

Vigilância de óbitos por Influenza A: otimização de protocolo molecular para amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina

Post-mortem surveillance of Influenza A: optimization of a molecular protocol for formalin-fixed, paraffin-embedded samples

Camila Santos da Silva Ferreira^{1,2} , Isabelle Dias de Oliveira^{1,2} , Cinthya dos Santos Cirqueira Borges¹ , Juliana Mariotti Guerra³ , Leonardo José Tadeu de Araújo^{1,2*} 

¹ Departamento de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil. 

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 

*Autor de correspondência/Corresponding author: leonardo.araujo@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 23.07.2025

Aceito/Accepted: 16.09.2025

Publicação/Publication: 24.10.2025

RESUMO

O estudo buscou padronizar a RT-qPCR multiplex para detectar Influenza A em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFIP) de casos suspeitos de SRAG. Foram avaliadas 174 amostras com protocolo de extração adaptado e ensaio comercial para vírus respiratórios. A positividade foi de 4,6% para Influenza A, além de achados de VSR, Influenza B e SARS-CoV-2. A técnica mostrou-se viável e robusta para diagnóstico diferencial em FFIP, complementando a imunohistoquímica. Conclui-se que a RT-qPCR multiplex em amostras *post mortem* pode qualificar a vigilância etiológica de óbitos e apoiar decisões em saúde pública.

Palavras-chave. Vigilância em Saúde Pública, Diagnóstico Laboratorial, Influenza Humana.

ABSTRACT

This study standardized a multiplex RT-qPCR protocol for detecting Influenza A virus in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from suspected Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) cases. A total of 174 samples were analyzed with an adapted extraction method and a commercial respiratory virus assay. Influenza A was detected in 4.6% of cases, along with RSV, Influenza B, and SARS-CoV-2. The method proved feasible and robust for differential diagnosis in FFPE tissues, complementing immunohistochemistry. Multiplex RT-qPCR in *post-mortem* samples shows strong potential to improve etiological surveillance of fatal cases and support evidence-based public health decisions.

Keywords. Public Health Surveillance, Clinical Laboratory Techniques, Influenza Human.

A síndrome respiratória aguda grave (SRAG) é uma síndrome do trato respiratório, que pode ser causada por diversos agentes etiológicos, é frequentemente relacionada a infecções pulmonares ou extrapulmonares e o vírus influenza A é a causa mais frequentemente descrita em pacientes adultos¹⁻⁴, com elevado impacto na morbimortalidade, especialmente durante períodos sazonais e pandemias. De acordo com o informe epidemiológico de Vigilância das Síndromes Gripais, divulgado pela Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente do Ministério da Saúde do Governo Federal Brasileiro, de Janeiro a Outubro de 2023, foram registrados 87.270 casos de SRAG que resultaram em hospitalização e 8.786 casos com evolução para óbito. Entretanto, a identificação de vírus respiratórios ocorreu em apenas 41% dos casos⁵. A identificação laboratorial do agente etiológico em casos de óbito é essencial para a vigilância epidemiológica e para embasar decisões em saúde pública⁶. No entanto, os métodos disponíveis para diagnóstico *post mortem*, sobretudo em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFIP), apresentam desafios inerentes à sua natureza, particularmente para a detecção molecular e genotípica⁷⁻⁹. Este estudo teve como objetivo padronizar a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para detecção do vírus Influenza A em amostras FFIP encaminhadas ao Centro de Patologia (CPA) do Instituto Adolfo Lutz (IAL), utilizando um ensaio multiplex comercial.

Foram selecionados 323 casos humanos com suspeita clínica de infecção por Influenza A, entre os anos de 2017 e 2023. Os dados foram obtidos a partir da revisão de registros físicos laboratoriais e do sistema GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial), contemplando variáveis demográficas, laudos histopatológicos e resultados de imunohistoquímica (IHQ).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (CAAE nº 71752623.6.0000.0059). O conselho de ética/comitê de ética institucional dispensou a necessidade de consentimento informado, visto que as amostras estavam relacionadas a atividades de vigilância de rotina e investigação de óbitos.

Um total de 174 amostras FFIP foi selecionado aleatoriamente, para extração de RNA e posterior análise por RT-qPCR. O protocolo de extração incluiu etapas de desparafinização, lise e purificação com *beads* magnéticas (Quick-DNA/RNA Viral MagBead – Zymo Research). Para a reação, foi utilizado o *kit* Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay (Seegene), que permite a detecção simultânea de Influenza A, Influenza B, vírus sincicial respiratório (VSR), SARS-CoV-2 e para o gene humano da *RNaseP* (controle endógeno). As reações foram consideradas positivas mediante a detecção de curvas exponenciais específicas para os genes-alvo e para o controle endógeno *RNaseP*.

Dentre os casos incluídos, 315 (97,52%) foram submetidos à técnica de IHQ, e testados para diversos alvos, entre eles, 253 (79,33%) foram analisados para Influenza A, com positividade de apenas 28,06%. Além de Influenza A, as análises de IHQ revelaram um espectro etiológico variado: 3,10% corresponderam a agentes zoonóticos e bacterianos, 1,24% a fungos e micobactérias (incluindo *Cryptococcus* spp., *Histoplasma*, *Pneumocystis jiroveci* e *Mycobacterium* spp.) e 0,93% a outros vírus respiratórios. Adicionalmente, foram detectadas neoplasias ou infiltrações em 2,79% dos casos e alterações pulmonares não infecciosas em 0,93%, enquanto 0,31% permanecem inconclusivos por amostra insuficiente (**Figura 1**).

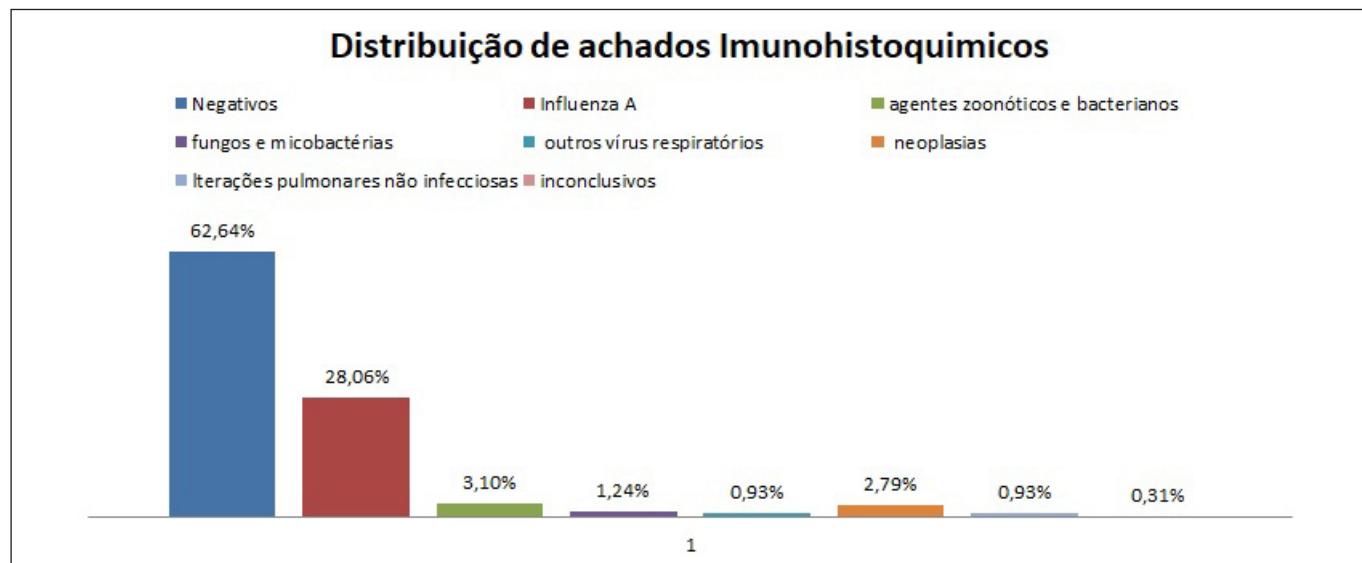


Figura 1. Distribuição de casos positivos dos 315 analisados por imuno-histoquímicos (IHQ)

Dos 174 testes de RT-qPCR realizados, nas amostras inicialmente negativas para IHQ, 152 (87,36%) foram negativos; 8 (4,60%) positivos para Influenza A; 3 (1,72%) para Influenza B; 8 (4,60%) para VSR; 1 (0,57%) para SARS-CoV-2; e 2 (1,15%) foram considerados inconclusivos. Os principais achados anatomo-patológicos em pulmão, nas amostras positivas foram 4 (19,05%) pneumonia, 3 (14,28%) broncopneumonia, 3 (14,28%) dano alveolar agudo, 9 (41,86%) casos que apresentaram primariamente distúrbios hemodinâmicos, 2 (9,52%) bronquite/bronquiolite e 1 (4,76%) que não foi possível análise, devido ao avançado estado autólise, conforme descrito na **Figura 2**.

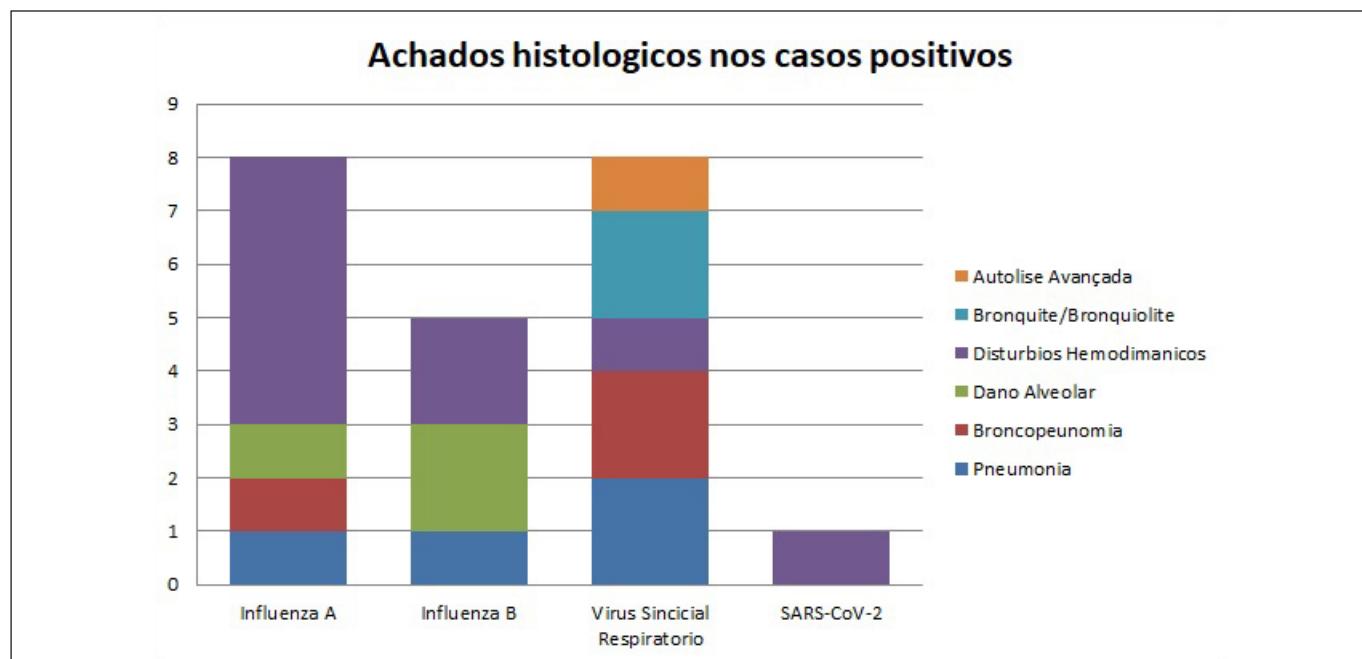


Figura 2. Distribuição dos principais achados anatomo-patológicos em pulmão, nas amostras positivas por RT-qPCR

Os resultados demonstram que a aplicação da RT-qPCR em amostras FFIP é viável, desde que protocolos de extração sejam cuidadosamente adaptados a essa matriz. A padronização de um ensaio multiplex demonstrou utilidade não apenas para a detecção do vírus Influenza A, mas também de outros agentes virais respiratórios associados à SRAG, viabilizando o diagnóstico diferencial em contexto *post mortem*. A incorporação de métodos moleculares ao diagnóstico de óbitos amplia o escopo da vigilância laboratorial, permitindo a identificação de etiologias não reveladas por técnicas imunohistoquímicas. Nesse cenário, a RT-qPCR multiplex em amostras FFIP se configura como uma ferramenta complementar eficaz para a investigação etiológica de SRAG, com potencial relevante para qualificar a determinação da causa de óbito e subsidiar estratégias em saúde pública.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde (GAPS)/ Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças (FESIMA) número 2023/19517/018/2023 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo número 407006/2023-0.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Camila Santos da Silva Ferreira: gerenciamento, organização e manutenção dos dados brutos e processados; desenvolvimento e aplicação de métodos e protocolos; redação inicial do texto. Isabelle Dias de Oliveira: gerenciamento, organização e manutenção dos dados brutos e processados; redação inicial do texto. Cinthya dos Santos Cirqueira Borges: gerenciamento, organização e manutenção dos dados brutos e processados; contribuições significativas na elaboração do rascunho e na revisão crítica do conteúdo com melhorias no texto. Juliana Mariotti Guerra: contribuições significativas na elaboração do rascunho e na revisão crítica do conteúdo com melhorias no texto. Leonardo José Tadeu de Araujo: orientação do projeto e aprovação da versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Este manuscrito integra o projeto de doutorado de Camila Santos da Silva Ferreira, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual de São Paulo (IAMSPE), sob a orientação do Dr. Leonardo José Tadeu de Araújo, Pesquisador Científico do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

REFERÊNCIAS

1. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-33.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.2012.5669>
2. Shah RD, Wunderink RG. Viral pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*. 2017;38(1):113-25.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.11.013>
3. Ortiz JR, Neuzil KM, Shay DK, Rue TC, Neradilek MB, Zhou H et al. The burden of influenza-associated critical illness hospitalizations. *Crit Care Med*. 2014;42(11):2325-32.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000545>
4. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J*. 2015;45(5):1463-78.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00186214>
5. Ministério da Saúde (Brasil). DATASUS. SIVEP-Gripe. Informe Epidemiológico da Vigilância das Síndromes Gripais Brasil – Banco de Dados de Síndrome Respiratória Aguda Grave. Informações de Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2023 [acesso 2025 Set 07]. Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/cnie/srag>
6. Araújo LJT, Gonzalez LL, Buss LF, Guerra JM, Gomez DS, Ferreira CSS et al. Surveillance of hemorrhagic fever and/or neuroinvasive disease: challenges of diagnosis. *Rev Saude Publica*. 2021;55:1-10.
<https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2021055003068>
7. Jackson AF, Williams A, Moffat I, Phillips SL, Recio L, Waters MD et al. Preparation of archival formalin-fixed paraffin-embedded mouse liver samples for use with the Agilent gene expression microarray platform. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(2):260-8.
<https://doi.org/10.1016/J.VASCN.2013.02.008>
8. Guerra JM, Monteiro RL, Gonzalez L, Kimura LM, Cirqueira CDS, Araújo LJT. Against all odds: RNA extraction from different protocols adapted to formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2020;403-10.
<https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000772>
9. Gonsales FF, Fernandes NCCA, Mansho W, Montenegro H, Guerra JM, Araújo LJT et al. Feline *Sporothrix* spp. detection using cell blocks from brushings and fine-needle aspirates: Performance and comparisons with culture and histopathology. *Vet Clin Pathol*. 2018;48(1):143-7.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12708>