wśród chorych na pozaszpitalne zapalenie płuc leczonych ambulatoryjnie nie przekracza 1%, natomiast gdy stan pacjenta wymaga już hospitalizacji wynosi (w zależności od zjadliwości patogenu i jego wrażliwości na zastosowaną terapię, wieku, chorób współistniejących) odpowiednio 5-20% [1]. Zapalenie płuc u dzieci stanowi problem diagnostyczny zarówno dla klinicysty, jak i dla specjalistów zajmujących się diagnostyką pośmiertną (medyków sądowych i patomorfologów). Objawy kliniczne u dzieci mogą być bardzo skąpe (ograniczone tylko do podwyższonej temperatury) lub w ogóle nie wystąpić [2]. Dzieci zmarłe nagle z powodu nierozpoznanego za życia zapalenia płuc w ocenie histopatologicznej najczęściej są diagnozowane jako zmarłe z powodu śródmiąższowego zapalenia płuc [3].

W Polsce brak jest aktualnie standardów diagnostyki pośmiertnej zapaleń płuc u dzieci. Problem diagnostyki nieurazowych zgonów dzieci, które nie prezentowały wcześniej objawów chorobowych, jest zagadnieniem niezwykle złożonym i wielodyscyplinarnym. W aktualnym piśmiennictwie zwraca się uwagę, że tego typu zgony wymagają bardzo szerokiej diagnostyki (prawdopodobnie jednej z najszerzych w diagnostyce medyczno-sądowej). Podkreśla

Introduction

Pneumonia belongs to the most frequent causes of death among respiratory system diseases in general population. The mortality rate among community-acquired pneumonia patients treated on an outpatient basis is less than 1%, whereas in cases when the patient's condition requires hospitalization equals (depending on the virulence of the pathogen and its sensitivity to the therapy used, age, comorbidities) 5-20%, respectively [1]. Pneumonia in children constitutes a diagnostic problem both for the clinician and post-mortem specialists (forensic physicians and pathomorphologists). Clinical signs in children may be very sparse (limited only to an elevated temperature) or not present at all [2]. Children who died suddenly due to pneumonia undiagnosed in their lifetime, on histopathological evaluation are most often diagnosed as deceased due to interstitial pneumonia [3].

Poland currently lacks standards for post-mortem diagnosis of pneumonia in children. The problem of diagnosing non-traumatic deaths of children who previously failed to present symptoms of disease is an extremely complex and multidisciplinary issue. The current literature notes that such deaths require very broad diagnostics (probably one of the broadest in medico-legal diagnostics). It is emphasized that the gold standard in this type of cases should be conducting post-mortem imaging (at

się, że złotym standardem w tego typu przypadkach powinno być wykonanie: pośmiertnych badań obrazowych (przynajmniej RTG), badań histopatologicznych, neuropatologicznych, mikrobiologicznych oraz genetycznych [4-7]. Niestety w polskich realiach dostęp do części z tych badań jest istotnie ograniczony, w zależności od możliwości konkretnego ośrodka medyczno-sądowego.

Cel pracy

Sądowo-lekarska analiza przypadków dzieci zmarłych nagle z powodu nierozpoznanego za życia zapalenia płuc, w tym określenie odsetka dzieci zmarłych z tego powodu spośród grupy dzieci zmarłych nagle, wstępnie klasyfikowanych jako SIDS (ang. *Sudden Infant Death Syndrome* – zespół nagłego zgonu niemowląt) lub SUDC (ang. *Sudden Unexplained Death in Childhood* – nagły niespodziewany zgon dziecka starszego niż rok).

Materiał i metody

Badanie miało charakter retrospektywny i polegało na analizie akt prokuratorskich spraw dotyczących zgonów dzieci, których pośmiertne badania dodatkowe (w tym histopatologiczne) zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach w latach 2011-2018 i jako przyczynę zgonu wykazały zapalenie płuc, a także dzieci, u których przyczyna zgonu, pomimo przeprowadzenia pośmiertnych badań dodatkowych (w tym histopatologicznych) nie została określona.

Analizie poddano łącznie 4212 opinii (w kolejnych latach odpowiednio: 685, 699, 620, 563, 546, 573, 563, 509). Wyodrębniono sekcje dotyczące dzieci (w wieku od 7 dnia życia do 8 lat) zmarłych poza szpitalem, z przyczyn innych niż szeroko rozumiany uraz. Przyjęta dolna granica wieku wynikała z definicji SIDS (nagły zgon pomiędzy siódmym a trzysta sześćdziesiątym piątym dniem życia). Górną granicę wieku przyjęto z kolei zgodnie z definicją SUDC (wiek w chwili zgonu od ukończonego 1 roku do 8 lat).

Akta spraw każdorazowo były udostępniane do analizy za zgodą prokuratury na pisemną prośbę przeprowadzającego badanie. Oprócz wyników

least X-rays), histopathological, neuropathological, microbiological and genetic tests [4-7]. Unfortunately, in the Polish reality, access to some of these tests is significantly limited, depending on the capabilities of a particular medico-legal center.

The aim of the study

Medico-legal analysis of cases of children who died suddenly due to pneumonia undiagnosed in their lifetime, including determining the percentage of children who died due to this reason among the group of children who died suddenly, initially classified as SIDS (*Sudden Infant Death Syndrome*) or SUDC (*Sudden Unexplained Death in Childhood* – a sudden unexpected death of a child beyond one year old).

Material and methods

The research was of a retrospective character and consisted in an analysis of prosecution files concerning deaths of children whose additional post-mortem examinations (including histopathological ones) were conducted at the Chair and Department of Forensic Medicine and Medico-Legal Toxicology of the Medical University of Silesia in Katowice in the years 2011-2018, and which indicated pneumonia as the cause of death, and also concerning children in whom the cause of death despite conducting additional post-mortem examinations (including histopathological ones) was not determined.

A total of 4212 opinions were analyzed (in subsequent years: 685, 699, 620, 563, 546, 573, 563, 509, respectively). Post-mortem examinations were isolated, which concerned children (aged from 7 days to 8 years) who died outside hospital of causes other than trauma in the broad sense. The lower age limit adopted was based on the definition of SIDS (sudden death between the seventh and three hundred and sixty-fifth day of life). The upper age limit, on the other hand, was adopted in accordance with the SUDC definition (age at death from completed 1 year to 8 years).

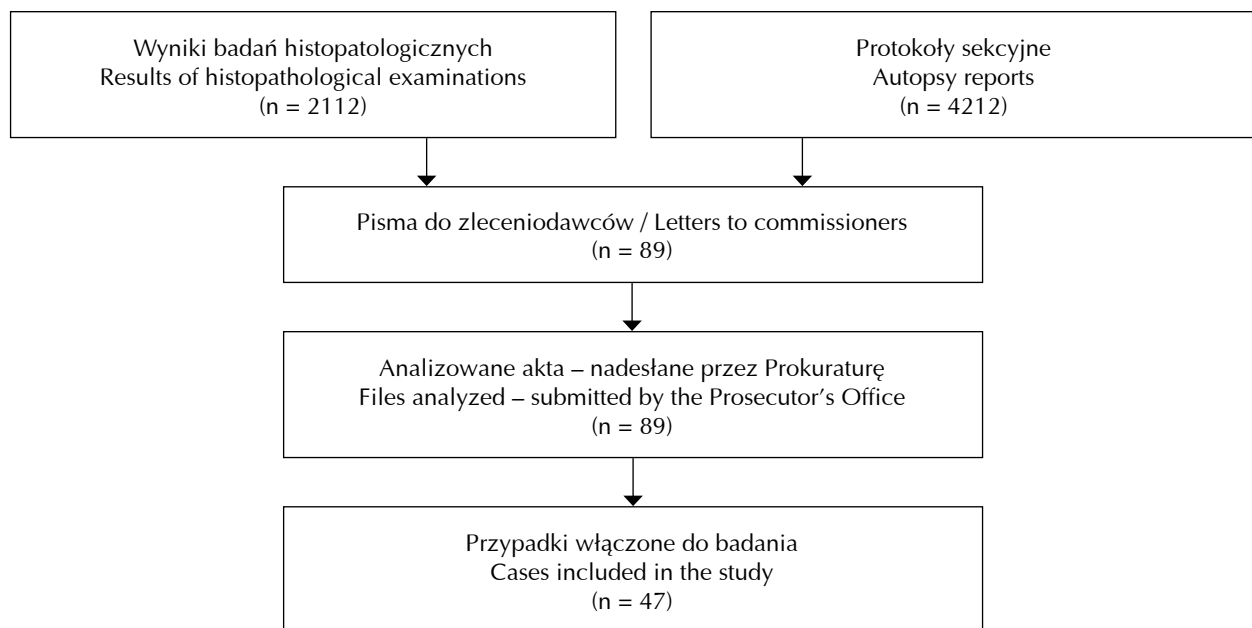
Each time, case files were made available for analysis with the permission of the prosecutor's office upon a written request of the investigator. Apart from the results of post-mortem examinations in each case, the available medical records (health

badan̄ pośmiertnych w kaŹdym przypadku, w moŹliwie jak najszerszym zakresie, analizie poddano dostępną dokumentację medyczną (ksiąŹeczka zdrowia, karta szczepieñ, dokumentacja z leczenia w warunkach podstawowej opieki zdrowotnej, wyniki badan̄ i konsultacji specjalistycznych) oraz pozostałe dokumenty, w tym takie jak m.in. zeznania świadków i opinie biegłych, które dostępne były w dokumentacji dostarczonej przez dysponujące nimi instytucje, to jest prokuratury. Przeanalizowano także wszystkie wyniki pośmiertnych badan̄ histopatologicznych z lat 2011-2018, łącznie 2112 spraw (w kolejnych latach odpowiednio: 266, 275, 274, 240, 272, 246, 290, 249).

Po wstępnej analizie wytypowano 89 spraw, po czym do zleciendawców (prokuratur rejonowych) rozesłano pisma z prośbą o udostępnienie akt do celów naukowych. Po analizie nadesłanych akt 51 spraw – do grupy badanej ostatecznie włączono 40 przypadków, do grupy kontrolnej 7 przypadków (Ryc. 1). Cała badana grupa została podzielona na dwie podgrupy: 1) z objawami prodromalnymi i 2) bez objawów prodromalnych.

record book, vaccination card, primary care treatment records, results of specialized examinations and consultations) and other documents, including, among others, witness statements and expert opinions, which were available in the documentation provided by the institutions that kept them, namely, the prosecutors' offices, were analyzed to the fullest extent possible. All post-mortem histopathology results from 2011-2018 were also analyzed, a total of 2112 cases (in subsequent years: 266, 275, 274, 240, 272, 246, 290, 249, respectively).

After an initial analysis, 89 cases were selected, after which letters were sent to the commissioners (district prosecutors' offices) requesting access to the files for research purposes. Following the analysis of the submitted files of 51 cases – 40 cases were finally included in the study group, and 7 cases in the control group (Fig. 1). The whole study group was divided into two subgroups: 1) with prodromal symptoms and 2) without prodromal symptoms.



Rycina 1. Kolejne etapy selekcji przypadków do badania, wraz ze zmniejszającą się liczbą spraw na poszczególnych etapach

Figure 1. Successive stages of case selection for the study together with the decreasing number of cases at particular stages

Podsumowując, kryteria włączenia do analizowanych grup obejmowały:

- zgon dziecka w latach 2011-2018, w warunkach pozaszpitalnych, w wieku powyżej 7 doby i poniżej 8 lat;
- badania pośmiertne histopatologiczne przeprowadzone w Zakładzie Medycyny Sądowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach;
- możliwość uzyskania akt sprawy do analizy.

Korzystając z dostępnej dokumentacji medycznej dziecka oraz zeznań świadków (rodzice, opiekunowie, personel medyczny), analizowano występowanie następujących czynników ryzyka i objawów klinicznych:

1. Czynniki ryzyka:

a) związane z okresem okołoporodowym:

- masa urodzeniowa dziecka (oceniana w siatkach centylowych [8]),
- stan noworodka oceniony w skali Apgar,
- wiek płodowy,
- wiek matki w chwili urodzenia dziecka,
- choroby matki w trakcie ciąży,
- nikotynizm matki/narażenie na palenie bierne.

b) związane ze stanem klinicznym dziecka:

- płeć,
- dotychczasowy przebieg rozwoju psychoruchowego dziecka w oparciu o analizę dokonaną przez lekarza klinicystę na podstawie danych z dokumentacji medycznej i zeznań świadków (rodziców),
- masa dziecka w chwili zgonu (ocena w siatkach centylowych według WHO),
- choroby przewlekłe (w tym wrodzone zapalenie płuc),
- wcześniejsze hospitalizacje,
- szczepienia:
 - realizacja obowiązkowego kalendarza szczepień,
 - szczepienia dodatkowe, w tym także przeciwko *Streptococcus pneumoniae* (pneumokoki).

2. Objawy kliniczne poprzedzające zgon:

- katar,
- kaszel,
- gorączka.

Kryteria wstępnej kwalifikacji jako SIDS [9]:

- nagły zgon pomiędzy siódmym a trzysta sześćdziesiątym piątym dniem życia,
- zgon w trakcie snu,

Summing up, inclusion criteria to the groups analyzed encompassed:

- death of a child in the years 2011-2018, outside hospital, aged above 7 days and below 8 years;
- post-mortem histopathological examinations conducted at the Department of Forensic Medicine of the Medical University of Silesia in Katowice;
- possibility of obtaining case files for analysis.

Using the available medical records of the child and the testimony of witnesses (parents, caregivers, medical staff), the presence of the following risk factors and clinical manifestations was analyzed:

1. Risk factors:

a) connected with the perinatal period:

- child's birth weight (assessed in centile grids [8]),
- condition of a newborn assessed by means of Apgar score,
- fetal age,
- mother's age at childbirth,
- diseases of the mother during pregnancy,
- nicotine addiction of the mother /passive smoking exposure.

b) connected with the child's clinical condition:

- sex,
- the previous course of the child's psychomotor development based on the analysis conducted by the clinician on the basis of data from medical records and witness testimony (parents),
- weight of the child at the time of death (assessed in centile grids according to the WHO),
- chronic diseases (including congenital pneumonia),
- prior hospitalizations,
- vaccinations:
 - implementation of the mandatory vaccination calendar,
 - supplementary vaccinations, including the one against *Streptococcus pneumoniae* (pneumococci).

2. Clinical manifestations preceding death:

- rhinorrhea,
- cough,
- fever.

Criteria of initial classification as SIDS [9]:

- sudden death between the seventh and the three hundred sixty-fifth day of life,
- death during sleep,

- brak objawów prodromalnych,
- przyczyna zgonu niewyjaśniona po oględzinach zewnętrznych i otwarciu zwłok.

Kryteria wstępnej kwalifikacji jako SUDC przyjęte przez autorów na potrzeby badania [5, 9]:

- wiek w chwili zgonu od ukończonego 1 roku do 8 lat,
- przyczyna zgonu niewyjaśniona po oględzinach zewnętrznych i otwarciu zwłok

Ze względu na to, że dane takie jak wyniki badań laboratoryjnych i obrazowych występowały w pojedynczych przypadkach w dokumentacji medycznej grupy dzieci zmarłych nagle, odstąpiono od przeprowadzenia ich analizy.

Badania sądowo-lekarskie przeprowadzane były na zlecenie prokuratur rejonowych z terenu województwa śląskiego. W większości przypadków (38 z 40) badanie sekcyjne było wykonane w prosektorium Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej w Katowicach (w dwóch przypadkach badania sekcyjne wykonane były poza Zakładem w prosektorium szpitalnych). W tej placówce wykonywane były również wszystkie pośmiertne badania dodatkowe.

Badania histopatologiczne płuc były przeprowadzane zgodnie ze standardową procedurą badania mikroskopowego materiału pobranego podczas sekcji zwłok stosowaną w ww. Zakładzie. Z materiału tkankowego pobranego podczas sekcji zwłok, utrwalonego w 10% zbuforowanym roztworze paraformaldehydu, pobrano reprezentatywne wycinki, które odwodniono w etanolu o rosnącym stężeniu, prześwietlono w ksylenie i zatopiono w parafinie. Uzyskane bloczki zostały **ścięte** w mikrotomie rotacyjnym (Leica RM 2155) na skrawki o grubości 3 μm , które, po odparafinowaniu i uwodnieniu w malejących stężeniach etanolu, poddano standardowemu barwieniu przeglądowemu hematoksyliną i eozyną (H-E).

Od 2015 roku w części przypadków, w których specjalista patomorfolog zasugerował taką potrzebę w związku z trudnościami w identyfikacji komórek nacieku zapalnego i tym samym trudnościami w postawieniu ostatecznego rozpoznania – za uprzednią zgodą zleceniodawcy – wykonano dodatkowo ukierunkowane barwienia immunohistochemiczne wybranych (wskazanych przez patologa), najbardziej reprezentatywnych wycinków z płuc. W dodatkowej

- lack of prodromal symptoms,
- unexplained cause of death after external visual examination and autopsy.

Criteria of initial classification as SUDC adopted by the authors for the purposes of the study [5, 9]:

- age at death from completed 1 year to 8 years,
- unexplained cause of death after external visual examination and autopsy.

Since data such as laboratory and imaging results were present in isolated instances in the medical records of the group of children who died suddenly, their analysis was waived.

Medico-legal examinations were conducted at the request of district prosecutors' offices in the Silesian voivodeship. In the majority of cases (38 out of 40), autopsy was conducted in the dissecting room of the Chair and Department of Forensic Medicine and Medico-Legal Toxicology in Katowice (in two cases, post-mortem examinations were conducted outside the Department, in hospital dissecting rooms). All additional post-mortem examinations were also conducted in this facility.

Histopathological examinations of lungs were conducted in accordance with the standard procedure for microscopic examination of material taken during autopsy applied in the abovementioned Department. Representative sections were taken from tissue material collected at autopsy, fixed in a 10% buffered paraformaldehyde solution, and dehydrated in ethanol of escalating concentration, cleared in xylene and embedded in paraffin. Blocks obtained were cut into 3 μm slices in the rotary microtome (Leica RM 2155), which after dewaxing and rehydration in decreasing concentrations of ethanol were subjected to standard routine staining with hematoxylin and eosin (H-E).

As of 2015, in some of the cases in which a specialist pathomorphologist suggested such a need due to difficulties in identifying cells of inflammatory infiltrate and thus difficulties in making a definitive diagnosis – with prior consent of the commissioner – additional targeted immunohistochemical staining was conducted of selected (indicated by the pathomorphologist) most representative lung sections. Additional diagnostics used relevant markers of T lymphocytes (CD3), B lymphocytes (CD20) and plasma cells (CD138).

diagnostyce wykorzystywano odpowiednie markery limfocytów T (CD3), limfocytów B (CD20) i plazmocytów (CD138).

Zastosowano następujące specyficzne przeciwciała, zgodnie z przyjętą w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Diagnostyki Molekularnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach procedurą w diagnostyce ludzkiego materiału tkankowego:

- CD3: Flex Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 Ready-to-Use (Dako, nr kat. IR503),
- CD20: Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26 Ready-to-Use (Dako, nr kat. IR604),
- CD 138: Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD138 Clone MI15 Ready-to-Use (nr kat. IR642).

Antygeny odsłaniano w urządzeniu PT Link Dako w wysokim pH. Następnie reakcję przeprowadzono w aparacie Autostainer Link 48 firmy Dako z użyciem zestawu EnVision Flex (nr kat. K8002).

Przygotowane preparaty oceniali specjaliści patomorfologodzy, posiadający wieloletnie doświadczenie we współpracy z uniwersyteckim zakładem medycyny sądowej.

W dalszych etapach analizowano:

- liczbę wycinków z płuc pobranych do badania histopatologicznego,
- rozkład liczby wycinków z płuc pobranych do badania histopatologicznego,
- zmiany histopatologiczne w płucach dzieci z grupy badanej oraz kontrolnej,
- wyniki barwień immunohistochemicznych wycinków z płuc dzieci z grupy badanej,
- wyniki badań toksykologicznych.

Analiza statystyczna

W celu przeprowadzenia analiz statystycznych wykorzystano oprogramowanie STATISTICA 13.0 (STATSOFT; Statistica, Tulsa, OK, USA) i SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Dla zmiennych ciągłych ustalono wartości średnie (M, ang. *mean*) i odchylenia standardowe (SD, ang. *standard deviation*) oraz wartości minimum i maksimum. Z kolei dla zmiennych jakościowych oszacowano liczebności bezwzględne (n) i względne (%). Zmienne porównywano między:

The following specific antibodies were used in accordance with the procedure adopted at the Department of Pathomorphology and Molecular Diagnostics of the Medical University of Silesia in Katowice for the diagnosis of human tissue material::

- CD3: Flex Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 Ready-to-Use (Dako, cat. no. IR503),
- CD20: Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26 Ready-to-Use (Dako, cat. no. IR604),
- CD 138: Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD138 Clone MI15 Ready-to-Use (cat. no. IR642).

Antigens were exposed in PT Link Dako system at high pH. Then the reaction was conducted in Autostainer Link 48 Dako system with the use of EnVision Flex kit (cat. no. K8002).

The prepared slides were evaluated by specialist pathomorphologists with many years of experience in cooperation with the university's forensic medicine department.

What was analyzed in further stages were the following:

- number of lung sections taken for histopathological examination,
- distribution of the number of lung sections taken for histopathological examination,
- histopathological changes in the lungs of children from the study and control groups,
- results of immunohistochemical staining of lung sections from children in the study group,
- results of toxicology tests.

Statistical analysis

In order to conduct statistical analyses, STATISTICA 13.0 (STATSOFT; Statistica, Tulsa, OK, USA) and SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) software was used. For continuous variables, mean (M) and standard deviation (SD) values were determined, as well as minimum and maximum values. For qualitative variables in turn, absolute (n) and relative (%) counts were estimated. Variables were compared between:

- a) całą grupą z śródmiąższowym zapaleniem płuc a grupą kontrolną,
 - b) grupą z objawami prodromalnymi a grupą kontrolną,
 - c) grupą bez objawów prodromalnych a grupą kontrolną,
 - d) grupą z objawami prodromalnymi a grupą bez objawów prodromalnych.
- a) the whole group with interstitial pneumonia and the control group,
 - b) the group with prodromal symptoms and the control group,
 - c) the group without prodromal symptoms and the control group,
 - d) the group with prodromal symptoms and the group without prodromal symptoms.

Do porównania zmiennych ilościowych między dwoma analizowanymi grupami zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitney'a natomiast w celu porównania zmiennych jakościowych między grupami zastosowano dokładny test Fischera. W przypadku istotnej zależności obliczono iloraz szans wystąpienia zjawiska (OR, ang. *odds ratio*) wraz z 95% przedziałem ufności (CI, ang. *confidence interval*). Wartość $p \leq 0,05$ uznano za istotną statystycznie.

Badania przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, pismo nr KNW/0022/KB/131/18 z dnia 03.07.2018 r.

Wyniki

Większość dzieci zmarłych nagle z powodu nierozpoznanego za życia, a rozpoznanego po śmierci śródmiąższowego zapalenia płuc było płci męskiej (65%). Podobnie, w grupie kontrolnej większość stanowili chłopcy (71%). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic przy porównaniu poszczególnych grup (rozkład płci między trzema grupami $p = 0,296$; grupa badana vs grupa kontrolna $p = 0,553$; podgrupa z objawami prodromalnymi vs grupa kontrolna $p = 0,664$; podgrupa bez objawów prodromalnych vs grupa kontrolna $p = 0,521$; podgrupa z objawami prodromalnymi vs podgrupa bez objawów prodromalnych $p = 0,491$).

Wiek wszystkich dzieci (z grupy badanej i kontrolnej) mieścił się w granicach od 10 dni do 7 lat. Zaobserwowano, że wiek dzieci w chwili zgonu różnicuje znamienne statystycznie podgrupy dzieci z objawami prodromalnymi i dzieci bez objawów prodromalnych ($p=0,027$). Dzieci, u których nie zaobserwowano objawów prodromalnych były młodsze (średnio: 5,2 miesiąca) niż dzieci, u których obserwowano objawy prodromalne (średnio: 10,9 miesiąca).

The non-parametric Mann-Whitney U test was used to compare quantitative variables between the two groups analyzed, while Fischer's exact test was used to compare qualitative variables between the groups. In the case of a significant correlation, the odds ratio (OR) was calculated along with the 95% confidence interval (CI). A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

The study was conducted with the permission of Bioethics Committee of the Medical University of Silesia in Katowice, document no. KNW/0022/KB/131/18, from 03.07.2018.

Results

The majority of children who died suddenly due to interstitial pneumonia undiagnosed in their lifetime, but diagnosed after death were male (65%). Similarly, in the control group, boys constituted the majority (71%). No statistically significant differences were noted when particular groups were compared (distribution of sexes among the three groups $p = 0.296$; the study group vs. the control group $p = 0.553$; the subgroup with prodromal symptoms vs. the control group $p = 0.664$; the subgroup without prodromal symptoms vs. the control group $p = 0.521$; the subgroup with prodromal symptoms vs. the subgroup without prodromal symptoms $p = 0.491$).

The age of all the children (from the study and control groups) ranged from 10 days to 7 years. It was observed that the age of children at the time of death statistically significantly differentiates between the subgroup of children with prodromal symptoms and the subgroup without prodromal symptoms ($p=0.027$). Children in whom prodromal symptoms were not observed were younger (5.2 months on average) than children in whom prodromal symptoms were observed (10.9 months on average).

Szczegółowe wyniki dotyczące danych klinicznych i czynników ryzyka zostaną opublikowane w odrębnym artykule.

Detailed results concerning clinical data and risk factors will be published in a separate article.

Wyniki badań pośmiertnych

Badania sekcyjne dzieci z obu grup rutynowo w każdym przypadku były poszerzane o dławowanie piramid skroniowych oraz wykonanie próby na odmě opłucnową (odma opłucnowa jest bowiem stosunkowo częstym powikłaniem zapalenia płuc u dzieci). W żadnym z analizowanych przypadków nie wykazano jednak jej obecności.

W trakcie oględzin i sekcji zwłok najmniej ważyło dziecko z grupy badanej, z podgrupy bez objawów prodromalnych – 2100 g. Najwięcej w grupie badanej ważyło dziecko z podgrupy bez objawów prodromalnych – 14000 g. W grupie kontrolnej najniższa odnotowana masa zwłok wynosiła 2950 g, najwyższa – 35000 g.

W grupie badanej najczęściej obducenti pobierali 5 wycinków z płuc (25%), często 9 (22,5%) i 8 (20%) wycinków (Tabela I i II). W grupie kontrolnej obducenti najczęściej pobierali 4 wycinki z płuc (28,57%). Wśród dziesięciu obducentów wykonują-

Results of post-mortem examinations

Post-mortem examinations of children in both groups were in each case routinely extended to include chiseling of the temporal pyramids and testing for pneumothorax (since pneumothorax is a relatively common complication of children's pneumonia). However, none of the analyzed cases showed its presence.

On visual examination and autopsy, the baby in the study group from the subgroup without prodromal symptoms, weighed the least – 2,100 grams. The child in the study group from the subgroup without prodromal symptoms weighed the most – 14,000 g. In the control group, the lowest recorded weight of the corpse was 2,950 g, the highest – 35,000 g.

In the study group, forensic physicians most often collected 5 lung sections (25%), often 9 (22.5%) and 8 (20%) sections (Table I and II). In the control group, forensic physicians most often collected 4 lung sections (28.57%). Among the ten forensic phy-

Tabela I. Liczba wycinków z płuc pobranych do badania histopatologicznego

Table I. Number of lung sections collected for histopathological examination

Liczba wycinków z płuc Number of lung sections	Cała grupa z śródmiąższowym zapaleniem płuc The whole group with interstitial pneumonia		Z objawami prodromalnymi With prodromal symptoms		Bez objawów prodromalnych Without prodromal symptoms		Grupa kontrolna Control group	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1	2	5,00	0	0,00	2	7,41	0	0,00
3	2	5,00	1	7,69	1	3,70	1	14,29
4	8	20,00	2	15,38	6	22,22	2	28,57
5	10	25,00	5	38,46	5	18,52	0	0,00
6	9	22,50	2	15,38	7	25,93	1	14,29
7	5	12,50	2	15,38	3	11,11	1	14,29
8	1	2,50	0	0,00	1	3,70	0	0,00
9	1	2,50	0	0,00	1	3,70	1	14,29
10	2	5,00	1	7,69	1	3,70	0	0,00
11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	14,29
Razem / Total	40	100,00	13	100,00	27	100,00	7	100,00

Tabela II. Rozkład liczby wycinków z płuc pobranych do badania histopatologicznego

Table II. Distribution of the number of lung sections collected for histopathological examination

Liczba wycinków z płuc Number of lung sections	Cała grupa z śródmiąższowym zapaleniem płuc The whole group with interstitial pneumonia	Z objawami prodromalnymi With prodromal symptoms	Bez objawów prodromalnych Without prodromal symptoms	Grupa kontrolna Control group
Średnia Average	5,4	5,5	5,3	6,3

Tabela III. Zmiany histopatologiczne w płucach dzieci z grupy badanej oraz kontrolnej

Table III. Histopathological changes in the lungs of children from the study and control groups

	Cała grupa z śródmiąższowym zapaleniem płuc The whole group with interstitial pneumonia (N=40)		Z objawami prodromalnymi With prodromal symptoms (N=13)		Bez objawów prodromalnych Without prodromal symptoms (N=27)		Grupa kontrolna Control group (N=7)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Obrzęk Edema	28	70,00	8	61,54	20	74,07	3	42,86
Przekrwienie Congestion	37	92,50	12	92,31	25	95,59	7	100,00
Rozdęcie Ectasis	16	40,00	7	53,85	9	33,33	1	14,28
Niedodma Atelectasis	17	42,50	2	15,38	15	55,56	2	28,57
Autoliza/gnicie Autolysis /decomposition	3	7,50	0	0,00	3	11,11	0	0,00

cych sekcje zwłok, tylko dwóch z nich zawsze pobierało co najmniej 6 wycinków z płuc, z czego jeden wykonał tylko jedną sekcję a drugi aż sześć.

W Tabeli III przedstawiono zmiany obserwowane w badaniu histopatologicznym w płucach. Najczęściej w grupie badanej (92,5%) i kontrolnej (100%) występowało przekrwienie. Najrzadziej w grupie badanej (7,5%) i kontrolnej (0%) występowały autoliza/gnicie. W żadnej z analizowanych spraw nie wykonano barwienia metodą Gomoriego (srebrzenia włókien retikuliny) w kierunku obecności ostrego rozdęcia płuc, ponieważ nie stwierdzono jego makroskopowych wykładników podczas sekcji zwłok, mimo podejmowanych w miejscu ujawnienia dziecka czynności resuscytacyjnych.

sicians conducting autopsies, only two of them always collected at least 6 lung sections, one of whom performed only one autopsy, and the other as many as six.

Table III presents the changes observed in the histopathological examination of the lungs. Most frequently, congestion occurred in the study group (92.5%) and in the control group (100%). Least frequently, autolysis/decomposition occurred in the study group (7.5%) and in the control group (0%). In none of the analyzed cases Gomori Trichrome Stain was performed (silver plating of reticular fibers) for presence of acute pulmonary ectasis, since its macroscopic exponents were not found at autopsy despite resuscitative measures taken at the scene of child's disclosure.

W przypadku niedodmy, szansa jej wystąpienia w grupie bez objawów prodromalnych jest ponad 5-krotnie wyższa niż w grupie z objawami prodromalnymi (OR=6,87 95%CI 1,27-37,15, p=0,017).

Badania immunohistochemiczne, których wyniki podsumowano w Tabeli IV, zlecono w 11 przypadkach (27,5%). W 10 przypadkach wykonano trzy barwienia, w jednym przypadku tylko dwa – markery limfocytów T i B (odpowiednio CD3 i CD20). We wszystkich przypadkach wyniki barwień istotnie ułatwiły identyfikację komórek nacieku zapalnego i tym samym postawienie ostatecznego rozpoznania zapalenia płuc. W grupie kontrolnej nie zlecano badań immunohistochemicznych płuc.

In the case of atelectasis, the chance of its occurrence in the group without prodromal symptoms is more than 5 times higher than in the group with prodromal symptoms (OR=6.87 95%CI 1.27-37.15, p=0.017).

Immunohistochemical examinations, the results of which have been summarized in Table IV, were commissioned in 11 cases (27.5%). In 10 cases staining was performed three times, in one case only twice – T and B lymphocyte markers (CD3 and CD20, respectively). In all cases, staining results significantly disclosed identification of inflammatory infiltrate cells and thus making a definite diagnosis of pneumonia. In the control group, immunohistochemical examinations of lungs were not commissioned.

Tabela IV. Wyniki barwień immunohistochemicznych wycinków z płuc dzieci z grupy badanej

Table IV. Results of immunohistochemical staining of lung sections of children from the study group

Lp. No.	CD3	CD20	CD138
1.	+	+	-
2.	+	+	+
3.	+	+	+
4.	+	+	+
5.	+	+	+
6.	+	+	+
7.	+	+	+
8.	+	+	+
9.	+	+	+
10.	+	+	+
11.	+	+	+

W dwudziestu czterech sprawach (60%) w grupie badanej *post mortem* wykonano badanie dodatkowe na obecność alkoholu etylowego (krew i mocz lub płyn z gałki ocznej zabezpieczone w trakcie oględzin i sekcji zwłok), w tym w trzynastu sprawach (33%) wykonano pełne badanie toksykologiczne, a w jednej sprawie jako materiał biologiczny zbadano tylko krew. W grupie kontrolnej we wszystkich przypadkach (7) wykonano badanie na obecność alkoholu etylowego, a w sześciu pełne badanie toksykologiczne. W żadnym z analizowanych przypadków nie stwierdzono obecności alkoholu etylowego. Wykluczono również zatrucie innymi ksenobiotykami.

In twenty-four cases (60%) in the *post mortem* study group an additional examination was performed for the presence of ethyl alcohol (blood and urine or eyeball fluid secured during visual examination and autopsy), including thirteen cases in which a full toxicological examination was performed, and in one case, only blood was examined as biological material. In the control group, in all cases (7) examination for presence of ethyl alcohol was performed, and in six – a full toxicological examination. In none of the analyzed cases the presence of ethyl alcohol was observed. Poisoning with other xenobiotics was also excluded.

Po przeprowadzonych badaniach pośmiertnych, obejmujących badanie makroskopowe, badanie toksykologiczne i badanie histopatologiczne poszerzone o badania immunohistochemiczne, rozpoznanie SIDS/SUDC obducenci ostatecznie utrzymali, jedynie w około 1/7 spraw.

Dyskusja

Zgon dziecka, w tym niemowlęcia, jest bardzo istotnym problemem diagnostycznym i opiniodawczym dla medyka sądowego. Badanie sekcyjne najczęściej nie pozwala na określenie przyczyny zgonu, stąd konieczność wykonania dodatkowych badań pośmiertnych, przede wszystkim mikroskopowych – histopatologicznych, a także toksykologicznych [10]. Wyniki badania histopatologicznego z wykorzystaniem typowego barwienia hematoksyliną i eozyną, a także wyniki badań toksykologicznych również mogą nie pozwolić na określenie przyczyny zgonu dziecka. Dlatego coraz częściej na świecie w badaniach pośmiertnych mikroskopowych wykorzystuje się barwienia dodatkowe, przede wszystkim immunohistochemiczne [11, 12]. Badania molekularne w kierunku wrodzonego podłoża nagłego zgonu w Polsce są jeszcze rzadko wykonywane, choć wiadomo z literatury, że stanowią istotne uzupełnienie tradycyjnej diagnostyki pośmiertnej [13-15]. W literaturze opisywane są przypadki wykrycia pośmiertnego przy pomocy badań genetycznych rzadkich chorób metabolicznych, np. niedoboru dehydrogenazy średnich łańcuchów acetylo-CoA (ang. *medium-chain-acyl-CoA dehydrogenase*, MCAD) lub chorób serca i naczyń, np. arytmogenicznej kardiomiopatii prawej komory, zespołu Brugadów i innych zaburzeń w funkcjonowaniu kanałów jonowych [16].

Dla specjalisty medycyny sądowej do rozstrzygnięcia pozostaje problem zarówno przyczyny zgonu dziecka, jak i nierzadko odpowiedzi na szczegółowe zapytania prokuratur i sądów w aspekcie możliwości popełnienia tzw. błędu medycznego. Zważywszy na niewielką ilość doniesień piśmiennictwa i brak jednoznacznych kryteriów histopatologicznych rozpoznania zarówno śródmiąższowego zapalenia płuc u dzieci, jak i jego ewentualnych postaci, nierzadko opiniowanie to jest bardzo trudne, a finalnie stanowi podstawę dla decyzji podejmowanych przez proku-

After post-mortem examinations conducted, including macroscopic, toxicological and histopathological examinations extended to immunohistochemical examination, the diagnosis of SIDS/SUDC the forensic physicians ultimately maintained only in one-seventh of cases.

Discussion

The death of a child, including an infant, is a very significant diagnostic and opinion-giving issue for a forensic physician. Post-mortem examination most often does not allow to determine the cause of death, hence the need to perform additional post-mortem examinations, primarily, microscopic, histopathological and toxicological [10]. Results of histopathological examination with the use of typical staining with hematoxylin and eosin, and also toxicological examination results may also fail to allow to determine the cause of child's death. Therefore, additional staining, primarily immunohistochemical, is increasingly being used in post-mortem microscopic examinations worldwide [11, 12]. Molecular examinations for the congenital basis of sudden death in Poland is still rarely performed, although it is known from the literature that it is an important supplement to traditional post-mortem diagnostics [13-15]. The literature describes cases of post-mortem detection by genetic testing of rare metabolic diseases, such as medium-chain acetyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency or cardiovascular diseases, such as arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, Brugada syndrome and other ion channel disorders) [16].

For the forensic specialist, the problem of both the cause of the child's death and, not infrequently, the answer to the detailed inquiries of prosecutors' offices and courts in terms of the possibility of a so-called medical error remains to be resolved. Given the scarcity of literature reports and the lack of clear histopathological criteria for the diagnosis of both interstitial pneumonia in children and its possible forms, it is not uncommon for these opinions to be very difficult, and ultimately form the basis for decisions made by prosecutors' offices and courts against doctors accused of committing "medical malpractice" [13, 17, 18]. According to the literature, the etiologic agent responsible for the deaths of chil-

ratury i sądy wobec lekarzy obwinionych o popełnienie „błędu w sztuce lekarskiej” [13, 17, 18]. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, czynnik etiologiczny, który odpowiada za zgony dzieci w przebiegu chorób układu oddechowego, zwykle również pośmiertnie pozostaje niezidentyfikowany [19]. Ponadto – zakres przeprowadzanych badań pośmiertnych w przypadku nagłego zgonu dziecka jest różny w różnych zakładach medycyny sądowej, ponieważ nie istnieje standard takiego badania.

W aspekcie opiniowania sądowo-lekarskiego w pośmiertnym badaniu sekcyjnym – makroskopowym – najczęstsze znaleziska, poza cechami śmierci nagłej (takimi jak obrzęk płuc, płynność i zastój krwi w narządach wewnętrznych), to m.in. zwiększenie spistości płuc, ich „dwubarwność” i obecność płynu w jamach opłucnowych [17, 20]. Taki wynik badania sekcyjnego nie pozwala na określenie przyczyny zgonu dziecka, chociaż zazwyczaj pozwala na wykluczenie szeroko rozumianej przyczyny urazowej i wykluczenie przyczynienia się osób drugich do śmierci.

Z punktu widzenia oceny histopatologicznej wyinków płuc dzieci, u których patomorfolog rozpoznał śródmiąższowe zapalenie płuc, na uwagę zasługuje fakt, iż w odróżnieniu od pacjentów dorosłych, opisy literaturowe tych obrazów są nieliczne i brak jest jednoznacznych patomorfologicznych kryteriów rozpoznania schorzenia u dzieci [21]. Z tego względu szczególnie cenne wydają się wyniki badań przeprowadzonych wspomnianą już powyżej metodą immunohistochemiczną. Badania immunohistochemiczne od kilku lat wykonywane są na świecie w celu potwierdzenia bądź wykluczenia śródmiąższowego zapalenia płuc [7, 22].

Ostatecznie do dnia dzisiejszego nie ma jednego, zunifikowanego panelu badań, którym w przypadku nagłych, nieurazowych zgonów dzieci posługiwano by się powszechnie w zakładach medycyny sądowej. Stanowi to dodatkową trudność w przypadku opiniowania sądowo-lekarskiego, zwłaszcza w przypadku podejrzenia błędu medycznego. Brak jednolitego panelu badań może stanowić także przyczynę niedoszacowania zgonów z powodu śródmiąższowego zapalenia płuc u dzieci, jak również zapewne nadrozpoznavania SIDS [23].

Przebieg zapalenia płuc w populacji dziecięcej może być bardzo zróżnicowany, od przypadków ła-

dren in the course of respiratory diseases usually also post-mortem remains unidentified [19]. In addition, the scope of post-mortem examinations conducted in the case of sudden death of a child varies in different forensic medical institutions, as there is no standard for such an examination.

In terms of medico-legal opinion in post-mortem macroscopic examination, the most common findings, in addition to features of sudden death (such as pulmonary edema, fluid and blood stasis in internal organs), include increased lung cohesiveness, its “bicolor” and the presence of fluid in pleural cavities [17, 20]. Such a post-mortem examination result does not allow to determine the cause of child's death, although it usually makes it possible to rule out a traumatic cause in broad sense and exclude the contribution of second parties to the death.

From the point of view of histopathological evaluation of lung sections of children diagnosed by a pathomorphologist with interstitial pneumonia, it is noteworthy that, unlike in adult patients, literature descriptions of these images are scarce and there are no clear pathomorphological criteria for the diagnosis of the condition in children [21]. For this reason, the results of the examinations conducted by the immunohistochemical method mentioned above seem particularly valuable. Immunohistochemical examinations have been performed worldwide for several years to confirm or exclude interstitial pneumonia [7, 22].

To this day, there is no single, uniform panel of tests that forensic facilities would commonly use in cases of sudden, non-traumatic deaths of children. This constitutes an additional difficulty for medico-legal opinion-giving, especially in cases of suspected medical error. The lack of a uniform panel of tests may also account for the underestimation of deaths from interstitial pneumonia in children, as well as arguably the over-diagnosis of SIDS [23].

The course of pneumonia in the pediatric population can vary widely, from mild to fulminant cases, ending in death within a short period of time after the first, often very mild and nonspecific symptoms are manifested [24]. In some children, the course of pneumonia is asymptomatic, and the progression of the disease leading to death is dramatically rapid. Such cases, on the one hand, raise the interest of researchers dealing with the problems of child

godnych do piorunujących, zakończonych zgonem w krótkim czasie od ujawnienia pierwszych, nierzadko bardzo łagodnych i niespecyficznych objawów [24]. U części dzieci przebieg zapalenia płuc jest bezobjawowy, a postęp choroby prowadzący do zgonu – dramatycznie szybki. Takie przypadki budzą z jednej strony zainteresowanie badaczy zajmujących się problemami zgonów dzieci, szczególnie we wczesnym okresie życia, ale z drugiej jednak strony – wątpliwości rodziców oraz prokuratury co do prawidłowości postępowania lekarskiego.

Wśród wszystkich 40 przypadków, które zakwalifikowano do grupy badanej w niniejszej pracy – dzieci zmarłych nagle z powodu nierozpoznanego za życia, a rozpoznanego po śmierci zapalenia płuc – wszystkie przypadki to zgony spowodowane śródmiąższowym zapaleniem płuc. Takie rozpoznanie postawiono pośmiertnie na podstawie wyników badań histopatologicznych.

W przypadku zabezpieczenia wycinków z narządów wewnętrznych do dalszych badań należy zabezpieczyć przynajmniej po jednym wycinku z każdego z płuc [25]. Jeżeli obducent makroskopowo dostrzeże chorobowo zmienioną tkankę, wówczas z tego miejsca należy pobrać wycinek wraz z otaczającą, niezmienną tkanką. U niemowląt i dzieci dobrą praktyką jest pobranie wycinka z każdego z płątów płuc. Od 2014 roku na terenie Włoch obowiązuje standaryzowany protokół sekcji zwłok niemowląt zmarłych z niewyjaśnionej przyczyny, aby w trakcie oględzin i sekcji zwłok oraz dodatkowych badań pośmiertnych, histopatologicznych i toksykologicznych, ustalić przyczynę zgonu niemowlęcia lub na zasadzie wykluczenia rozpoznać SIDS [26]. W protokole tym zaleca się pobranie pięciu wycinków z płuc do badań histopatologicznych – po jednym z każdego płata obu płuc. Aktualnie, w przypadku diagnostyki pośmiertnej zapalenia płuc wywołanego przez zakażenie wirusem SARS-CoV-2, zalecane jest również pobranie po co najmniej jednym wycinku z każdego płata płuc [27]. W przypadku makroskopowych cech zapalenia płuc dobrą praktyką jest pobranie wycinków ze wszystkich zmienionych miejsc. Podobnie w sytuacji, gdy sekcja jest „biała” (nie pozwala na określenie przyczyny zgonu), wskazane jest pobranie większej liczby wycinków do badań histopatologicznych, co zwiększa szanse na wykrycie zmiany chorobowej i postawienie praw-

deaths, especially in the early stages of life, but on the other hand, however, doubts of parents and the prosecutor's office about the correctness of the medical procedure.

Among all 40 cases that qualified for the study group in the present paper – children who died suddenly due to pneumonia undiagnosed in their lifetime but diagnosed after death – all cases were deaths due to interstitial pneumonia. Such a diagnosis was made post-mortem on the basis of histopathological results.

In the case of securing sections from internal organs for further study, at least one section from each lung should be secured [25]. If the forensic physician macroscopically perceives pathologically affected tissue, then a section should be taken from this area along with the surrounding unaffected tissue. In infants and children, it is good practice to take a section from each lobe of the lung. Since 2014, a standardized autopsy protocol for infants who die of an unexplained cause has been in effect in Italy, in order to determine the cause of death of the infant during visual examination and autopsy, as well as additional post-mortem, histopathological and toxicological examinations, or to diagnose SIDS on the basis of exclusion [26]. The protocol recommends taking five lung sections for histopathological examination – one from each lobe of both lungs. Currently, for post-mortem diagnosis of pneumonia caused by SARS-CoV-2 virus infection, it is also recommended to take at least one section from each lung lobe [27]. In the case of macroscopic features of pneumonia, it is good practice to take sections from all affected areas. Similarly, in a situation where the autopsy is “white” (does not allow the determination of the cause of death), it is advisable to take more sections for histopathological examination, which increases the chances of detecting the lesion and making a correct diagnosis. This was reflected in the analysis, where the average number of lung sections in the study group was 5.4, and in the control group – 6.3. Taking too few specimens or improperly preserving them (e.g., placing too large specimens in too small a volume of formalin) can result in failure to diagnose disease (including, but not limited to, pneumonia) in post-mortem examinations [28].

dłowej diagnozy. Znalazło to odzwierciedlenie w przeprowadzonej analizie, gdzie średnia liczba wycinków z płuc w grupie badanej wynosiła 5,4, a w grupie kontrolnej – 6,3. Pobranie zbyt małej liczby wycinków lub nieprawidłowe ich zabezpieczenie (np. umieszczenie zbyt dużych wycinków w zbyt małej objętości formaliny) może skutkować nierozpoznaniami choroby (w tym m.in. zapalenia płuc) w badaniach *post mortem* [28].

W pośmiertnej diagnostyce śródmiąższowych zapaleń płuc bardzo rzadko podejmowane są próby wykorzystania metod immunohistochemicznych, co może budzić pewne zdziwienie, biorąc pod uwagę, że metody te są powszechnie dostępne na całym świecie. Ogbuihi i Zink za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom leukocytarnym zamierzali scharakteryzować komponenty komórkowe w śródmiąższu płuc dzieci zmarłych z rozpoznaniem SIDS. Co prawda nie udało im się potwierdzić zapalnego pochodzenia ogniskowych proliferacji komórek obserwowanych w SIDS, ale udowodnili oni zapalny charakter komórek naciekających podścielisko płuc w przypadkach zapaleń śródmiąższowych [29]. Wśród nowszych prac uwagę zwraca doniesienie Dettmeyer'a, iż komórki zakażone wirusem CMV typowo prezentują dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność E-selektyny [30].

Zaletą barwień immunohistochemicznych jest możliwość korelacji obecności antygeny z jego lokalizacją w tkance lub komórce (kolokalizacja). Jest to bardzo ważne w badaniu funkcji komórek w normalnych i patologicznie zmienionych tkankach. Od czasu wprowadzenia tej metody kilkadziesiąt lat temu, barwienia immunohistochemiczne były i są szeroko stosowane w wielu obszarach biologii, w tym w badaniach cytofizjologicznych i charakteryzowaniu zmian chorobowych [31]. Badanie immunohistochemiczne stanowi uzupełnienie standardowego badania histopatologicznego. W kontekście zapaleń płuc umożliwia jednoznaczny identyfikację komórek nacieku zapalnego i ich uwidocznienie w preparacie mikroskopowym. Jest również przydatne w diagnostyce pośmiertnej chorych na COVID-19 oraz w rozpoznawaniu powikłań poszczepiennych [32-33].

W Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej w Katowicach od

In the post-mortem diagnosis of interstitial pneumonias, the use of immunohistochemical methods is very rarely attempted, which may cause some surprise, given that these methods are widely available worldwide. Ogbuihi and Zink, using monoclonal antibodies directed against leukocyte antigens, aimed to characterize cellular components in the lung interstitium of children who died with a diagnosis of SIDS. Although they could not confirm the inflammatory origin of the focal cell proliferations observed in SIDS, they did prove the inflammatory nature of cells infiltrating the lung lining in the cases of interstitial inflammation [29]. Among more recent work, Dettmeyer's report that CMV-infected cells typically present a positive immunohistochemical reaction for E-selectin is noteworthy [30].

The advantage of immunohistochemical staining is the ability to correlate the presence of an antigen with its localization in a tissue or cell (colocalization). This is very important in studying cell function in normal and pathologically altered tissues. Since the method was introduced decades ago, immunohistochemical staining has been and continues to be widely used in many areas of biology, including cytophysiological studies and characterization of lesions [31]. Immunohistochemical examination constitutes a supplement to the standard histopathological examination. In the context of pulmonary inflammation, it allows unambiguous identification of inflammatory infiltrate cells and their visualization in the microscope slide. It is also useful in the post-mortem diagnosis of COVID-19 patients and in the diagnosis of post-vaccination complications [32-33].

At the Chair and Department of Forensic Medicine and Medico-Legal Toxicology in Katowice, since 2015, immunohistochemical staining, most often for CD3, CD20 and CD138 antigens, has been used routinely to confirm the diagnosis of interstitial pneumonia. Whereas, in previous years, the methodology of conducted examinations both at the Chair and Department of Forensic Medicine and Medico-Legal Toxicology in Katowice and at all Departments of Forensic Medicine in Poland, was not uniform. Most frequently, tissue sections secured during visual examination and autopsy are routinely stained with hematoxylin and eosin. In specific

2015 roku wykorzystuje się rutynowo barwienia immunohistochemiczne, najczęściej na obecność antygenów CD3, CD20 i CD138, celem potwierdzenia rozpoznania śródmiąższowego zapalenia płuc. Natomiast w poprzednich latach metodyka prowadzonych badań zarówno w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej w Katowicach, jak i we wszystkich Zakładach Medycyny Sądowej w Polsce, była niejednolita. Najczęściej skrawki tkanek zabezpieczonych w trakcie oględzin i sekcji zwłok barwi się rutynowo hematoksyliną i eozyną. W szczególnych przypadkach, w zależności od okoliczności zgonu, zaangażowania i doświadczenia lekarza histopatologa, można zastosować inne barwienia (np. barwienie metodą Gomoriego, barwienie metodą Massona lub barwienie AZAN (ang. *AZocarmine-ANilne blue*) [25].

Aktualnie w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej w Katowicach o konieczności zastosowania i zakresie barwienia specjalnego decyduje zawsze specjalista patomorfolog, jeśli obraz mikroskopowy w barwieniu standardowym nie jest jednoznaczny i nie pozwala na postawienie jednoznacznego rozpoznania, niezbędnego do ustalenia przyczyny zgonu. Zleceniodawca (najczęściej prokurator) powinien badanie to traktować jako element prawidłowego pośmiertnego procesu diagnostycznego. Stosowanie immunohistochemii w przypadkach oczywistych i niebudzących wątpliwości w ocenie autorów jest niepotrzebne i naraża zleceniodawcę (Skarb Państwa) na zbędne wydatki.

Wnioski

Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka pośmiertna zapaleń płuc u dzieci, uzupełniona o badania immunohistochemiczne, pozwala zredukować liczbę niewyjaśnionych spraw nagłych zgonów w tej grupie wiekowej, dlatego też rutynowe wykorzystywanie badań immunohistochemicznych w wątpliwych przypadkach jest uzasadnione.

cases, depending on the circumstances of the death, the involvement and experience of the histopathologist, other stains may be used (e.g., Gomori staining, Masson staining or AZAN (AZocarmine-ANilne blue) staining) [25].

Currently, at the Chair and Department of Forensic Medicine and Medico-Legal Toxicology in Katowice, the need for and extent of special staining is always decided by a specialist pathomorphologist if the microscopic image in standard staining is not clear and does not allow a definite diagnosis, which is necessary to determine the cause of death. The commissioner (usually the prosecutor) should consider this examination as part of a proper post-mortem diagnostic process. The use of immunohistochemistry in obvious and unquestionable cases, in the opinion of the authors, is unnecessary and exposes the commissioner (the Treasury) to unnecessary expenses.

Conclusions

A properly performed post-mortem diagnosis of pneumonia in children supplemented by immunohistochemical examinations can reduce the number of unexplained cases of sudden death in this age group, so the routine use of immunohistochemical examinations in doubtful cases is justified.

Piśmiennictwo / References

1. Kuś J. Zapalenia płuc wywołane przez drobnoustroje. [W:] Szczeklik A, red. Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na 2010. Medycyna Praktyczna, Kraków 2010, str. 618-638.
2. Gereige RS, Laufer PM. Pneumonia. *Pediatr Rev* 2013; 34 (10): 438-56; quiz 455-6.
3. Bates M, Shibemba A, Mudenda V, et al. Burden of respiratory tract infections at post mortem in Zambian children. *BMC Med* 2016; 14-99.
4. Duncan JR, Byard RW. Determining the prevalence of sudden and unexplained death in childhood (SUDC): a national Australian perspective. *International Journal of Legal Medicine*. 2021; 135 (3): 793-800.
5. Fitzgerald DA, Jeffery H, Arbuckle S, Du Toit-Prinsloo L, O'Sullivan T, Waters K. Sudden Unexpected Death in Infancy SUDI: What the clinician, pathologist, coroner and researchers want to know. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2022; 41: 14-20.
6. Stram MN, Seifert AC, Cortes E et al. Neuropathology of Pediatric SARS-CoV-2 Infection in the Forensic Setting: Novel Application of Ex Vivo Imaging in Analysis of Brain Microvasculature. *Frontiers in Neurology*. 2022; 13.
7. Mastrangelo M, Esposito D. Paediatric sudden unexpected death in epilepsy: From pathophysiology to prevention. *Seizure-European Journal of Epilepsy*. 2022; 101: 83-95.
8. Fenton TR. A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr* 2003; 3: 13.
9. Duncan JR, Byard RW, ed. SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death. The Past, the Present and the Future. University of Adelaide Press, Adelaide 2018.
10. Cox JA, Lukande RL, Lucas S, Nelson AM, Van Marck E, Colebunders R. Autopsy causes of death in HIV-positive individuals in sub-Saharan Africa and correlation with clinical diagnoses. *AIDS Rev* 2010; 12(4): 183-94.
11. Ikeda T, Tani N, Aoki Y, Shida A, Morioka F, Ishikawa T. Immunohistochemical detection of respiratory syncytial virus at autopsy. *Pediatr Int* 2019; 61: 781-791.
12. Daş T, Sargan A, Yağmur G, et al. Viral Pneumonias in Forensic Autopsies: Evaluation and Classification of Histopathologic Changes With Microbiologic Correlation. *Am J Forensic Med Pathol* 2016; 37 (4): 255-263.
13. Deng Y, Wang R, Zhou X, Ren L, Liu L. Fetal, neonatal, and infant death in central China (Hubei). A 16-year retrospective study of forensic autopsy cases. *Medicine* 2019; 98 (23).
14. Byard RW, Dobson CP. Genetic testing in sudden infant death – a wolf in sheep's clothing? *Forensic Sci Med Pathol* 2019; 15: 329-331.
15. Heathfield LJ, Martin LJ, Ramesar R. A Systematic Review of Molecular Autopsy Studies in Sudden Infant Death Cases. *J Pediatr Genet* 2018; 7 (4):143-149.
16. Neubauer J, Lecca M, Russo G et al. Post-mortem whole-exome analysis in a large sudden infant death syndrome cohort with a focus on cardiovascular and metabolic genetic diseases. *Eur J Hum Genet* 2017; 25: 404-409.
17. Chen XB, Du SH, Lu JC et al. Retrospective Analysis of 61 Cases of Children Died of Viral Pneumonia. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2020; 36 (2).
18. Niemcunowicz-Janica A, Ptaszyńska-Sarosiek I, Janica J i wsp. Opiniowane przypadki podejrzenia popełnienia błędu medycznego w pediatrii w materiale aktowym Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Białymstoku w latach 2001-2006. *Ann Acad Med Stetin* 2007; suppl. 2; 53: 60-61.
19. Feikin DR, Hammitt LL, Murdoch DR, O'Brien KL, Scott JAG. The enduring challenge of determining pneumonia etiology in children: considerations for future research priorities. *Clin Infect Dis* 2017; suppl. 3; 64: 188-196.
20. Tomaszewski JF Jr, Butler T, Islam M. Histopathology and etiology of childhood pneumonia: an autopsy study of 93 patients in Bangladesh. *Pathology* 1989; 21 (2): 71-78.
21. Clement A, Henrion-Caude A, Fauroux B. The pathogenesis of interstitial lung diseases in children. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5: 94-7.
22. de Souza Costa VH Jr, Baurakiades E, Viola Azevedo ML et al. Immunohistochemistry analysis of pulmonary infiltrates in necropsy samples of children with non-pandemic lethal respiratory infections (RSV; ADV; PIV1; PIV2; PIV3; FLU A; FLU B). *J Clin Virol* 2014; 61 (2): 211-215.
23. Nowak A. Zespół nagłej śmierci niemowląt. [W:] Teresiński G, red. Medycyna sądowa. T.1, Ed. 1. PZWL, Warszawa 2019; 1003-1007.
24. Morentin B, Suárez-Mier MP, Aguilera B, Arrieta J, Audicana C, Fernández-Rodríguez A. Clinicopathological features of sudden unexpected infectious death: population-based study in children and young adults. *Forensic Sci Int* 2012; 220 (1-3): 80-84.
25. Jankowski Z, Pieśniak D. Uwagi dotyczące badania histopatologicznego w medycynie sądowej – znaczenie i wskazania oraz podstawowe zasady zabezpieczania narządów. *Arch Med Sąd Kryminol* 2007; 57 (3): 331-336.
26. Rizzo S, De Gaspari M, Carturan E et al. A standardized postmortem protocol to assess the real burden of sudden infant death syndrome. *Virchows Arch* 2020; 477 (2): 177-183.
27. Santurro A, Scopetti M, D'Errico S, Fineschi V. A technical report from the Italian SARS-CoV-2 outbreak. Postmortem sampling and autopsy investigation in cases of suspected or probable COVID-19. *Forensic Sci Med Pathol* 2020; 16 (3): 471-476.
28. Matkowski AFI, Benbow EW. Histopathology at autopsy: why bother? *Histopathology* 2021; 79 (1): 77-85.

29. Ogbuihi S, Zink P. Zelluläre Komponenten im Lungeninterstitium beim plötzlichen Kindestod – Immunhistochemische Charakterisierung. *Z Rechtsmed* 1989; 102 (2-3): 133-142.
30. Dettmeyer RB. *Forensic Histopathology. Fundamentals and Perspectives*, 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg 2018.
31. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T et al. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Subcommittee on Standardization of Immunohistochemistry. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20 (4): 393-413.
32. Stassi C, Mondello C, Baldino G, Cardia L, Asmundo A, Ventura Spagnolo E. An Insight into the Role of Postmortem Immunohistochemistry in the Comprehension of the Inflammatory Pathophysiology of COVID-19 Disease and Vaccine-Related Thrombotic Adverse Events: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (21): 12024.
33. Khairwa A, Jat KR. Autopsy findings of COVID-19 in children: a systematic review and meta-analysis. *Forensic Sci Med Pathol*. 2022; 18 (4): 516-529.

ORCID

Michał Szczepański – 0000-0002-8539-2327
Rafał Skowronek – 0000-0002-1445-3807
Beata Sarecka-Hujar – 0000-0003-0002-8591
Ilona Kopyta – 0000-0002-0346-1086

AUTOR DO KORESPONDENCJI CORRESPONDING AUTHOR

dr med. Rafał Skowronek
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl

