



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde
Culminação de Estudos II
Relatório de pesquisa



Proposta de um fluxograma otimizado para a detecção de *Cryptococcus* sp. em amostras de Líquido Cefalorraquidiano no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina

Autor: Leticia Luísa Mate Matola



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde
Culminação de Estudos II
Relatório de pesquisa



Proposta de um fluxograma otimizado para a detecção de *Cryptococcus* sp. em amostras de Líquido Cefalorraquidiano no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina

Autora: Lectícia Luisa Mate Matola

Supervisores: Dr. Alfeu Passanduca

Prof. Doutor José Sumbana

Prof.^a Doutora Alice Manjate

Maputo, Abril de 2026

Agradecimentos

Ao meu Deus, pela proteção, pela condução e pelo amparo em todos os dias incluindo os dias de incertezas e necessidades durante o trajecto, até que chegasse aqui.

Um agradecimento especial aos meus supervisores, Alfeu Passanduca, José Sumbana e Alice Manjate pela prontidão para orientar-me e partilhar conhecimentos valiosos para a minha carreira.

Aos colaboradores do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane pela recepção, ensino e encaminhamento durante a realização deste estudo, meu muito obrigada.

À minha família pelo apoio incondicional e encorajamento, em especial a minha mãe Avelina Mate e meu irmão André Mate Tembe, vocês foram os primeiros a orar, acreditar em mim e incentivar-me para que não desistisse desta caminhada.

Ao meu noivo Eulário Jorge Mabande, sua presença, orações e conselhos foram importantes para que eu chegasse aqui.

Ao clube das preciosas, aos meus amigos e colegas que caminharam comigo, vai o meu agradecimento. E por fim a todos que indirectamente apoiaram-me nesta minha caminhada. Obrigada!

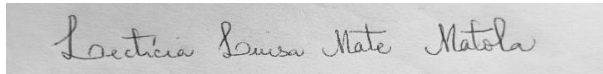
Dedicatória

Dedico este trabalho, à minha mãe, Avelina Mate, pelo apoio incondicional, orações constantes, encorajamento e conselhos. Só foi possível chegar aqui, porque sempre estive comigo neste processo.

Declaração de Honra

Eu, Lectícia Luisa Mate Matola, declaro sob compromisso de honra, que o presente trabalho académico intitulado “**Proposta de um fluxograma optimizado para a detecção de *Cryptococcus* sp. em amostras de Líquido Cefalorraquidiano no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina**” foi realizado por mim, de forma individual e original, não tendo recorrido a fontes ou meios ilícitos, salvo as devidamente citadas no corpo do trabalho. Declaro ainda que cumpro todas as normas éticas e académicas exigidas pela Universidade Eduardo Mondlane para a realização deste trabalho.

Maputo, Abril de 2026

A rectangular box containing a handwritten signature in cursive script, which reads "Lectícia Luisa Mate Matola".

(Lectícia Luisa Mate Matola)

Resumo

Cryptococcus sp. é o principal agente fúngico causador de meningite em cerca de 70% dos casos de pessoas vivendo com HIV. Em 2016, foi estimada em Moçambique uma prevalência de antigenémia criptocócica de 19,4% em adultos virgem ao TARV com células CD4<200/ mm³. O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina (LM/FAMED) é um dos principais laboratórios que fornece serviços de diagnóstico de infecção fúngica invasiva causada por *Cryptococcus* sp. na Cidade de Maputo visto que acredita-se que o diagnóstico precoce da doença melhora a conducta terapêutica. No entanto, o laboratório, depois de exame microscópico directo de líquido cefalorraquidiano impregnado em tinta de china, aplica simultaneamente dois meios de cultura, ágar Sabouraud e ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol, resultando em gastos de reagentes e consumo de tempo, considerando que os dois tem finalidade diferente e são interdependentes.

O presente estudo visou propor um algoritmo optimizado para a detecção de *Cryptococcus* sp. em amostra de líquido cefalorraquidiano com recurso aos registos de resultados microbiológicos de amostras analisadas entre Janeiro 2024 á Agosto 2025, tendo em conta a acurácia das técnicas de exame microscópico directo e cultural, considerando o meio específico ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol como padrão. O estudo decorreu no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane. A análise de dados foi feita no aplicativo Microsoft Office Excel, onde a avaliação da acurácia baseou-se em medidas de precisão diagnóstica, nomeadamente, a sensibilidade e especificidade. Os resultados foram reportados em forma de tabelas.

Num total de 192 amostras processadas houve variações na detecção de *Cryptococcus* sp. em função da metodologia aplicada. A positividade obtida através do método de cultura padrão foi de 5,2% (10/192), enquanto o exame directo com tinta da China apresentou uma positividade de 13,5% (26/192). A avaliação da acurácia do exame directo com tinta da China em relação à cultura, apresentou os seguintes índices: sensibilidade 30,0% e especificidade 86,8%. Tendo em conta estes resultados, o fluxograma propõe a manutenção de exame directo com tinta de china como abordagem inicial, seguido de cultura em ágar sabouraud e confirmação em ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol .

Palavras-chaves: *Cryptococcus* sp., meningite, tinta de china, cultura, líquido cefalorraquidiano.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Problema	3
1.2. Justificativa	4
2. Objectivos.....	5
2.1. Objectivo geral	5
2.2. Objectivos específicos	5
3. Referencial teórico	6
3.1. Taxonomia e filogenia de <i>Cryptococcus</i> sp.	6
3.2. Propriedades de <i>Cryptococcus</i> sp.	6
3.3. Ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i> sp.	6
3.4. Epidemiologia de <i>Cryptococcus</i> sp. no mundo.....	7
3.5. Características clínicas de criptococose.....	7
3.6. Mecanismo de virulência de <i>Cryptococcus</i> sp.	8
4. Métodos de detecção de <i>Cryptococcus</i> sp.	9
4.1. Análises preliminares da amostra de líquido cefalorraquidiano	9
4.2. Diagnóstico laboratorial de <i>Cryptococcus</i> sp.	10
4.3. Acurácia dos testes diagnósticos para detecção de <i>Cryptococcus</i> sp.	12
4.3.1. Sensibilidade.....	12
4.3.2. Especificidade.....	13
4.4. Manejo clínico de criptococose	13
5. Metodologia.....	15
5.1. Tipo de estudo	15
5.2. Área do estudo.....	15
5.3. População e amostragem.....	16

5.4.	Critérios de inclusão	16
5.5.	Critérios de exclusão.....	16
5.6.	Procedimentos	16
5.6.1.	Extracção de dados	16
5.6.2.	Técnicas de processamento de amostras no estudo principal	16
6.	Tipos e variáveis no presente estudo.....	17
6.1.	Materiais e consumíveis no presente estudo	17
7.	Aspectos éticos	17
8.	Análise de dados	18
9.	Resultados.....	19
9.1.	Frequência de <i>Cryptococcus</i> sp. nas amostras de LCR recebidas no LM/FAMED.....	19
9.2.	Acurácia da técnica de detecção directa (tinta de china) tendo como padrão a cultura (CGB) na detecção de <i>Cryptococcus</i> sp.	20
9.3.	Proposta de fluxograma laboratorial para detecção de <i>Cryptococcus</i> sp. para o uso no LM/FAMED.....	21
10.	Discussão dos resultados	23
11.	Conclusão.....	26
12.	Limitações.....	26
13.	Recomendações	27
14.	Referências bibliográficas.....	28
Anexos 1		34
Anexo 2		34

Índice de tabelas

Tabela 1: Materiais e equipamentos necessários para a realização do estudo.....	17
Tabela 2: Tabela de tratamento de dados.....	18
Tabela 3: Resultados laboratoriais da cultura em meio de ágar sabouraud dextrose (SDA) e ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) em relação a proveniência.....	19
Tabela 4: Resultados laboratoriais em relação ao exame directo (tinta de china).....	19
Tabela 5: Cálculo de sensibilidade e especificidade da técnica de detecção directa tendo como padrão o meio cultural CGB cultural de <i>Criptococcus</i> sp.....	20

Índice figuras

Figura 1: Mapa de localização do LM/FAMED.....	14
Figura 2: Fluxograma laboratorial otimizado para detecção de <i>Cryptococcus sp.</i> no LM/FAMED.....	21
Figura 3: Fluxograma laboratorial otimizado para detecção de <i>Cryptococcus sp.</i> no LM/FAMED.....	22

Lista de abreviaturas

CD4	Grupo de diferenciação 4
CGB	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
CRAM	Centro de Referência do Alto Maé
FN	Falsos negativos
FP	Falsos positivos
HCM	Hospital Central de Maputo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LM/FAMED	Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina
OMS	Organização mundial da saúde
SDA	Agar Sabouraud Dextrose
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SIDM	Sem informação no departamento de microbiologia
SNC	Sistema nervoso central
VN	Verdadeiros Negativos
VP	Verdadeiros positivos

Lista de Unidades

μl	microlitros
ml	mililitros
rpm	rotações por minutos

1. Introdução

As micoses invasivas causadas por fungos contribuem significativamente para a mobilidade e mortalidade em indivíduos imunodeprimidos, destacando-se entre os principais, *Cryptococcus* sp., causador da criptococose, um fungo leveduriforme, encapsulado que se encontra em todo o lado, especialmente em matéria orgânica em decomposição como em fezes de aves. O contágio é feito por inalação de propágulos, como basidiósporos ou leveduras secas, provocando inicialmente infecções pulmonares com possibilidade de progressão para as meninges (Kohler *et al.*, 2019; Zhao & Lin, 2021; Carmo *et al.*, 2022). O sistema nervoso central e os pulmões são os locais de envolvimento mais comuns, seguidos pelo sistema cutâneo e retículo endotelial (Saini *et al.*, 2018).

Cryptococcus sp. adapta-se de forma rápida, alguns factores de virulência como a cápsula, a formação de melanina e a secreção de diversas enzimas, favorecem a sua sobrevivência no ambiente e no hospedeiro infectado. A presença da cápsula polisacarídica em torno da parede celular produzida no ambiente como no hospedeiro infectado representa um importante factor de virulência, pois auxiliam na evasão imunitária do hospedeiro (Carmo *et al.*, 2022). Outros factores de virulências são igualmente encontrados como a capacidade de replicação intra e extracelular nos fagócitos, alterações na morfologia e haploidia, predileção por infectar o sistema nervoso central (SNC) e a capacidade de utilizar neurotransmissores e fontes de carbono específicas disponíveis no cérebro também favorece a sua sobrevivência no hospedeiro (Bahn *et al.*, 2020).

Neste contexto, o impacto epidemiológico da criptococose é significativo. Um estudo aponta que anualmente são documentadas aproximadamente 223.100 infecções, 70% das quais ocorrem na África Subsaariana. Na Uganda estima-se 60% dos casos de meningite com risco de vida entre as pessoas que vivem com HIV/SIDA, contudo a ausência de tratamento é que condiciona o aumento das taxas de mortalidade (Coelho & Farrer, 2020; Wembabazi *et al.*, 2022).

Consequentemente, a criptococose é considerada uma das micoses com um curso particularmente grave que frequentemente é diagnosticada tardiamente. Isso deve-se à ausência de sinais clínicos iniciais específicos. Estima-se que a infecção por esta micose seja sintomática em apenas 30 a 40% dos casos, pelo que os doentes apresentam geralmente comprometimento do sistema nervoso central e deterioração neurológica. Geralmente, os doentes apresentam uma deterioração gradual da vigilância e das capacidades cognitivas ao longo de várias semanas, acompanhada de cefaleias, febre e apatia (Carmo *et al.*, 2022).

O diagnóstico de *Cryptococcus sp.* baseia-se em exames micológicos, histopatológicos, serológicos, exames directos e a cultura. Apesar das melhorias geradas no âmbito da detecção através de múltiplos ensaios de intervenção, a mortalidade por criptococose é elevada, principalmente em países de baixo rendimento. Embora os métodos de detecção de *Cryptococcus sp.* estejam em contínua evolução, persistem limitações relevantes incluindo dificuldades no cultivo e isolamento frequentemente decorrentes da baixa carga fúngica no LCR, bem como a disponibilidade restrita de testes serológicos, os quais, apesar de apresentarem sensibilidade e especificidade de 90% não são de fácil acesso (Perfect & Bicanic, 2015; Chang *et al.*, 2024).

As técnicas baseadas em cultura envolvem o isolamento e cultivo de fungos em meios selectivos e diferenciais para obtenção de culturas puras. *Cryptococcus sp.* cresce em meios comuns como ágar sabouraud dextrose, apresentando geralmente colónias mucoides e brilhantes, mas também cresce em meios diferenciais como o ágar batata-cenoura, ágar semente de alpiste, ágar semente de Níger e ágar semente de girassol, que levam à formação de colónias marrom a preta por conter compostos fenólicos. O meio ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol pode ser utilizado para diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C. gatti* sendo o material cultivado a partir de líquido cefalorraquidiano, lavado bronco-alveolar, expectoração e biópsias pulmonares (Pfaller, 2015; Maziarz *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2018; Khare *et al.*, 2020; Dantas *et al.*, 2023; Moreira *et al.*, 2015; Pouris *et al.*, 2025).

No fluxograma de trabalho no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane (LM/FAMED), a detecção de *Cryptococcus sp.* é feita recorrendo-se à microscopia directa e à cultura. A tinta de China é empregue como método de coloração do LCR e dois meios de cultura são utilizados simultaneamente, nomeadamente ágar sabouraud dextrose e o meio diferencial cromogénico, ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Contudo tem sido verificado a discrepância de resultados entre as técnicas e o uso simultâneo que implica no elevado custo e consumo de tempo. A literatura mostra que, o meio CGB permite distinguir *C. gattii* do *C. neoformans*, num período de incubação cultural entre 48 e 72 horas entre 25° a 37°C, colónias de *C. gattii* produzem um pigmento azul, enquanto que as colónias de *C. neoformans* não produzem alteração da cor. O tom azul produzido pelas colónias de *C. gattii* resulta da utilização de glicina, que reduz amónia, provocando a alcalinização (Maziarz *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2018; Khare *et al.*, 2020; Dantas *et al.*, 2023).

No entanto, a viabilidade das técnicas diagnósticas pode variar. Um estudo realizado em Quênia visando determinar a acurácia da técnica de detecção directa comparativamente a técnica cultural apontou para uma sensibilidade de 95,8% e especificidade de 66,7% no entanto estes resultados contrastam com alguns estudos que apontam menor sensibilidade da técnica, por esta requerer infraestruturas laboratoriais, e poder facilmente ser influenciada por factores como a concentração do fungo e habilidades do operador (Gitonga *et al.*, 2017; Hsião *et al.*, 2021).

Diante disso, o presente estudo visou propor um fluxograma otimizado de acordo com a acurácia da técnica de tinta de china tendo como referência a cultura que poderá melhorar o rendimento diagnóstico, o fluxo de trabalho e o uso racional dos meios disponíveis. A avaliação baseou-se em medidas de precisão diagnóstica, nomeadamente a sensibilidade e especificidade, fundamentais para determinar a capacidade de um teste discriminar correctamente os indivíduos com e sem doença.

1.1.Problema

Cryptococcus sp., é o principal agente fúngico causador de meningite em pessoas vivendo com HIV (Gitonga *et al.*, 2017). Em 2014, cerca de 223.100 indivíduos a nível global desenvolveram a meningite criptocócica, resultando em 181.100 mortes (Dantas *et al.*, 2023). Em 2016, em Moçambique, foi estimada uma prevalência de antigenémia criptocócica de 19,4% em adultos virgem ao TARV com células CD4<200/mm³ (Sacarlal & Denning, 2018). Estimou-se ainda que Moçambique apresenta uma incidência de 18.600 casos anuais de meningite criptocócica (Rajasingham *et al.*, 2017).

A elevada carga de HIV na África Subsariana fez com que a criptococose se tornasse um problema de saúde pública, tendo sido alistado em 2022 pela OMS como um agente fúngico prioritário, contudo o diagnóstico das doenças fúngicas continua com algumas lacunas devido a baixo número de laboratórios clínicos com capacidade e habilidade para realizar testes micológicos. A falta de padronização dos procedimentos em Moçambique, constitui um dos principais desafios, resultando em diferenças significativas nos métodos aplicados e impactando na reprodutibilidade, comparabilidade dos resultados entre estudos e laboratórios (Ogundeji *et al.*, 2016; Sacarlal & Denning, 2018; Chang *et al.*, 2024).

O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane (LM/FAMED) tem estabelecido procedimentos de diagnóstico fenotípico e molecular de infecções fúngicas invasivas, contribuindo deste modo no acesso ao diagnóstico especializado (Sacarlal & Dennings 2018).

A aplicação de procedimentos para detecção de *Cryptococcus sp.*, nomeadamente a tinta de china e cultura, constituem técnicas validadas e comumente usadas na detecção de *Cryptococcus sp.* No entanto, um dos maiores desafios reside na ausência de um fluxograma optimizado, com um fluxo de trabalho claramente definido, o que acaba por influenciar negativamente nas práticas de rotina laboratorial, levando ao uso simultâneo dos meios ágar sabouraud dextrose e o meio cromogénio selectivo ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), o que resulta no excessivo uso dos meios e duplicação dos reforços, e para além disso as técnicas empregues apresentam discrepância entre os resultados obtidos. Em determinadas situações, é possível observar leveduras encapsuladas na preparação com tinta de china, mas sem correspondente crescimento na cultura, inversamente, há casos em que a cultura se apresenta positiva, mesmo sem visualização clara das leveduras na preparação com a tinta de china. Diante dessas limitações, importa determinar a acurácia das técnicas e propor um fluxograma optimizado que confira aos procedimentos a precisão, eficiência e fiabilidade. Neste contexto a questão levantada para a seguinte pesquisa é: **Qual é o fluxo laboratorial que pode contribuir no melhor rendimento diagnóstico e diferenciação das espécies de *Cryptococcus*?**

1.2.Justificativa

A criptococose é uma infecção grave causada por *Cryptococcus sp.* que acomete indivíduos imunocomprometidos e contribuído de forma significativa na morbilidade e mortalidade de indivíduos (Dantas *et al.*, 2023). A incidência e a gravidade desta infecção micológica invasiva letal tem aumentado, cerca de 70% dos indivíduos com HIV/SIDA desenvolvem doença neurológica.

O LM/FAMED tem contribuído no controlo desta infecção através de duas técnicas microbiológicas, nomeadamente: exame directo que inclui a tinta de china e o exame cultural, com recurso a meio ágar sabouraud dextrose e o meio cromogénio selectivo para *Cryptococcus sp.*, precisamente ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). O presente estudo visou o

estabelecimento de um fluxograma otimizado, contribuindo no melhor rendimento diagnóstico e uso racional dos meios disponíveis.

2. Objectivos

2.1.Objectivo geral

- Propor um fluxograma otimizado para a detecção de *Cryptococcus* sp. em amostras de Líquido Cefalorraquidiano no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

2.2.Objectivos específicos

- Determinar a frequência de culturas positivas de *Cryptococcus* sp. em amostras de LCR no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina entre Janeiro 2024 á Agosto 2025 com base no livro de registos;
- Determinar a acurácia da técnica de detecção directa de *Cryptococcus* sp. tendo como referência a cultura;
- Optimizar o fluxograma laboratorial de detecção de *Cryptococcus* sp.

3. Referencial teórico

3.1. Taxonomia e filogenia de *Cryptococcus* sp.

Cryptococcus sp. pertence ao domínio eucariotas, reino fungi, filo basidiomycota, ordem tremellales, família criptococcaceae e género criptococo. *Cryptococcus* sp. diversifica-se em espécies patogénicas (*C. neoformans*, *C. deneoformans*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii*, *C. deuterogatti* e *C. gattii*) e não patogénicas (*C. amyloletus*, *C. wingfieldii* e *C. floricola*) (Bahn *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2025). Contudo as análises de sequência apontam para dois grandes grupos patogénicos dentro do patógeno *Cryptococcus*, correspondente ao *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que divergiram de um ancestral comum há mais de 40 milhões de anos. O *C. neoformans* encontra-se distribuído mundialmente e causa criptococose sistémica principalmente imunocomprometidos, enquanto que espécies de *C. gattii* complexos são frequentemente encontrados em regiões tropicais e subtropicais e afectam indivíduos imunocompetentes (Bahn *et al.*, 2020).

3.2. Propriedades de *Cryptococcus* sp.

Cryptococcus sp. são fungos mesófilos aeróbicos que encontram-se principalmente em árvores ou em solo contaminado com excrementos de aves. São células leveduriformes e crescem através de brotamento em condições ricas em nutrientes. Apresentam uma camada cápsula polissacarídica cuja produção é estimulada por condições que mimetiza a fisiologia humana, incluindo CO₂ elevado, baixo teor de ferro, pH neutro ou alcalino. Tem a capacidade de utilizar vários substratos fenólicos, incluindo neurotransmissor dopamina (Bahn *et al.*, 2020).

3.3. Ciclo de vida de *Cryptococcus* sp.

O ciclo de vida de *Cryptococcus* sp. envolve forma assexuada e sexuada. A forma assexuada é a levedura haploide encapsulada que se reproduz por mitose com brotamento de base estreita que se encontra em amostras clínicas e ambientais. A forma sexuada é actualmente observada sob certas condições laboratoriais, resultando em meiose entre dois tipos de acasalamento (MATa e MATa) para formar ligações em grampo, basídios e basidiósporos. As cepas do tipo de acasalamento a representam a grande maioria dos isolados clínicos e ambientais, podendo dever-

se à sua capacidade de produzir frutos haploides. O acasalamento entre duas estirpes do mesmo sexo (MAT_{Aa}- MAT_{Aa}) pode produzir os esporos infecciosos que causam infecção em humanos (Maziarz & Perfect, 2016).

3.4. Epidemiologia de *Cryptococcus* sp. no mundo

A criptococose é uma infecção fúngica sistémica, distribuída de forma global e endémica no nordeste do Brasil, Paraguai, México, Austrália, Índia, Sudeste Asiático, Europa, Califórnia (EUA), Nigéria, África do Sul, Moçambique, Uganda, Etiópia, Quênia, Tanzânia, República Democrática do Congo, Zimbábue, Indonésia e Zâmbia (Carmo *et al.*, 2022).

Em 2014 estimativas mostravam que a incidência global de meningite criptocócica era substancial, com 223.100 casos anualmente e a África Subsariana apresentava maior carga da doença, pois é onde o HIV/SIDA é um factor de risco dominante (Rajasingham *et al.*, 2017; Wembabazi *et al.*, 2022). É considerado uma ameaça a saúde pública, sendo responsável por 15 % das mortes entre os doentes com HIV/SIDA. As taxas de mortalidade da meningite criptocócica com os tratamentos antifúngicos actuais variam entre 10 a 70%, sendo as taxas de mortalidade mais elevadas observadas nas regiões subsaarianas de África (Bahn *et al.*, 2020).

Em África as infecções do sistema nervoso central (SNC) mais notificadas são a meningite criptocócica e a histoplasmose. Em 2017, estimou-se que cerca de 160.000 pessoas foram diagnosticadas com meningite criptocócica em África, dos quais 98% destes casos localizam-se na região Subsariana, constituindo na sua maioria casos da África do Sul, Nigéria e Moçambique com cerca de 20.000 casos por ano, comparativamente a norte de África com menor número de casos (Mohamed *et al.*, 2022).

Em Moçambique *C. neoformans* é considerada a causa mais comum de meningite entre adultos com imunodepressão grave devido ao HIV. Estima-se que o número de casos ronde os 18.600 por ano, num estudo com doentes hospitalizados com HIV no Sul de Moçambique, a prevalência foi de aproximadamente 5,3% (Langa *et al.*, 2025).

3.5. Características clínicas de criptococose

Cryptococcus sp. não é transmitido de humano para humano, a exposição ambiental é comum e assintomática na população em geral, uma vez que o fungo é eliminado ou entra em estado latente,

a criptococose apresenta manifestações variadas, sendo a meningite criptocócica a forma grave mais comum (Bahn *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2024).

As aves actuam como grandes disseminadores ambientais, podendo mover-se entre as terras agrícolas e áreas urbanizadas semeando células criptocócicas por toda a ecologia. O conteúdo nitrogenado e o pH baixo das fezes são essenciais para suportar a sobrevivência fúngica por dois anos. A perturbação mecânica destas fezes pode resultar em propágulos infecciosos aerolizados que podem ser inalados e estabelecer uma infecção pulmonar primária numa pessoa susceptível (Rapeso *et al.*, 2025).

A doença pode ser assintomática e sintomática. Os sintomas mais comuns são febre, mal-estar e dor de cabeça, outros sintomas como tosse, dispneia e erupção cutânea sugerem uma doença disseminada (Ruschel & Thapa, 2023). A criptococose pulmonar é assintomática em até 25-55% dos casos se apresentando como um achado incidental em exames de imagem torácica (Howard-Jones *et al.*, 2022).

3.6. Mecanismo de virulência de *Cryptococcus* sp.

Muitos factores de virulência contribuem para a patologia deste patógeno intracelular oportunista, como a cápsula, a formação de melanina e a secreção de diversas enzimas. A presença de uma cápsula polisacarídica em torno da parede celular produzida tanto no ambiente como em hospedeiros indetetados representa um importante factor de virulência. Estudos bioquímicos demonstram que a cápsula é composta principalmente por um polímero designado glucuronoxilomano e por outro designado glucuronoxilomanano e por nanoproteínas. Os polissacárideos capsulares tem propriedades imunomoduladoras e melhoram a sobrevivência dos fungos, auxiliando na evasão imunitária do hospedeiro. O glucuronoxilomano é um forte inibidor da fagocitose e é imunomodulador através da regulação negativa de citocinas inflamatórias, depleção de componentes do complemento e inibição da apresentação de antígenos dos monócitos, outros componentes como a lactonoidrolase capsular envolvidos na estrutura terciária capsular, inibem a deposição de componentes do sistema complemento, esta inibição impede a destruição do fungo através da formação do complexo de ataque à membrana e dos fragmentos IC3b, que são importantes opsoninas (Bahn *et al.*, 2020; Carmo *et al.*, 2022).

Cryptococcus sp. produz biofilmes que aderem a superfícies bióticas ou abióticas e estão rodeadas por uma matriz extracelular que pode proteger a levedura dos medicamentos antifúngicos e do sistema imunitário do hospedeiro e pode afectar os dispositivos médicos (Carmo *et al.*, 2022). Outro factor de virulência é a melanina, um pigmento escuro amplamente encontrado na natureza, que é resistente aos ácidos e insolúvel em água. Em *Cryptococcus* sp. a melanina é sintetizada na presença de compostos difenólicos, a melanina acumula-se na parede celular providenciando protecção contra luz ultravioleta, radiação, péptidos antimicrobianos, calor, medicamentos antifúngicos e fagocitose. A acumulação da melanina confere vantagem selectiva durante a infecção (Rossi & Zaragoza, 2017).

As alterações morfológicas nos fungos como o desenvolvimento de hifas, desempenham também um papel importante durante a virulência porque contribuem para a adesão, disseminação e evasão imunitária, no caso de *Cryptococcus* sp. os filamentos são formados apenas durante a reprodução sexuada, mas raramente estão presentes nos tecidos. Durante a infecção, a maioria das células encontra-se como blastoconídeos arredondados, contudo existe uma grande variação no tamanho das células fúngicas, o que resulta no aparecimento de células de tamanho anormalmente grandes, denominadas células titã (Rossi & Zaragoza, 2017).

4. Métodos de detecção de *Cryptococcus* sp.

4.1. Análises preliminares da amostra de líquido cefalorraquidiano

Antes do tratamento da amostra são feitas análises preliminares para fornecer um diagnóstico presuntivo de meningite criptocócica. Estas análises incluem a cor, a transparência, a viscosidade, as proteínas, a glicose, a contagem de leucócitos e a contagem de eritrócitos do LCR (Kwizera *et al.*, 2024).

A cor do LCR normal deve ser incolor, a sua análise pode ser feita de forma macroscópica em frente a uma folha de papel branca. As alterações da cor do LCR não são diagnósticas mas podem indicar a presença de outras substâncias na amostra. A coloração rosa, amarela ou laranja é indicativo da presença de compostos pigmentados, como a oxiemoglobina, a birrulina e a metaemoglobina, que são geralmente derivados da degradação dos glóbulos vermelhos. O LCR turvo ou opaco pode indicar a presença de glóbulos brancos ou vermelhos, microrganismos ou um aumento dos níveis de proteínas. Os doentes com meningite criptocócica apresentam geralmente

um líquido incolor, mas um turvo é comumente indicativo de meningite bacteriana ou meningite tuberculosa ou uma coinfeção de meningite criptocócica e meningite bacteriana ou tuberculosa. O LCR normal tem a mesma consistência que a água mas o espesso pode indicar meningite. Os doentes com meningite criptocócica apresentam ocasionalmente LCR mais espesso, mas isso não é conclusivo (Kwizera *et al.*, 2024).

As proteínas do LCR são analisadas medindo a densidade óptica com um espectrofotómetro e, em seguida, comparando-a com uma curva padrão de concentrações proteicas conhecidas. As diminuições na proteína do LCR não são geralmente consideradas significativas. Os níveis proteicos no LCR apresentam uma elevada variabilidade na meningite criptocócica associada ao HIV (Kwizera *et al.*, 2024). O teste de pandy é um método semi-quantitativo convencional para avaliar o aumento de proteínas, especialmente a globulina no LCR, que é determinado pela precipitação em solução de fenol. É um teste visual tradicional para a dosagem de proteínas, com a vantagem de apresentar resultados rápidos e de baixo custo. Em adultos e crianças, o nível normal de proteína total no LCR deve ser inferior a 45 mg/dL. Os resultados proteicos anormais podem auxiliar no diagnóstico e tratamento de diversas doenças, especialmente inflamações do sistema nervoso central (Dong *et al.*, 2024).

A contagem de leucócitos no LCR é outro parâmetro importante, pois considera-se normal a existência de poucos glóbulos brancos no LCR, no entanto o aumento significativo pode ser causado por uma infecção. Nesta análise verifica-se a quantidade e a variação da morfologia dos glóbulos brancos presentes numa amostra. A visualização de pequenas quantidades de linfócitos e monócitos é normal no LCR. Uma contagem de glóbulos brancos acima ou igual a 5 células/ μL é considerada elevada. Os linfócitos são geralmente elevados na meningite criptocócica (Kwizera *et al.*, 2024).

4.2. Diagnóstico laboratorial de *Cryptococcus* sp.

O diagnóstico de *Cryptococcus* sp. em doentes infectados pelo HIV é baseado em microscopia, tinta de China ou Índia, cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR) e a detecção do antígeno criptocócico no soro ou no LCR (Zhao *et al.*, 2023).

4.2.1. Microscopia de tinta de china

O uso da microscopia de tinta de china ou índia, é considerado um método que aplica um reagente de baixo custo e pode ser realizado em condições laboratoriais simples, no entanto apesar da sua fácil acessibilidade, apresenta dependência de interpretação subjectiva e uma baixa sensibilidade (42,9%), particularmente em doentes com baixa carga fúngica, por isso não se torna viável como a única ferramenta de diagnóstico, pela susceptibilidade de apontar para diagnósticos errados principalmente logo após o início dos sintomas ou em doentes em tratamento antirretroviral (Paes *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2023; Morjaria *et al.*, 2025).

4.2.2. Cultura fúngica de *Cryptococcus* sp.

A cultura fúngica é o padrão de ouro para diagnóstico de *Cryptococcus* sp. contudo, também pode produzir falso-negativos semelhantemente a tinta de china quando a carga fúngica é baixa, por isso para contrapor essa possibilidade o volume de LCR aplicada para a cultura fúngica foi modificado de 10 μ l para 100 μ l. Esta alteração levou a uma melhoria da sensibilidade diagnóstica da cultura fúngica do LCR de 82,4% para 94,25%. Porém existem desvantagens intrínsecas concernentes a cultura fúngica como a natureza geral de crescimento lento do fungo, bem como um estado fisiológico específico de *Cryptococcus* sp. designado por estado viável, mas não cultivável. Estes factores condicionam a demora do resultado na cultura, contudo ela é essencial para o diagnóstico definitivo (Zhao *et al.*, 2023).

4.2.3. Teste de aglutinação em látex CrAg

A detecção de antígenos criptocócicos, como o polissacarídeo capsular glucuronoxilomanano (GXM) no soro ou no LCR, tornou-se uma abordagem diagnóstica essencial e é utilizada para o diagnóstico presuntivo, por ser um teste muito sensível, específico e eficaz que pode detectar a infecção precocemente, antes do início dos sintomas e antes que a doença possa evoluir para meningite com risco de vida. A sua sensibilidade é de 94% e a especificidade de 100% (Zhao *et al.*, 2023; Pfaller, 2015).

O teste de aglutinação em látex CrAg é um teste serológico qualitativo e semi-quantitativo para detecção de antígenos polisacarídicos capsulares, pode ser realizado em sangue total, soro, plasma e LCR. O teste tem um valor diagnóstico e prognóstico, uma vez que a doença progressiva é

geralmente acompanhada por títulos crescentes de antígenos. Este teste requer pré-aquecimento da amostra e os resultados são obtidos em 2 horas (Kwizera *et al.*, 2024).

4.2.4. Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático tem sido utilizado para diagnosticar a meningite criptocócica e ela requer infraestruturas laboratoriais mais sofisticadas (nível de biossegurança 2 ou 3). Apresenta um tempo de resposta de 24 horas e uma baixa sensibilidade (Kwizera *et al.*, 2024).

4.2.5. Reacção em cadeia da polimerase em tempo real

A reacção em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) apresenta elevada sensibilidade e especificidade, é rápida e pode ser realizada com pequenos volumes de LCR. Os testes RT-PCR apresentam um excelente desempenho com o tempo de resposta de aproximadamente 4 horas (Kwizera *et al.*, 2024).

4.2.6. Histopatologia

A histopatologia é utilizada para diagnosticar doenças disseminadas através de biópsias. É usada em estudos de autópsia para determinar a causa da morte. Baseia-se nas características micromorfológicas do *Cryptococcus* sp. e inclui técnicas histoquímicas de hematoxilina e eosina e prata de Grocott, bem como colorações histoquímicas especiais (Kwizera *et al.*, 2024).

4.3. Acurácia dos testes diagnósticos para detecção de *Cryptococcus* sp.

4.3.1. Sensibilidade

A sensibilidade é a proporção de indivíduos verdadeiros positivos em relação ao total de pacientes com determinada condição ou seja com a doença. A sensibilidade também pode ser a capacidade de um teste ou instrumento produzir um resultado positivo para um indivíduo que possui essa doença. A equação corresponde a : $\text{Verdadeiros positivos (VP)} / \text{Verdadeiros positivos (VP)} + \text{Falsos negativos (FN)}$ ou $\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN}$. A sensibilidade não possibilita que os profissionais de saúde concluam que os indivíduos que testaram positivo, não tenham a doença (Shreffler & Huecker, 2023).

4.3.2. Especificidade

A especificidade é a proporção de verdadeiros negativos em relação a todos os indivíduos que não apresentam uma doença ou condição. Consiste na capacidade do teste ou instrumento de obter resultados dentro da faixa normal ou negativos para uma pessoa que não possui a doença. A fórmula é: $\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN+FP}$ (Shreffler & Huecker, 2023).

Na acurácia considera-se (Baratloo *et al.*, 2015):

- **Falsos positivos (FP):** o número de casos identificados incorrectamente como pacientes.
- **Falsos negativos (FN):** o número de casos identificados incorrectamente como saudáveis.
- **Verdadeiros positivos (VP):** o número de casos correctamente identificados como pacientes.
- **Verdadeiros negativos (VN):** o número de casos correctamente identificados como saudáveis.

Considerando o padrão ouro a cultura serão considerados:

- **Falsos positivos (FP):** amostras de indivíduos que apresentam positividade na técnica de tinta de china e sem crescimento de fungos no exame cultural.
- **Falsos negativos (FN):** amostras de indivíduos que não apresentam positividade na técnica de tinta de china e apresentam positividade no exame cultural.
- **Verdadeiros positivos (VP):** amostras de indivíduos que apresentam positividade na técnica de tina de china e no exame cultural ou apenas no exame cultural.
- **Verdadeiros negativos (VN):** amostras de indivíduos que apresentam negatividade na técnica de tina de china e no exame cultural.

4.4. Manejo clínico de criptococose

O tratamento da doença depende das características do hospedeiro, do envolvimento do órgão e da apresentação clínica e inclui terapêutica antifúngica na doença divide-se em fases de indução, consolidação e manutenção (ou profilaxia secundária). A fase de indução permite eliminar ou reduzir significativamente a carga fúngica, enquanto que a fase de consolidação visa manter a negatividade fúngica e a normalização dos parâmetros clínicos e laboratoriais. A fase de

manutenção é administrada em doentes HIV positivos até recuperação imunológica para prevenir recidivas, durante 12 a 24 meses e até que a contagem de células CD4 atinja 100 a 200 células (Carmo *et al.*, 2022).

Os principais antifúngicos usados para o tratamento da doença criptocócica em todo mundo são a anfotericina, a flucitosina e o fluconazol . A anfotericina liga-se ao ergosterol na membrana celular, levando à formação de poros e a morte celular, enquanto a flucitosina inibe a replicação do ADN e a síntese proteica, o fluconazol, bloqueia a produção de ergosterol na via de biossíntese, visando especificamente à acumulação de um intermediário esterol tóxico (Carmo *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023).

Na prática actual limitam-se a quatro classes de agentes antifúngicos sistémicos, azóis, polienos, pirimidinas e equinocandinas. A limitação nas opções de tratamento antifúngico para a infeção invasiva por *Cryptococcus* é significativa, dado que *Cryptococcus sp.* tem resistência intrínsecas equinocandinas e alguns isolados clínicos aos azóis. Portanto, a polieno anfotericina B (AmB) tem sido prescrita como o principal medicamento antifúngico para o tratamento de infecções crptocócicas, apesar da sua toxicidade e do custo muito elevado das formulações menos tóxicas (Zhao *et al.*, 2023).

5. Metodologia

5.1. Tipo de estudo

A presente pesquisa é um estudo transversal retrospectivo com base em análise de dados secundários colhidos no estudo principal com o título “Vigilância das infecções fúngicas cutâneas, invasivas e oportunistas no Hospital Central de Maputo” com o registo Ref.^a: 475/CNBS/25”.

5.2. Área do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina (LM/FAMED). A LM/FAMED está localizada na cidade de Maputo, distrito municipal KaMpfumo, situando-se entre a Av. Eduardo Mondlane e Av. Salvador Allende n.º 702. Está subdividido em dois Sectores, o de Microbiologia e o de Parasitologia. O Sector de Microbiologia inclui quatro de subunidades nomeadamente, Micologia, Bacteriologia, Serologia e Biologia Molecular. O LB/FAMED suporta actividades de ensino da disciplina de Microbiologia do curso de Licenciatura em Medicina Geral, e apoia nas actividades de laboratório aos estudantes de área de ciências biológicas, mestrado e doutoramento.

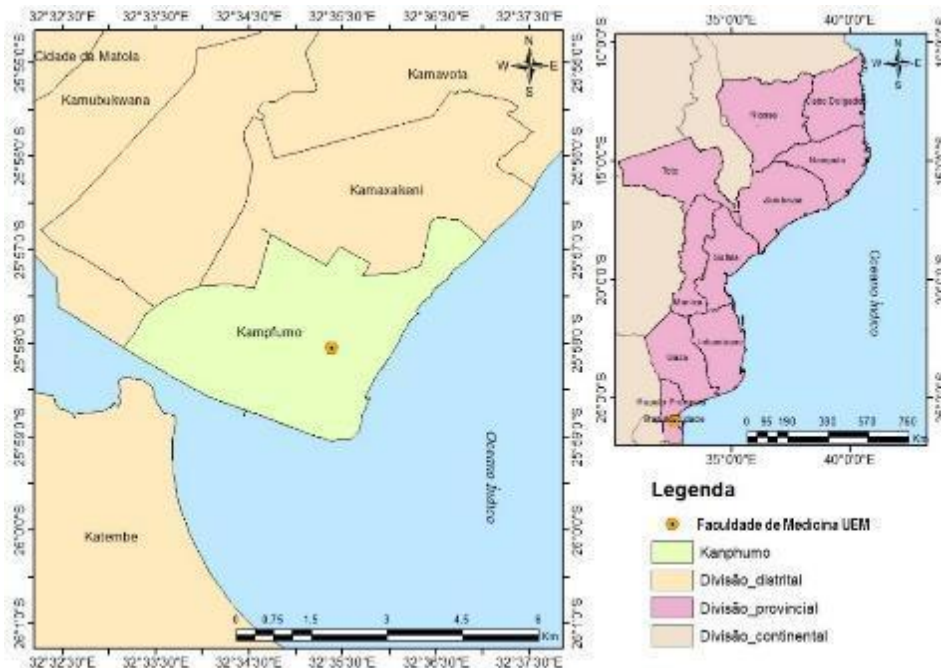


Figura 1: Mapa de localização do LM/FAMED.

5.3. População e amostragem

Para este estudo foram incluídos dados de análises microbiológicas de LCR retiradas do livro de registo dos resultados do estudo principal. As amostras de LCR recebidas no LM/FAMED eram provenientes do Hospital Central de Maputo (HCM) e do Centro de Referência do Alto Maé (CRAM). A amostragem foi por conveniência, através da inclusão de todos os dados de amostras de pacientes submetidas ao laboratório entre Janeiro 2024 á Agosto 2025 para pesquisa de *Cryptococcus* sp. e que reuniam todos os requisitos dos critérios de inclusão.

5.4. Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo os resultados de todas amostras do LCR cuja requisição solicitava pesquisa de fungos ou *Cryptococcus* sp e que continham dados de proveniência.

5.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos dados incompletos na base (proveniência, resultado de cultura e da tinta de china).

5.6. Procedimentos

5.6.1. Extracção de dados

A fonte de dados foi o livro de registo de entrada de amostras e dos resultados das análises microbiológicas. O livro de registo capta os dados como nome, idade, sexo, raça e a origem da amostra, assim como a data e hora de recepção, e o resultado do procedimento analítico. A cada registo de amostra foi atribuído um código de forma sequenciada.

5.6.2. Técnicas de processamento de amostras no estudo principal

No estudo principal, as amostras de LCR foram centrifugadas em tubos de falcon de 15ml a velocidade de 1500 rpm por 10-15 minutos, a fim de visualização do *Cryptococcus* sp. Depois da centrifugação, o concentrado foi usado para preparação de um esfregaço em lâmina. Sobre o esfregaço, foi colocado uma gota de *tinta de china*. De seguida, foi colocada uma lamela sobre a suspensão e por fim visualizado ao microscópio óptico com a objectiva 40x. Nesta técnica, a cápsula polisacarídica do *Cryptococcus* sp. não absorve o corante, resultando no aspecto de um círculo branco refratário sobre um fundo escuro.

Em paralelo, uma parte do sedimento ou sobrenadante foi semeada em estrias por esgotamento com pipetas estéreis calibradas de 100 µl em placas de ágar sabouraud dextrose e ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). O preparado foi incubado na estufa por 7 dias à 37°C. As característica das colónias em ágar sabouraud dextrose foram as seguintes: lisas, mucóides ou viscosas. Em ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) as colónias de *Cryptococcus sp.* tomaram a cor azulada resultante da utilização de glicina durante 48 á 72h (Klein *et al.*, 2009; McTaggart *et al.*, 2011; Chisale *et al.*, 2020; Dantas *et al.*, 2023).

6. Tipos e variáveis no presente estudo

As variáveis do presente estudo foram:

- **Variáveis independente:** Proveniência.
- **Variáveis dependentes:** Resultados de análise microbiológicas com a tinta de china (positivos e negativos) e resultados de análise microbiológicas com a cultura (positivos e negativos).

6.1. Materiais e consumíveis no presente estudo

Tabela 1: Materiais e consumíveis necessários para a realização do estudo

Materiais e consumíveis
Livro de registos do laboratório para consulta
Caneta Bic para anotações
Lápis HB para anotações
Caderno de anotações
Agrafador
Laptop para registo de informações

7. Aspectos éticos

Este é um sub-estudo do estudo principal com o título “Vigilância das infecções fúngicas cutâneas, invasivas e oportunistas no Hospital Central de Maputo” com o registo Ref.^a: 475/CNBS/25 (Anexo 2). Por questões éticas os dados colhidos registados nos livros de registo do LM/FAMED foram codificadas de modo garantir confidencialidade dos indivíduos. Por tratar-se de um estudo retrospectivo, este não implicou nenhum adicional risco aos pacientes visto que não contou com intervenção activa dos participantes e as questões éticas foram devidamente observadas.

8. Análise de dados

Tabela 2: Tabela de tratamento de dados

Objectivos específicos	Variáveis	Análises de dados
1.Determinar a frequência de <i>Cryptococcus sp.</i> nas amostras de LCR recebidas no LM/FAMED entre Janeiro 2024 á Agosto 2025;	Resultado cultural em Agar Sabouraud dextrose e CGB	Estatística descritiva (proporção)
2..Determinar a acurácia da técnica detecção directa de <i>Cryptococcus sp.</i> tendo como referência a cultura;	Resultado da tinta de china	Cálculo de sensibilidade e especificidade baseado em tabela de contingência 2x2 e da significância com base na plataforma Medcalculate.
	Resultado de método cultural (CGB e agar sabouraud dextrose)	
3.Otimizar o fluxograma laboratorial para detecção de <i>Cryptococcus sp.</i>	Resultado da tinta de china	Cálculo de sensibilidade e especificidade baseado em tabela de contingência 2x2 e da significância com base na plataforma Medcalculate.
	Resultado de método cultural (CGB e agar sabouraud dextrose)	

9. Resultados

9.1.Frequência de *Cryptococcus* sp. nas amostras de LCR recebidas no LM/FAMED

A análise de base de dados contendo resultados de exame microbiológicos entre Janeiro 2024 e Agosto 2025, demonstrou que deram entrada no LM/FAMED um total de 235 amostras. Para o presente estudo foram excluídas 43 (18%) amostras por falta de informação relevante para a análise. Foram incluídas na análise 192 (82%) resultados de amostras. As amostras com resultados analisados, 173 (90,1%) provinham do HCM (Hospital Central de Maputo) e 19 (9,9%) do CRAM (Centro de Referência do Alto Maé).

Com o método cultural, 10 (5,2%; 10/192) amostras foram positivas para *Cryptococcus* sp. em meio ágar sabouraud dextrose (SDA) e ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), dos quais 7 (3,6%) eram do HCM e 3 (1,6%) do CRAM (tabela 3).

Tabela 3: Resultados laboratoriais da cultura em meio ágar sabouraud dextrose (SDA) e ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) em relação a proveniência

Proveniência	Resultados de cultura (SDA e CGB)			
	Positivo	Negativo	Outros	Total
CRAM	3 (1,6%)	16 (8,3%)	0%	19 (9,9%)
HCM	7 (3,6%)	164 (85,4%)	2(1%)	173 (90,1%)
Total	10 (5,2%)	180 (93,7%)	2 (1%)	192(100%)

***Outros**- crescimento de outros microrganismos diferentes de *Cryptococcus* sp.

No exame directo com tinta de china, em 26 (13,5%; 26/192) amostras foram observadas estruturas sugestivas de leveduras capsuladas, o que sugeriu a presença de *Cryptococcus* sp. Do total de amostras positivas, 18 (9,4%; 18/192) provinham do HCM e 8 (4,2%; 8/192) do CRAM (tabela 4).

Tabela 4: Resultados laboratoriais em relação ao exame com tinta de china

Resultados do exame directo com tinta de china			
Proveniência	Positivo	Negativo	Total
CRAM	8 (4,2%)	11(5,7%)	19 (9,9%)

HCM	18 (9,4%)	155 (80,7%)	173 (90,1%)
Total	26(13,5%)	166 (86,4%)	192 (100%)

9.2.Acurácia da técnica de detecção directa (tinta de china) tendo como padrão a cultura (CGB) na detecção de *Cryptococcus* sp.

Das 192 amostras analisadas, obteve-se 3 (1,6%) verdadeiros positivos (VP) e 158 (82,3%) verdadeiros negativos (VN). Com base nos resultados de exame directo, 24 (12,5%) casos tiveram resultados falsos positivos (FP) e 7 (3,6%) falsos negativos (FN) (tabela 5). Estes resultados mostram que, se a manutenção do tratamento dependesse unicamente do resultado de exame directo, provavelmente 24 pacientes teriam sido mantidos numa terapêutica inapropriada contra os 3 pacientes verdadeiramente positivos.

Tabela 5: Cálculo de sensibilidade e especificidade da técnica de detecção directa tendo como padrão o meio cultural CGB de *Cryptococcus* sp.

Teste em avaliação	Teste padrão (CGB)		Total
	Cultura positiva	Cultura Negativa	
Tinta de china positiva	3 (1,6%)	24 (12,5%)	27 (14,1%)
Tinta de china negativa	7 (3,6%)	158 (82,3%)	165 (85,9%)
Total	10 (5,2%)	182 (94,8%)	192 (100%)

Com base nos resultados, foi calculada a acurácia diagnóstica do exame directo, como se segue:

- Sensibilidade (ou capacidade de identificar positivos):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{3}{3 + 7} = \frac{3}{10} = 0,30 \text{ (30\%)}$$

- Especificidade (ou capacidade de identificar negativos):

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{158}{158 + 24} = \frac{158}{182} \approx 0,868 \text{ (86,8\%)}$$

Estimando a sensibilidade, a técnica com tinta de china apresentou uma sensibilidade de 30% (IC 95%:6,67%-65,25%) e especificidade de 86,8% (IC 95%: 81,02%-91,36).

9.3. Proposta de fluxograma laboratorial para detecção de *Cryptococcus* sp. para o uso no LM/FAMED

O fluxograma actualmente em uso no LM/FAMED é o seguinte:

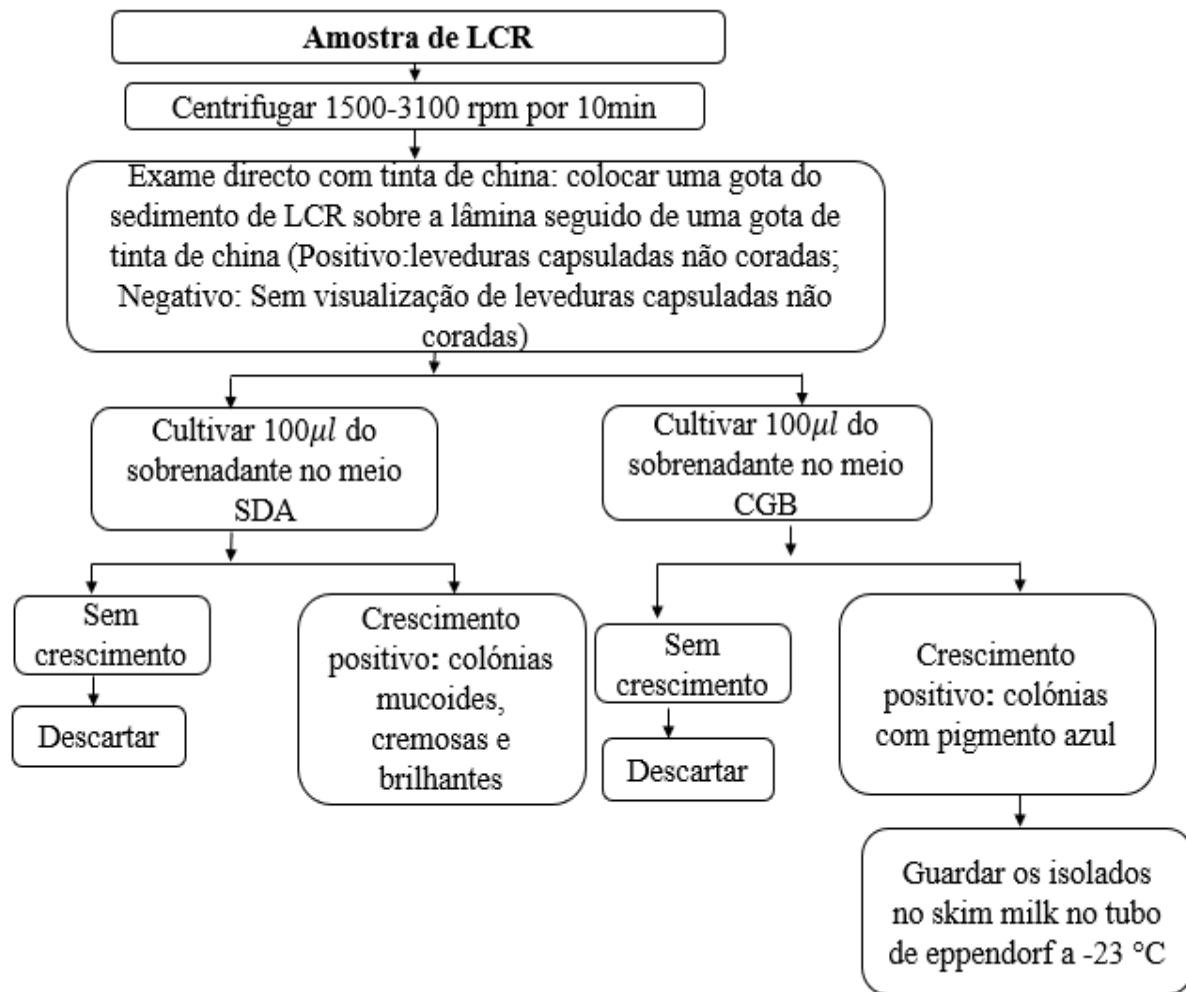


Figura 2: Fluxograma laboratorial em uso para detecção de *Cryptococcus* sp. no LM/FAMED

*SDA- ágar sabouraud dextrose; CGB- canavanina-glicina-azul de bromotimol.

O fluxograma utilizado no LM/FAMED envolve o uso simultâneo do meio selectivo ágar sabouraud dextrose (SDA) e meio diferencial ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) no âmbito de detecção de *Cryptococcus* sp.

Com base na baixa sensibilidade da técnica de tinta de china, propõe-se o seguinte fluxograma:

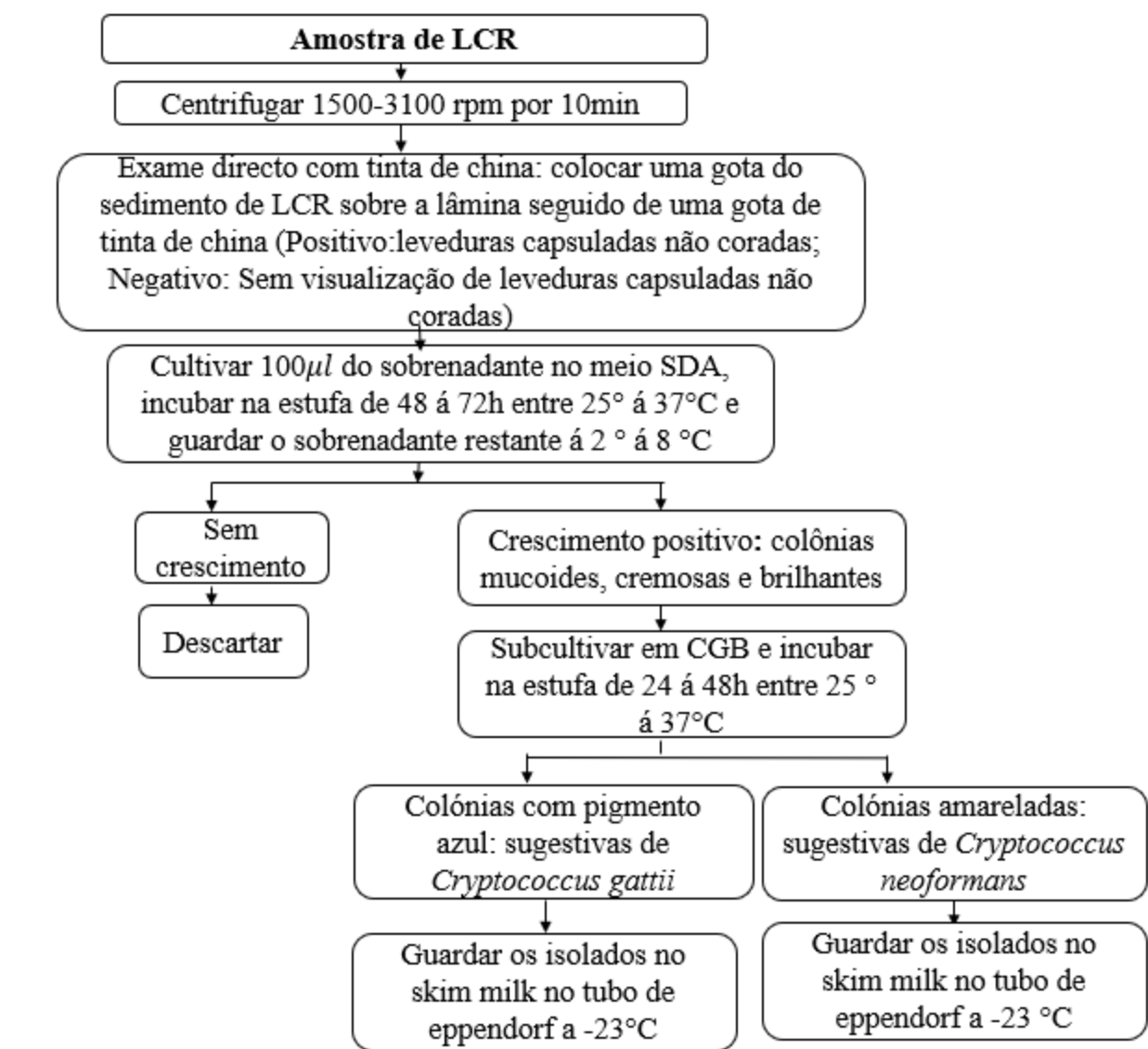


Figura 3: Fluxograma laboratorial proposto para detecção de *Cryptococcus* sp. no LM/FAMED

O fluxograma proposto sugere que após a aplicação da técnica de detecção com tinta de china, se aplique uso sequencial dos meios de cultura, iniciando com o meio selectivo ágar sabouraud dextrose (SDA) e, em seguida, o meio diferencial ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol para diferenciação das espécies (Anexo 1).

10. Discussão dos resultados

A frequência de *Cryptococcus* sp., verificada no presente estudo com base no meio de cultura ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) foi relativamente mais alta (5,2%; 10/192) do que a verificada em outros estudos realizados em Quênia (1,6%; 8/499) e na Uganda (0/200) (Wembabazi *et al.*, 2022). De igual modo, a frequência de casos positivos através de exame directo com tinta de china, 14,1% (27/192) casos, foi relativamente mais alta do que a registada no estudo realizado em Malawi , com 6,4% (17/265) (Chisale *et al.*, 2020).

Em Laboratórios de Microbiologia em Moçambique, incluindo o da FAMED, a técnica de exame directo com tinta de china é frequentemente usada por ser um método mais rápido e de baixo custo. Porém, a sensibilidade e especificidade é condicionada pela concentração do fungo, normalmente requer uma alta carga fúngica maior que 1.000 UFC/mL para sua detecção e a proficiência do microscopista é outro factor determinante, pois os leucócitos lizados podem ser confundidos com elementos fúngicos (Gitonga *et al.*, 2019; Vidal & Boulware, 2015).

Consequentemente, os treinamentos contínuos na aplicação e interpretação da observação microscópica são determinantes para a qualidade do resultado (Pfaller, 2015). Olhando para a realidade de Moçambique, os treinamentos contínuos podem afectar significativamente na vigilância epidemiológica, redução da mortalidade, custos associados a internamentos desnecessários e compra de antifúngicos para administração de indivíduos falsos positivos olhando para os factores logísticos.

A sensibilidade da tinta de china observada no LM/FAMED (30%) foi baixa relativamente ao estudo realizado em Malawi (86%) (Boulware *et al.*, 2014). Contudo foi semelhante com outros estudos realizados na África Subsariana. Por essa razão, a cultura é priorizada para confirmação, sendo o meio ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) ideal para a diferenciação das espécies *C.gattii* e *C.neoformans*. *C.gattii* pela sua capacidade de usar glicina como fonte de nitrogénio e carbono, o seu crescimento condiciona a alteração do meio para azul enquanto que no caso de *C.neoformans*, o meio permanece inalterado (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

A identificação precisa das espécies não é apenas de interesse taxonómico, mas também pode ser clinicamente relevante, visto que pacientes infectados por cada espécie podem apresentar

diferentes factores de risco, no caso de *C.neoformans* o factor de risco mais comum é o SIDA e este normalmente está associada a meningite enquanto que infecções causadas por *C. gatii* são relatadas com mais frequência em pacientes imunocompetentes com risco indefinido e é a causa principal das infecções pulmonares (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A eficácia dos tratamentos antifúngicos também pode variar de acordo com a espécie pois as concentrações inibitórias mínimas médias para antifúngicos azólicos como fluconazol variam de acordo com a espécie (Poplin *et al.*, 2024).

Um estudo sobre a distribuição dos testes diagnósticos em Uganda e África do Sul, revelou maior sensibilidade da cultura em comparação com a tinta de china (86,1%), embora o desempenho possa variar em função do volume do LCR (aproximadamente 82% para 10 μ l e 94% para 100 μ l), o que reforça ainda mais a necessidade do uso da cultura como método adicional (Cohen, 1984; Boulware *et al.*, 2014; Abassi *et al.*, 2015; Mazirz *et al.*, 2016; Rajasingham *et al.*, 2019).

O número de falsos positivos (24) verificados no estudo implica custos na compra de antifúngicos e impacto na resistência antimicrobiana levando a falha do tratamento da criptococose, devido as mutações que podem ocorrer nas células. O número de falsos positivos pode estar directamente relacionado aos factores inerentes ao próprio reagente, como condições de conservação e titulação realizada pelos comerciantes, podendo afectar no desempenho da técnica de exame directo. Afirma-se que alguns fornecedores comerciais adicionam conservantes, como o timerosal, tornando esta formulação tóxica para *Cryptococcus* sp, o que permite apenas a verificação de estruturas estáticas mas também podendo contribuir na difícil visualização da cápsula, originando casos falsos negativos e, conseqüentemente, aumento das taxas de mortalidade (Paes *et al.*, 2018).

Os 24 falsos positivos e 7 falsos negativos verificados no estudo aumentam o risco de um diagnóstico perdido de meningite criptocócica, o que pode aumentar o risco da mortalidade dos pacientes. Em contrapartida, uma baixa carga fúngica no líquido cefalorraquidiano (LCR) está associada a uma alta taxa de sobrevida nos pacientes (Chen *et al.*, 2026).

A tinta de china usada no LM/FAMED, é adquirida em papelarias na cidade de Maputo, podendo ser um outro factor que influência os resultados obtidos, uma vez que não passa por nenhum mecanismo interno de verificação de qualidade e as condições de conservação não estão especificadas. Estes factores impõem a necessidade de controlo de qualidade da tinta a ser aplicada

e sempre que possível, a sua filtração prévia, para evitar que o fungo seja confundido com artefactos, bolhas de ar, detritos celulares e precipitados (Paes *et al.*, 2018).

O crescimento em meio de cultura, embora considerado o método de referência, também apresenta algumas limitações. A sua sensibilidade é afectada pela carga fúngica e estágio da infecção. Estas particularidades exigem um tempo de incubação 7 à 14 dias, o que aumenta o tempo de resposta. Para melhorar a decisão clínica, é relevante quantificar e reportar o número de linfócitos presentes, pois, geralmente, a presença de linfócitos igual ou maior do que 5 células/ μl sugere meningite criptocócica (Kwizera *et al.*, 2024).

Apesar de baixa sensibilidade de exame directo, este método é economicamente viável, e a detecção precoce é importante na gestão de antifúngicos, redução do tempo de hospitalizações e ocorrência de morbididades adicionais como acidente vascular, cegueira, surdez, comprometimento neurológico e disfunção cognitiva que podem ser ocasionadas pelo diagnóstico tardio (Pfaller, 2015; Oliveira de Sousa *et al.*, 2023). Segundo Chen *et al.* (2026) pacientes com resultados negativos no teste da tinta de china apresentam baixo risco de mortalidade em 90 dias.

Contudo, dependendo do estado imunológico do indivíduo, da gravidade da doença e da disponibilidade de medicamentos, vários esquemas terapêuticos devem ser considerados para o tratamento da criptococose. A OMS recomenda o tratamento utilizando uma estratégia que inclui três etapas, a indução inicial com base em anfotericina B, de forma insolada ou combinada com a flucitosina, seguido da consolidação e manutenção com base em fluconazol. O esquema preferencial para pacientes HIV-positivos com alta carga fúngica no líquido cefalorraquidiano consiste em anfotericina B mais 5-flucitosina (AmB+5FC). Assim a caracterização dos pacientes com resultados negativos para tinta de china ou cultura é essencial para melhorar a compreensão e o tratamento (Oliveira de Sousa *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2026).

O fluxograma escolhido propõe a aplicação do meio ágar Sabouraud dextrose como meio de isolamento primário, seguida da submissão das colónias isoladas ao meio ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) para confirmação e diferenciação. Esta proposta melhora a racionalização de meios de diagnóstico no processo de detecção de *Cryptococcus* sp. (Park *et al.*, 2017; Al-Zubaidy & Shabaa, 2023).

11. Conclusão

- A frequência de meningite por *Cryptococcus* sp. foi relativamente mais alta em relação aos estudos similares da região Subsaariana.
- A tinta de china demonstrou ser menos sensível que a cultura mas retém um grande desempenho na exclusão de casos negativos de infecção por *Cryptococcus* sp.
- O fluxograma delineado no presente estudo posiciona o meio de cultura ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol como procedimento de confirmação e diferenciação de culturas positivas de *Cryptococcus* sp. em meio ágar sabouraud dextrose.

12. Limitações

O estudo teve como limitações:

- A exclusão de 43 (18%) amostras devido a falta de informações essenciais (proveniência, resultado da tinta de China e resultado da cultura). Os dados podem ter influenciado nas estimativas da frequência e acurácia das técnicas.
- Por se tratar de um estudo com recursos a dados secundários, não foi possível identificar os factores que contribuíram para a baixa sensibilidade do exame directo com tinta de china.

13. Recomendações

- Aos investigadores ou pesquisadores, a aplicação de um fluxograma sequencial no diagnóstico de criptococose e filtração da tinta de china.

- Ao LM/FAMED, a implementação de um sistema de registo digital de dados a fim de garantir a captação exaustiva e segurança das informações e melhorar a vigilância epidemiológica de base laboratorial.

14. Referências bibliográficas

- Al-Zubaidy & Shabaa, R.A. (2023). Evaluation the efficacy of some culture media in melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Science direct*, 80:3167-3170.
- Bahn, Y.-S., Sun, S., Heitman, J., & Lin, X. (2020). Microbe Profile: *Cryptococcus neoformans* species complex. *Microbiology*, 166(9), 797–799.
- Baratloo, A., Hosseini, M., & Negida, A. (2015). Part 1: Simple definition and calculation of accuracy, sensitivity and specificity. *Emergy*, 3(2):48-49.
- Boulware, D., Rolfes, M., Rajasingham, R., Von Hohenberg, H., Quin, Z., Taseera, K., Schutz, C, Kwizera, R, Butler, E., Meintjes, G., Muzoora, C., Bischof, J. & Meya, D. (2014). Multisite validation of Cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. *Emerg infect*, 20:45-53.
- Carmo, F. N., de Camargo Fenley, J., Garcia, M. T., Rossoni, R. D., Junqueira, J. C., de Barros, P. P., & Scorzoni, L. (2022). *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: Focusing on the infection in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(3), 1321–1337.
- Chang, C. C., Harrison, T. S., Bicanic, T. A., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T. C., Warris, A., Hagen, F., Spec, A., Oladele, R., Govender, N. P., Chen, S. C., Mody, C. H., Groll, A. H., Chen, Y.-C., Lionakis, M. S., Alanio, A., Castañeda, E., Lizarazo, J., Vidal, J. E., ... Perfect, J. R. (2024). Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: An initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(8), e495–e512
- Chen, L., Chen, G., Ye, S., Qin, J., Huang, G. & Xu, L. (2026). India ink-negative and culture-negative cryptococcal meningitis in HIV-negative patients. *BMC Infect Dis*, 26:328.
- Chisale, M.R., Salema, D., Sinyika, F., Mkwaila, J., Kamudumuli, P. & Lee, Hsin-yi (2020). A comparative evaluation of three methods for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis (CM) among HIV-infected patients in Northern Malawi. *Malawi Medical Journal*, 32 (1):3-7.
- Coelho, C., & Farrer, R. A. (2020). Pathogen and host genetics underpinning cryptococcal disease. *Advances in genetics*, 105, 1–66.
- Coelho, M., David-Palma, M., Aylward, J., Pham, N., Visagiez, C., Fuchs, T., Yilma, N., Roets, F., Sol, S., Taylor, J., Wingfield, B., Fisher, M., Wingfield, M. e Heitman, J. (2025).

Decoding *Cryptococcus*: From African biodiversity to worldwide prevalence. *Plos pathog*, 21(2):e1012876.

- Cohen, J. (1984). Comparison of the sensitivity of three methods for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of clinical pathology*, 37: 332-334.
- Coovadia, Y., Mahomed, S., Dorasamy, A., & Chang, C. (2015). A comparative evaluation of the Gram stain and India ink stain for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis in HIV infected patients in Durban. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 30(2), 61–63.
- Dantas, K.C., R.S., Xavier, S.C.S., Lombardi, A.M., Júnior, M. Vinicius, R.Criado, V.L. Teixeira e T.M. Bastos (2023). Comparative analysis of diagnostic methods for detection of *Cryptococcus neoformans* meningitis. *Plos negl trop dis*. 17 (3):e0011140.
- do Carmo, F. N., de Camargo Fenley, J., Garcia, M. T., Rossoni, R. D., Junqueira, J. C., de Barros, P. P., & Scorzoni, L. (2022). *Cryptococcus spp.* and Cryptococcosis: Focusing on the infection in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(3), 1321–1337.
- Dong, L., Wang, X., Xu, Q., Cao, R., Deng, X., Chen, J. & Jiang, H. (2024). An alternative method for inferring pand's test using cerebrospinal fluid total protein. *Pratical Laboratory Medicine*, 40:e00411.
- Fang, W., Wu, J., Cheng, M., Zhu, X., Du, Mingwei., Chen, C., Lião, W., Zhi, K. & Pan, W. (2023). Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. *Journal of Biomedical Science*, 30:42.
- Gitonga, L.K., Boru, W.G., Kwena, A., Maritim, M., Wamicwe, J. & Ransom, J. (2019). Point of care testing evaluation of lateral flow immunoassay for diagnosis of *Cryptococcus* meningitis in HIV-positive patients at an urban hospital in Nairobi, Kenya, 2017. *BMC reseach notes*, 12: 797.
- Hsiaõ, P., Cheng, H., Kao, Y., Wang, Y., Chiu, C., Chiang, W., Kuo, C., Chuu, C. & Wu, K. (2021). Comparison of laboratory diagnosis, clinical manifestation, and management of pulmonary cryptococcosis: Report of the clinical scenario and literature review. *Clinica Chimica Acta*, 524: 78-83.
- Howard-Jones, A.R., Sparks, R., Pham, D., Halliday, C., Beardsley, J. & Chen, S.C. (2022). *Pulmonary Cryptococcosis*, 8:1156.

- Khare, V.R., M.K., Grupta, N.Kumar, R.Bhattachar, R.Tilak, K.Kumar, C.Kumar & A. Rana. (2020). Utility of nested polymerase chain reaction for fungus in detecting clinically suspected patients of invasive fungal infections and its clinical correlation and comparison with fungal culture. *Jornal of family medicine and primary care*, 9 (9):4992-4997.
- Kwizera, R., Kiiza, T. K., Akampurira, A., Kimuda, S., Mugabi, T., & Meya, D. B. (2024). Evolution of Laboratory Diagnostics for Cryptococcosis and Missing Links to Optimize Diagnosis and Outcomes in Resource-Constrained Settings. *Open Forum Infectious Diseases*, 11(9), ofae487.
- Kwon-Chung, K., Fraser, J., Doering, T., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y.S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4 (7):a019760.
- Langa, J., Sidat, M., Sacarlar, J. & Moon, T. (2025). Re-introduction of india ink testing as a low-cost laboratory diagnostic for cryptococcosis among HIV infected patients in Southern Mozambique: an implementation research protocol. *Plos one*, 20 (5):e0324792.
- Link, A., Okwir, M., Nabongo, B., Meya, D., Iribarren, S., Bohjanen, P. & Kasprzyk, D (2022). Delays in Cryptococcal meningitis diagnosis and care: A mixed methods study in rural Uganda. *Ann glob Health*, 88(1):22,1-11.
- Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. Infectious disease clinics of North America. *Infect Dis Clin North Am*, 30(1), 179–206.
- Mchale, T., Boulware, D., Kasibante, J., Scebambulidde, K., Skipper, C. & Abassi, M. (2023). Diagnosis and management of cryptococcal meningitis in HIV infected adults. *Clinical Microbiology reviews*, 36:4.
- McTaggart, L., Richardson, S., Seah, C., Hoang, L., Fothergill, A. & Zhang, S. (2011). Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C.gatii* by use of rapid Biochemical tests, diffeencial meda, and DNA sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 49(7):2522
- Moreira, S.M., Menezes, R.P. & Pedrosa, R.S. (2025). Criptococose e o diagnóstico laboratorial: revisão da literatura. *Brazillian Journal of Health Review*,8(1).
- Mohamed, S., Nyazika, T., Ssebambulidde, K., Lionakis, M., Meya, D. & Drummond, R. (2022). Fungal CNS infections in Africa: The Neuroimmunology of Cryptococcal meningitis. *Frontiers in Immunolgy*, 13:804674.

- Morjaria, S., Iturralde, D., Clark, B. & Babady, N. (2025). Phasing out India in the case for the crag LFA in modern practice. *Microbiology spectrum*, 14:01531.
- Ogundeji, A. O., Albertyn, J., Pohl, C. H., & Sebolai, O. M. (2016). Method for identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* useful in resource-limited settings. *Journal of Clinical Pathology*, 69(4), 352–357.
- Oliveira de Sousa, N.S., Ribeiro de Almeida, J.D., Frickmann, H., Lacerda, M.V. & Braga de Sousa, J.V. (2023). Searching for new antifungals for the treatment of cryptococcosis. *Journal of the Brazilian Society of tropical Medicine*, 56:e0121.
- Paes, H. C., Frazão, S. de O., Rosa, C. P., Albuquerque, P., Casadevall, A., Felipe, M. S. S., & Nicola, A. M. (2018). Opsonin-free, real-time imaging of *Cryptococcus neoformans* capsule during budding. *Virulence*, 9(1), 1483–1488.
- Park, G.N., Kim, H.R., An, D.J., Chae, H.S. & Chang, K.S. (2017). Development of modified selective media to differentiate *Cryptococcus* species complex and its serotypes using Natural materials. *Biomed Sci letters*, 23(2):64-72.
- Perfect, J.R. & Bicanic, T. (2015). Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. *Fungal genet biol.* 78: 49-54.
- Pfaller, M. A. (2015). Application of Culture-Independent Rapid Diagnostic Tests in the Management of Invasive Candidiasis and Cryptococcosis. *Journal of Fungi*, 1(2), 217–251.
- Pouris, J., Konstantinos, K., Pyrri, I., Papageorgiou, E. & Voyiatzaki, C. (2025). Fungid: Innovative fungi identification method with chromogenic profiling of colony colour patterns. *Pathogens*, 14:242.
- Poplin, V., Smith, C., Caceres, D.H., Herkert, P., Jegede, O., Thompson, G., Baddley, J., Schwartz, I., Kubat, R., Deka, M., Toda, M., Lockhart, S., Chiller, T., Hagen, F. & Bahr, N. (2024). Geographical distribution of the *Cryptococcus gatti* species complex: a systematic review. *Lancet Microbe*, 5(12):100921.
- Rajasingham, R., R.M., Smith, B.J., Park, J.N. Jarvis, N.P. Govender e T.M. Chiller (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet infect Dis*, 17 (8):873-881.

- Rajasingham, R., Wake, R.M., Beyene, T., Katende, A., Letang, E. & Boulware, D.R. (2019). Cryptococcal meningitis diagnostics and screening in the era of point-of-care laboratory testing. *Journal of clinical microbiology*, 57 (1), e01238-18.
- Rapeso, M.P., Goosen, W.J., Pohl, C.H. & Sebolai, O.M. (2025). Towards understanding a potential *Cryptococcus neoformans* environmental-host transmission route in agricultural settings. *One Health*, 21: 101284.
- Rossi, S. A., & Zaragoza, O. (2017). Infections by *Cryptococcus* species. *Em Reference Module in Life Sciences*, DOI:10.1016/B978-0-12-809633-8.12057-6.
- Ruschel, M.A. & Thapa, B. (2023). Cryptococcal Meningitis. *Stat Pearls*, 4:30252242.
- Sacarlal, J. e D.W., Dennings (2018). Estimated Burden of serious fungal infections in Mozambique. *Journal of fungi*, 4(3):75.
- Saini, A. G., Patil, S., Agrawal, T., Basha, A., Garg, R., Rudramurthy, S. M., Vaidya, P., Saxena, A., & Singhi, P. (2018). Systemic cryptococcosis in an immune-competent child. *Journal of Infection and Public Health*, 11(3), 436–438.
- Shreffler, J. & Huecker, M. (2023). Diagnostic testing accuracy: Sensitivity, Specificity, Predictive values and likelihood ratios. *Stat Pearls*, 4:32491423.
- Silveira, M. B., Moura, A. M., Sousa, I. C., Rezende, H.H. (2018). Diagnóstico laboratorial de Criptococose em indivíduos imunodeprimidos. *Unifan*, 4(1): 24479330.
- Vidal, J. & Boulware, D. (2015). Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev. Inst Med. Trop*, 19:38-45.
- Wembabazi, A., Nassozi, D., Akot, E., Ochola, T., Kweka, P., Katamu, N., Meya, D. & Achan, B. (2022). Prevalence of *Cryptococcus gattii* in Ugandan HIV-infected patients presenting with cryptococcal meningitis. *Plos one*, 17(7): e0270597.
- Zhao, Y. e X. Lin. (2021). *Cryptococcus neoformans*: sex, morphogenesis and virulence. *Infect genet evol*, 80:104731.
- Zhao, Y., Ye, L., Zhao, F., Zhang, L., Lu, Z., Chu, T., Wang, S., Liu, Z., Sun, Y., Chen, M., Liao, G., Ding, C., Xu, Y., Liao, W., & Wang, L. (2023). *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infectious Diseases of Poverty*, 12:20.

Anexos 1



Faculdade de Medicina
Departamento de Microbiologia e
Parasitologia

Laboratório de Microbiologia
Procedimento Operacional Padrão

Código do POP	LCR_LAB_002_v1.0_PT		
Título	Processamento de amostras de Líquido Cefalorraquidiano para detecção de <i>Cryptococcus</i> sp.		
Páginas	3		
Língua da versão original	PT		
Elaborado por: Leticia Mate Matola	Revisto por:	Aprovado por:	Data da aplicação:
Data & assinatura:	Data & assinatura:	Data & assinatura:	Data da próxima revisão:

1. INTRODUÇÃO

Processamento de amostra de Líquido cefalorraquidiano (LCR) é um procedimento que visa a verificação de leveduras capsuladas sugestivas de *Cryptococcus* sp. no contexto de suspeita de infecção fúngica invasiva.

2. OBJECTIVO

Descrever o processamento e análise laboratorial de Líquido cefalorraquidiano para verificação de leveduras capsuladas sugestivas de *Cryptococcus* sp.

DEFINIÇÕES E SIGLAS

- LCR: Líquido cefalorraquidiano

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se à Unidade de Micologia no LAB/FM/UEM.

4. RESPONSABILIDADES

É da responsabilidade de todos os técnicos envolvidos no estudo de LCR com responsabilidade laboratorial de processamento de amostras.

5. PROCEDIMENTOS**5.1. Recepção da amostra de LCR**

As amostras de LCR para este procedimento são recebidas no laboratório em tubos de falcon, transportado em caixa a temperatura ambiente. A amostra de LCR deve se fazer acompanhar de uma requisição com a identificação do paciente ou com o código do participante do estudo. O volume aceitável é de pelo menos 5ml. O processamento desta amostra deve ser efectuado obedecendo os padrões de segurança estabelecidos. Se a amostra não for processada, ela deve ser conservada na geleira a temperatura entre 2°C e 8°C por um período não superior a 72h.

5.2. Material necessário

- Pipetas pasteur esterilizada
- Luvas de látex
- Centrífuga
- Vórtex
- Bico de bunsen
- Suporte para tubo de falcon
- Microscópio óptico
- Tinta de china (tinta naquim)
- Lâminas e lamelas
- Tubos de ensaio
- Ágar sabouraud dextrose
- Ágar canavanina glicina azul de Bromotimol
- Estufa
- Microtubo de 1,8 ml

5.3. Codificação

Ao dar entrada no laboratório a amostra deve ser atribuída um código de identificação no formato XXX/ano.

- XXX é o código do participante na sequência da entrada.

5.4. Processamento do LCR

1. Marque o tubo de falcon com o código da amostra;
2. Centrifugue a amostra de LCR a 1500-3100 rpm por 10 minutos;

3. Aliquota o sobrenadante para um tubo de falcon previamente marcado e use 100 μ l para a sementeira em ágar sabourad dextrose;
4. Retire uma gota do sedimento para a lâmina e adicione uma gota de tinta de china;
5. Coloque a lamela sobre a lâmina e observe no microscópio óptico com a objectiva de 40x;
6. Conservar o sobrenadante restante da amostra no microcubo na temperatura de 2° a 8°C para testes subsequentes caso necessário;
7. No caso de resultado positivo em ágar sabourad dextrose, inocule e subcultive em ágar canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) para diferenciação de espécies de *Cryptococcus* (colónias na cor azul são sugestivas de *Cryptococcus gattii* e colónias amareladas sugestivas de *Cryptococcus neoformans*).

6. REFERÊNCIAS

N/A

7. ANEXOS

N/A

8. EMENDAS

Data	Revisão actual	Modificações

Anexo 2



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
TR000002657

Exmo. Senhor
Dr. José Langa
Faculdade de Medicina

Ref:475/CNBS/25

Data 13 de Agosto de 2025

Assunto: Renovação da aprovação do protocolo de estudo intitulado: *"Vigilância das infecções fúngicas cutâneas, invasivas e oportunistas no Hospital Central de Maputo"*

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS), analisou o relatório de progresso do estudo intitulado: *"Vigilância das infecções fúngicas cutâneas, invasivas e oportunistas no Hospital Central de Maputo"*, e, sobre o mesmo, chegou à seguinte conclusão:

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a continuação do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação ao estudo, salientando que:

- A presente aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 13 de Agosto de 2026. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- Qualquer alteração a ser introduzida no Protocolo, incluindo os seus anexos deve ser submetida ao CNBS para aprovação.

Sem mais de momento queiram aceitar as nossas cordiais saudações.

O Vice Presidente do CNBS



Doutor Gertrúdo Augusto



Endereço:
Ministério da Saúde - 2º andar do
Av. Eduardo Mondlane, Nº 1008 / Salvador Allende
Maputo - Moçambique

C. Postal: 264
Telefone: +258 82 406 6360
E-mail: cnbsmozambique@gmail.com
NÚM: 700 253 481