



Faculdade de Ciências  
Departamento de Ciências Biológicas  
Licenciatura em Biologia e Saúde  
**Culminação de Estudos II**  
**Trabalho de Investigação**



**Etiologia da Candidíase Vulvovaginal e Perfil de Susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de secreção vaginal de mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maputo**

**Autora:** Lucineid Rafaela da Laura Laisse



Faculdade de Ciências  
Departamento de Ciências Biológicas  
Licenciatura em Biologia e Saúde  
**Culminação de Estudos II**  
**Trabalho de investigação**



**Etiologia da Candidíase Vulvovaginal e Perfil de Susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de secreção vaginal de mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maputo**

**Autora:** Lucineid Rafaela da Laura Laisse

**Supervisores**

Prof. Doutor José Sumbana

dr. Samuel Simbine

MSc. Alice Manjate

Maputo, Abril de 2024

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradecer ao meu bom Jeová Deus pela saúde, determinação e força de vontade para que eu conseguisse chegar a esta fase do meu percurso académico.

A minha família, especialmente os meus pais, Cornélio Laisse e Laurinda Laisse vai o meu mais profundo agradecimento pelo amor e apoio incondicional que me foi dado a vida inteira, por me terem motivado a seguir os meus sonhos e acima de tudo por terem estado sempre do meu lado, aos meus queridos e amados irmãos, Bafila Laisse e Laisse Júnior por nunca terem parado de acreditar em mim e na realização deste sonho.

Aos meus estimados supervisores, Professor Doutor José João Sumbana, a MSc Alice Manjate e ao dr Samuel Simbine, pela incansável atenção e orientação durante a realização deste trabalho, pela paciência e acima de tudo por terem tornado esta conquista real.

A equipe de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas Joaquim Chaves, especialmente ao Dr. Tiago Grosso, a dra. Estela Gwessane e ao Técnico Victor Manhiça, por me terem recebido, apresentado e ensinado.

Ao técnico Valdo Jaime Muianga pelos ensinamentos, conselhos e pela motivação.

Endereço igualmente os meus agradecimentos a equipe da faculdade de medicina da Universidade Eduardo Mondlane, especialmente a equipe do Laboratório de Microbiologia.

Ao meu querido parceiro e noivo, Virgílio Berta José pelo incansável apoio nas horas difíceis e por me ter feito acreditar que eu era perfeitamente capaz de me tornar uma bióloga.

Aos colegas que durante o percurso académico tornaram-se amigos, Isabel Tonela, Géssica Bulo, Tamires de Jesus, Abdul Razak e muitos outros.

Vai o meu muito obrigada a todos os que directa ou indirectamente contribuíram para que este sonho fosse realizado.

Muito obrigada!

### **Declaração de honra**

Eu, Lucineid Rafaela da Laura Laisse declaro em minha honra que todos os dados apresentados neste trabalho intitulado " **Etiologia da Candidíase Vulvovaginal e Perfil de Susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de secreção vaginal de mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maputo**" são verídicos, tendo sido colhidos para a culminação do curso de Licenciatura em Biologia e Saúde na Universidade Eduardo Mondlane e nunca tendo sido apresentado para outros fins.

Lucineid Laisse

(Lucineid Rafaela da Laura Laisse)

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais Cornélio Laisse e Laurinda Laisse, aos meus irmãos Bafila Laisse e Laisse Júnior, pelo companheirismo, motivação, apoio e por terem sido a minha fonte de inspiração durante toda a jornada acadêmica.

## Resumo

**Introdução:** A candidíase vulvovaginal (CVV) é um problema global constituindo a segunda causa mais comum de vaginite em mulheres (depois da vaginose bacteriana). Esta infecção é maioritariamente causada por estirpes do género *Candida*, sendo que três quartos de mulheres em idade reprodutiva apresentam pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal. A prevalência desta infecção e o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de espécies *Candida* tem demonstrado uma variação ao longo do tempo e espaço. Os estudos de vigilância de candidíase vulvovaginal são escassos em Moçambique, principalmente aqueles estudos que incluem dados provenientes de laboratórios privados, dificultando o controlo e tratamento das infecções.

**Objectivo:** Determinar a frequência e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *C. albicans* e *C. tropicalis* isolados de mulheres com idade reprodutiva no Laboratório de análises clínicas Joaquim Chaves, no período de Fevereiro a Abril de 2023.

**Metodologia:** O presente estudo foi de carácter descritivo transversal, com abordagem retrospectiva em que foram incluídas 369 amostras de exsudados vaginais colhidos de mulheres com suspeita de candidíase vulvovaginal no Laboratório Joaquim Chaves-Moçambique. As amostras foram cultivadas em meios Agar Sabouraud Gentamicina e Clorafenicol para o isolamento e identificação preliminar de espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A confirmação da identificação das espécies foi feita usando meio cromogénico chromID *Candida* e posteriormente os isolados foram inoculados no *Skim milk* para a conservação na geleira a  $-80^{\circ}\text{C}$  constituindo o biobanco do Laboratório de Microbiologia- UEM.

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos foram realizados no meio de cultura Agar sabouraud dextrose, incluindo três antifúngicos, fluconazol (25 $\mu\text{g}$ ), clotrimazol (50mcg) e nistatina (100IU), através do método de disco-difusão e os resultados interpretados seguindo as orientações do CLSI Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais.

**Resultados:** Do total de 369 amostras de exsudados vaginais, foram incluídos neste estudo apenas 150 amostras (100%), tendo sido 138 (92%) positivas para *C. albicans* e (8%) 12 positivas para *C. tropicalis*. O perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *C. albicans* mostrou uma crescente frequência de resistência para o antifúngico fluconazol 38/138 (28%) e de sensibilidade 83/138 (60%), 53/90 (58,8%) sensibilidade para clotrimazol. Os isolados de *C. tropicalis* mostram altas taxas de resistência a nistatina

12/12 (100%) e fluconazol 8/12 (67%). O estudo mostra que todos os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram resistentes a nistatina. Os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* demonstraram maior sensibilidade a clotrimazol, seguido por fluconazol, o que sugere a sua eficácia no tratamento destas infecções.

**Conclusão:** Observamos uma elevada prevalência de candidíase vulvovaginal em mulheres com idades compreendidas entre 25-29 anos, *Candida albicans* foi o agente da candidíase vulvovaginal mais prevalente neste estudo;

*C. albicans* apresentou altas taxas de sensibilidade ao clotrimazol, seguido de fluconazol. Entretanto, *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram taxas de resistência a nistatina de 100%.

**Palavras-chave:** Candidíase vulvovaginal, perfil de susceptibilidade, *C. albicans*, *C. tropicalis*, Laboratório de análises clínicas Joaquim Chaves, Cidade de Maputo.

## Índice

Agradecimentos .....	2
Declaração de honra .....	3
Dedicatória.....	4
Resumo .....	5
Palavras-chave .....	6
Lista de abreviaturas .....	10
1. Introdução.....	1
1.1 Problema.....	2
1.2 Justificativa.....	3
2. Objectivos.....	5
2.1 Geral .....	5
2.2. Específicos.....	5
3. Hipóteses .....	6
4. Enquadramento teórico.....	7
4.1. Características microbiológicas dos fungos do género <i>Candida</i> .....	7
4.2. Factores de risco da candidíase vulvovaginal.....	7
4.3. Sintomas da candidíase vulvovaginal.....	8
4.4. Diagnóstico da candidíase vulvovaginal .....	9
4.5. Tratamento da candidíase vulvovaginal .....	9
4.6. Mecanismos de acção dos antifúngicos.....	12
4.7. Métodos de avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de <i>Candida</i> spp .....	13
5. Metodologia.....	15
5.1. Fluxograma.....	15
5.2. Identificação de isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	16
5.3. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	17
5.4. Leitura e interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade aos antifúngicos	17

5.5. Área de estudo .....	18
5.6. Materiais e Equipamentos .....	20
5.7. População e Amostragem .....	20
5.8. Critérios de inclusão .....	20
5.9. Critérios de exclusão .....	20
5.10. Estimativa do tamanho amostral.....	21
5.11. Variáveis.....	21
5.12. Análise de dados.....	21
6. Considerações éticas.....	22
7. Resultados.....	23
7.1. Perfil demográfico das pacientes com candidíase vulvovaginal .....	23
7.1.1. Características sociodemográficas das pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal .....	23
7.1.2. Frequência dos isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> de acordo com a proveniência das pacientes com candidíase vulvovaginal.....	23
7.2. Frequência de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> por faixas etárias das pacientes com candidíase .....	25
7.3. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	25
7.3.1. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de <i>C. albicans</i> .....	26
7.3.2. Perfil de susceptibilidade de <i>C. tropicalis</i> .....	27
8. Discussão.....	28
8.1. Frequência de Candidíase Vulvovaginal em mulheres com idade reprodutiva.....	28
9. Limitações .....	32
10. Conclusões.....	33
11. Recomendações .....	34
12. Referências bibliográficas .....	35
13. ANEXOS .....	41
Apêndice 1: Ficha de recolha de dados .....	42

Apêndice 2: Ficha para resultados do perfil de susceptibilidade.....	43
Apêndice 3: Carta do comité de bioética.....	44

## Lista de abreviaturas

CVV –	Candidíase Vulvovaginal
<i>C. albicans</i> –	<i>Candida albicans</i>
<i>C. tropicalis</i> –	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. glabrata</i> –	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i> –	<i>Candida krusei</i>
CLT –	Clotrimazol
DD –	Disco de difusão
DIU –	Dispositivo intra-uterino
DST –	Doença sexualmente transmissível
Facmed –	Faculdade de Medicina
Flu/FCZ –	Fluconazol
HCM –	Hospital Central de Maputo
J.C –	Joaquim Chaves
LAC –	Laboratório de Análises Clínicas
SDA –	Sabouraud Dextrose Agar
SGC –	Sabouraud Gentamicina Clorafenicol
SPSS –	<i>Statistical Package for Social Studies</i>
TSA –	Teste de Sensibilidade aos antifúngicos

## 1. Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um problema global constituindo a segunda causa mais comum de vaginite em mulheres (depois da vaginose bacteriana) (Philips *et al.*, 2022). É uma infecção fúngica que acomete a vagina e a vulva (Dovnik *et al.*, 2015), principalmente causada por *Candida albicans* (Yano *et al.*, 2018). Cerca de três quartos das mulheres durante a idade reprodutiva apresentam pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal, embora a incidência exata de CVV seja difícil de determinar porque muitas pacientes optam pela auto-medicação (Dovnik *et al.*, 2015).

Em Moçambique, concretamente na Cidade de Maputo foi realizado um estudo no Hospital de Mavalane, envolvendo mulheres sexualmente activas com suspeita de CVV reportou-se que a *Calbicans* foi a espécie mais prevalente representando 80% dos casos, seguido por *Candida krusei* com 20% (Jentivo *et al.*, 2017). Ainda em Moçambique, no Hospital Central de Maputo com a participação de 201 pacientes diagnosticadas com CVV demonstrou-se a prevalência *C. albicans* em 73,1% e de outras espécies identificadas como *Candida não albicans* em 26,9% (Sinussene *et al.*, 2022).

Outro estudo conduzido no Hospital Distrital de Thikan no Quênia demonstrou uma crescente prevalência de 42,7% de CVV em mulheres com idade reprodutiva (Souza, 2017).

Simultaneamente na África do Sul, constatou-se que a espécie mais isolada em mulheres atendidas em um Hospital terciário com suspeita de CVV foi *C. albicans* com 45% (Mnge, 2017).

O género *Candida* spp. é constituído por fungos leveduriformes de aproximadamente 2 a 6µm, possuem reprodução por brotamento, e a maior parte das espécies formam uma série de leveduras alongadas entre si, que tem constrições nos sítios septais denominadas pseudo-hifas e formam também hifas nos tecidos (Peixoto *et al.*, 2014).

As espécies pertencentes a este género fazem parte de uma grande variedade de síndromes clínicas, incluindo a presença de corrimento esbranquiçado, prurido, ardor, disúria, edema e eritema vulvovaginal (Soares *et al.*, 2018).

O género *Candida* spp. é constituído por cerca de 200 espécies que pertencem à microbiota normal do ser humano sendo que cerca de 10% destas 200 espécies são associadas a infecções (Peixoto *et al.*, 2014). As espécies do género *Candida*

colonizam, principalmente as superfícies mucosas do trato gastrointestinal e urogenital, sem o aparecimento de nenhum sintoma da doença (Soares *et al.*, 2018), porém estes fungos tornam-se infecciosos quando há alteração da microbiota ou quando o sistema imunológico do indivíduo encontra-se comprometido (Peixoto *et al.*, 2014).

O diagnóstico da candidíase vulvovaginal deve ser baseado no exame micológico directo e cultura (Soares *et al.*, 2018). A sintomatologia tende a agravar-se durante a micção (principalmente no introito vaginal), relação sexual, exploração ginecológica ou até mesmo quando a paciente se deita (Manólea *et al.*, 2022).

Eventualmente, podem ser observados pequenos pontos branco-amarelados nas paredes vaginais e no colo uterino (Soares *et al.*, 2018).

O mecanismo mais comum de infecção por *Candida* é o deslocamento de seu nicho normal para a corrente sanguínea ou outros tecidos (Peixoto *et al.*, 2014). A prevalência de *C. albicans* em mulheres com episódios de candidíase vaginal está entre 70 e 90% a nível mundial, e cerca de 5% dessas pacientes apresentam episódios de recorrência (Yano *et al.*, 2018).

## **1.1 Problema**

As infecções por *Candida* são algumas das razões mais comuns pelas quais as mulheres procuram tratamento médico. A candidíase vulvovaginal é a infecção da vulva e vagina, que acomete cerca de um terço das mulheres em idade reprodutiva. Esta infecção afecta a saúde física e mental de milhões de mulheres anualmente e interfere nas relações sexuais assim como nas relações afectivas, constituindo um problema de saúde pública em todo o mundo (Soares *et al.*, 2018).

A nível mundial esta infecção apresenta uma elevada incidência e prevalência devido a variedade de factores predisponentes, a evolução e alteração constante da epidemiologia, vem aumentando o desafio das técnicas de diagnóstico, terapia e estratégias profilácticas (Tozzo & Grazziotin, 2012).

Em Moçambique, a CVV é a segunda causa de todos os casos de vulvovaginite em mulheres com idade reprodutiva e cerca de 8% das mulheres sofrem de vulvovaginite por *Candida* recorrente (CVVR). Na Cidade de Maputo, um estudo realizado sobre frequência e perfil de susceptibilidade de *Candida* spp incluindo mulheres com idade

entre 15 a 39 anos, concretamente no Centro de Saúde 1º Maio, num período de 1 ano e 4 meses (Maio de 2016 á Setembro de 2017), e usando uma técnica de biologia molecular para o diagnóstico reportou um total de 93 espécies de *Candida*, dos quais 73,1% (68/93) foram positivas para *C. albicans*, 7,5% (7/93) de *C. glabrata* e 1,1% (1/93) de *C. tropicalis*, (Comé *et al.*, 2018).

Alguns estudos realizados em Moçambique têm demonstrado o aumento da prevalência de estirpes de *C. albicans* resistente aos azóis, e sensibilidade reduzida ao fluconazol como *C. glabrata* e *C. krusei* (Comé *et al.*, 2018).

Actualmente têm se observado um aumento significativo de casos de candidíase, principalmente na África, porem estudos do perfil de susceptibilidade *Candida* spp. aos antifúngicos de ainda são escassos dificultando a escolha terapêutica adequada.

Nessa perspectiva surge a seguinte questão: Qual é a prevalência de candidíase vulvovaginal e o perfil de susceptibilidade de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* em mulheres em idade reprodutiva na cidade de Maputo, diagnosticadas no Laboratório de Análises Clínicas Joaquim Chaves de Fevereiro a Abril de 2023?

## **1.2 Justificativa**

Cerca de 10-20% das mulheres em idade reprodutiva e 30-40% das mulheres grávidas podem apresentar CVV (Bates, 2003). Aproximadamente 80-90% dos casos de CVV são causadas pela *C.albicans* (Álvares, *et al.*, 2007).

Outras espécies de *Candida* não albicans, como *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, são raramente associadas a CVV, porem as infecções por estes microrganismos tendem a ser resistentes aos antifúngicos (Ferracin & Oliveira, 2005).

A prevalência de CVV e o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de espécies *Candida* tem demonstrado variações em função do tempo e da população estudada. O estudo realizado em Maputo (Hospital primeiro de Maio), demonstrou sensibilidade reduzida ao fluconazol (Comé *et al.*, 2018) e um outro estudo realizado no centro de Saúde 1º de Junho, Cidade de Maputo revelou uma resistência de 29% ao fluconazol de estirpes de *Candida*, num total de 109 amostras testadas (Jentivo *et al.*, 2017). Estes resultados, mostrando a necessidade de realização de vigilâncias contínuas para o

monitoramento dos padrões resistência e definir orientações do tratamento e controle das infecções.

## **2. Objectivos**

### **2.1 Geral**

Conhecer a prevalência e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp. em mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maputo.

### **2.2. Específicos**

- Descrever as características sociodemográficas das mulheres atendidas no laboratório de análises clínicas Joaquim Chaves;
- Identificar as espécies de *Candida* mais prevalentes da candidíase vulvovaginal;
- Determinar a prevalência da candidíase vulvovaginal da população em estudo;
- Comparar a distribuição de diferentes espécies de *Candida* por faixas etárias;
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos agentes etiológicos da candidíase vulvovaginal aos antifúngicos;

### **3. Hipóteses**

**Hipótese Nula 1:** A prevalência relatada de casos de candidíase vulvovaginal não se encontra entre 34% a 43,5% em mulheres com idade reprodutiva

**Hipótese alternativa 1:** A prevalência relatada de casos de candidíase vulvovaginal encontra-se entre 34% a 43,5% em mulheres com idade reprodutiva

**Hipótese Nula 2:.** Os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* não constituem os principais agentes etiológicos de candidíase vulvovaginal e não são sensíveis aos antifúngicos comumente usados para o tratamento em mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maputo.

**Hipótese alternativa 2:.** Os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* constituem os principais agentes etiológicos de candidíase vulvovaginal e são sensíveis aos antifúngicos comumente usados para o tratamento em mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maputo.

## **4. Enquadramento teórico**

### **4.1. Características microbiológicas dos fungos do género *Candida***

As espécies do género *Candida* são caracterizados por serem leveduriformes, vivem como comensais na microbiota humana, podendo ser encontrados na pele, na cavidade bucal, orofaringe, secreções brônquicas, vagina (tracto urinário) e trato gastrointestinal (Barbedo & Sgarbi, 2018).

Estas leveduras podem se apresentar na forma de micélio, tendo uma característica de pseudo-micélio em determinados ambientes nutricionais (Serracarbassa, 2003). Adicionalmente, são caracterizados como dimórficos, saprofíticos, com virulência limitada, em geral encontram-se presentes nos tecidos como células individuais, a sua reprodução é predominante e ocorre de maneira assexuada por brotamento (Lacaz, 2002).

As espécies do género *Candida* são oportunistas e podem ser encontrados em dois estados diferentes os esporos (blastosporos) constituem o fenótipo para extensão, disseminação e transmissão. Formam uma componente resistente do fungo e podem estar relacionados com a colonização ou multiplicação assintomática. Contudo, os pseudo-micélios são as formas germinativas, este fenótipo tem capacidade invasora tissular e ocasiona a sintomatologia própria da infecção (Ferrer, 2000).

### **4.2. Factores de risco da candidíase vulvovaginal**

Os factores predisponentes à CVV incluem:

- O uso de contraceptivos orais com alto teor de estrogênio;
- Terapia de reposição hormonal;
- O uso de antibióticos de largo espectro ou por períodos prolongados de tempo;
- Diabetes mellitus não controlado; (Yano *et al.*,2018);
- Disfunção dos neutrófilos, queda da imunidade mediada por células;
- Exposição directa aos fungos;
- Extremos de idade avançada (Barbedo & Sgarbi, 2010);
- Gravidez (Manólea *et al.*,2022);
- Obesidade;

- Imunossupressão por HIV ou por outra patologia imunossupressora;
- Hábitos higiénicos e vestuários inadequados que diminuem a ventilação e contribuem no aumento da humidade e o calor local (Rodrigues *et al.*, 2013);
- Actividade sexual (traumas da mucosa);
- Diferentes tipos de protecção menstrual (Barbedo & Sgarbi, 2010);
- Dispositivos contraceptivos (DIU) (Mendes, 2020);
- O contacto com substâncias irritantes ou que possam causar alergias como perfumes e desodorantes, fazem parte também dos factores de risco (Barbedo & Sgarbi, 2010)

Os níveis elevados de estrogénio durante a gravidez, podem contribuir para o aumento do glicogénio vaginal, constituindo uma importante fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo. O uso de contraceptivos orais possui a mesma acção visto que alguns destes apresentam elevada taxa de estrogénio (Rodrigues *et al.*, 2013).

#### **4.3. Sintomas da candidíase vulvovaginal**

A sintomatologia da CVV é bastante variada, partindo de casos completamente assintomáticos até os casos em que as pacientes podem relatar os seguintes sinais e sintomas: secreção vaginal modificada (Manólea *et al.*,2022), corrimento branco, grumoso, inodoro e com aspecto caseoso semelhante a nata de leite, irritação, ardência e eritema (Soares *et al.*,2019), desconforto vaginal (Barbedo & Sgarbi, 2010). Esta sintomatologia tende a piorar durante a semana anterior ao ciclo menstrual. Muitas mulheres são portadoras assintomáticas, quando o fungo se apresenta em pequenas quantidades e são necessárias alterações no ambiente vaginal para que o fungo induza seus efeitos e se possa desenvolver a candidíase (Souza, 2013).

O colo do útero apresenta-se coberto por placas brancas ou branco-acinzentadas, aderidas á mucosa, podem ser observadas fissuras, as lesões podem estender-se por períneo, região perianal e inguinal, com relatos de disúria externa e dispareunia, este corrimento pode ainda apresentar uma coloração esverdeada (Álvares *et al.*, 2007).

#### **4.4. Diagnóstico da candidíase vulvovaginal**

A identificação das leveduras presentes nas secreções vaginais é feita através do exame directo a fresco, coloração de Gram e cultura, que são analisados microscopicamente (Soares *et al.*, 2018).

No exame directo a fresco, coloração Gram e cultura, o material é retirado das paredes laterais da vagina, com espátula de Ayre ou swab, que é então depositado em lâmina e misturado com uma ou duas gotas de solução fisiológica e coberta com lamela e observada ao microscópio (Manólea *et al.*,2022).

É recomendado que a inoculação da amostra vaginal com suspeita de *Candida* spp seja realizada no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose. Após a inoculação, as placas contendo os meios de cultura são incubados a 35 e 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas (Rodrigues *et al.*,2020).

#### **Identificação pelo método de tubo germinativo**

Alternativamente pode ser feita uma prova fisiológica para identificação de *C. albicans* denominada prova do tubo germinativo. A prova do tubo germinativo é realizada a partir de uma colónia isolada de *Candida* que é depositada em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de soro humano ou soro estéril de bovino, cavalo ou coelho. A suspensão do soro é incubada a 37°C por um período máximo de 3 horas, de seguida faz-se a deposição de uma gota da suspensão sobre a lâmina microscópica, cobre-se com a lamela e observa-se ao microscópio óptico. A observação de um filamento a partir de uma célula leveduriforme que brota do blastoconídio, sem formar constrição com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva de *C. albicans* (Anvisa, 2013).

#### **4.5. Tratamento da candidíase vulvovaginal**

A escolha terapêutica depende do critério médico, quadro clínico e característica de cada paciente (Soares *et al.*, 2018), sendo também baseada no antifungigrama relacionado a esse exame (Manólea *et al.*,2022).

Dentre os antifúngicos mais utilizados, destacam-se a classe dos azóis, que inclui os imidazóis (butoconazol, clotrimazol, miconazol e ketoconazol) e Triazóis (fluconazol e terconazol) e a classe dos polienos (anfotericina B e nistatina), são antifúngicos fungicidas (Jentivo *et al.*, 2017).

As principais linhas de tratamento usadas para o tratamento da candidíase vulvovaginal em Moçambique são apresentadas na Tabela abaixo (MISAU, 2017).

Tabela 1: Linhas de tratamento usadas para candidíase vulvovaginal

<b>Nome do antifúngico</b>	<b>Linhas de tratamentos</b>	<b>Forma farmacológica</b>
<b>Clotrimazol</b>	1ª linha	Comprimido vaginal Creme vaginal
<b>Fluconazol</b>	3ª linha	Injectável Cápsula
<b>Nistatina</b>	1ª linha	Líquido oral Creme vaginal
<b>Flucitosina</b>	3ª linha	Injectável

#### **4.6. Mecanismos de resistência aos antifúngicos de *C. albicans* e *C. tropicalis***

A resistência aos antifúngicos é um problema actual no tratamento de infecções fúngicas em seres humanos, após a identificação do patógeno causador da infecção, a falha na terapia pode ocorrer por diferentes factores como resistência intrínseca *in vitro* ou resistência clínica que ocorre quando o fungo é aparentemente susceptível ao antifúngico *in vitro*, porém não *in vivo* devido à impossibilidade do antifúngico agir no seu alvo, pode ser resultado de terapia em pacientes imunodeprimidos, ou neutropénicos (Vieira & Santos, 2017)

A resistência microbiológica por sua vez, envolve mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida, em que a intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microorganismo e confere resistência inata antes da exposição deste antifúngico (Vieira & Santos, 2017)

Factores de transcrição mutantes contribuem com a formação de resistência microbiológica aos antifúngicos. A resistência que ocorre em *C. albicans* inclui uma variação que tem como fundo a descendência clonal, a falta de recombinação sexual leva à aquisição de resistência a drogas através da plasticidade do genoma e aumento de taxas de mutação e recombinação mitóticas.

No entanto existem diferentes mecanismos de resistência de *Candida* spp aos antifúngicos:

#### Fluconazol:

- Mutação no gene ERG11;
- Superexpressão do gene ERG11: resulta na produção excessiva da enzima-alvo, criando a necessidade por maiores concentrações de droga dentro da célula para inativar todas as moléculas da enzima-alvo. A regulação positiva da codificação dos genes às bombas de efluxo multidroga resulta no efluxo activo dos agentes antifúngicos azóis para fora da célula (Murray et al., 2006)
- Mutação no gene ERG3;
- Acção do gene RTA2 na regulação positiva da calcineurina;
- Acção da enzima calcinerina na sinalização de eventos em resposta acção do antifúngico;
- Acção de enzimas antioxidantes fúngicas ao estresse oxidativo induzido por fluconazol (Vieira & Santos, 2017).

Clotrimazol: a resistência de *Candida* spp se dá por dois principais mecanismos:

- Modificações na enzima alvo citocromo P-450 lanosterol 14 $\alpha$ - demetilase, com a sua super expressão ou mutação no gene ERG11. A mutação neste gene altera os aminoácidos da proteína citocromo P-450 14 $\alpha$ -demetilase que resulta em uma menor afinidade aos antifúngicos azólicos;
- O segundo se dá por mecanismos de bombas de efluxo, onde por meio de transporte de membrana com gastos energéticos, o fungo reduz a quantidade de antifúngico em seu redor (Nasser, 2012)

#### Nistatina:

- Diminuição da quantidade de ergosterol por carência da enzima 7,8- $\Delta$  esterol isomerase secundária e mutações em *pol1*, *pol2*, *pol3* e *pol*.
- Substituição de ergosterol por esteróis de menor afinidade por diferentes polienos fecosterol ou lanosterol secundários a mutações em ERG2, ERG3 e ERG6.
- Variação do conteúdo 1,3- $\beta$  glucano na parede celular (Bilbao, 2018)

#### 4.6. Mecanismos de acção dos antifúngicos

Os azóis e Triazóis são antifúngicos fungistáticos sintéticos, que apresentam em sua estrutura química um ou mais anéis de 5 átomos de carbono (anel azóico), unidos por ligação do tipo C-N do resto da molécula (Jentivo *et al.*, 2017) estes atuam inibindo a acção da síntese do ergosterol (produto final da via metabólica dos esteróis fúngicos), ao nível da enzima 14 $\alpha$ -demetilase, associada ao citocromo P450 dos fungos, que participa na conversão de lanosterol em ergosterol presente na célula do fungo, e a (Soares *et al.*, 2018)

Os polienos possuem em sua estrutura molecular um grupo amino ligado a um anel lactona, com uma série de ligações duplas em uma das porções da molécula e de grupos hidroxilo na porção oposta que alteram a permeabilidade da membrana celular fúngica (Soares *et al.*, 2018).

<b>Antifúngicos</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Posologia</b>
Clotrimazol	Creme vaginal 10 mg/g (1%)	Administrado ao deitar, 7 dias consecutivos
	Creme vaginal 20 mg/g (2%)	Administrado durante 3 dias consecutivos
	Comprimido vaginal 100 mg	Aplicar por via vaginal ao deitar, durante 6 dias consecutivos
	Comprimido vaginal 500 mg	Aplicação única de um comprimido por via vaginal ao deitar
	Cápsula vaginal 500 mg	Aplicação única de uma cápsula por via vaginal ao deitar

Fluconazol	Cápsulas 150 mg	Administrado de forma oral CVV simples: 150 mg toma única CVV complicada: 150 mg cada 3 dias - 3 doses, seguidos de 150 mg/1 x semana durante 6 meses
Nistatina	Creme vaginal 100 000-200 000 UI	Administrado por via vaginal, na posição ginecológica durante 14 dias.

#### **4.7. Métodos de avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp**

Com o aumento de infecções fúngicas oportunistas acompanhadas pelo crescente surgimento de estirpes resistentes aos antifúngicos, tornou-se necessário o uso de diferentes métodos que identifiquem estirpes resistentes a determinados antifúngicos, para a avaliação dos perfis de susceptibilidade *in vitro* (Jentivo *et al.*, 2017).

##### **4.7.1. Difusão em disco**

O método disco-difusão foi desenvolvido por Bauer e colaboradores, em 1966 (Navarini, 2007), os discos contendo uma concentração conhecida do agente antimicrobiano é colocado na superfície de uma placa de ágar com inóculo. O agente antimicrobiano começa imediatamente a difundir-se e a estabelecer um gradiente de concentração ao redor do disco de papel de filtro (Rodrigues, 2008). formando um halo de inibição que é medido em milímetros (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015).

A classificação das estirpes é feita da seguinte forma: resistente, intermediário ou sensível (Navarini, 2007)

##### **4.7.2. Método de microdiluição**

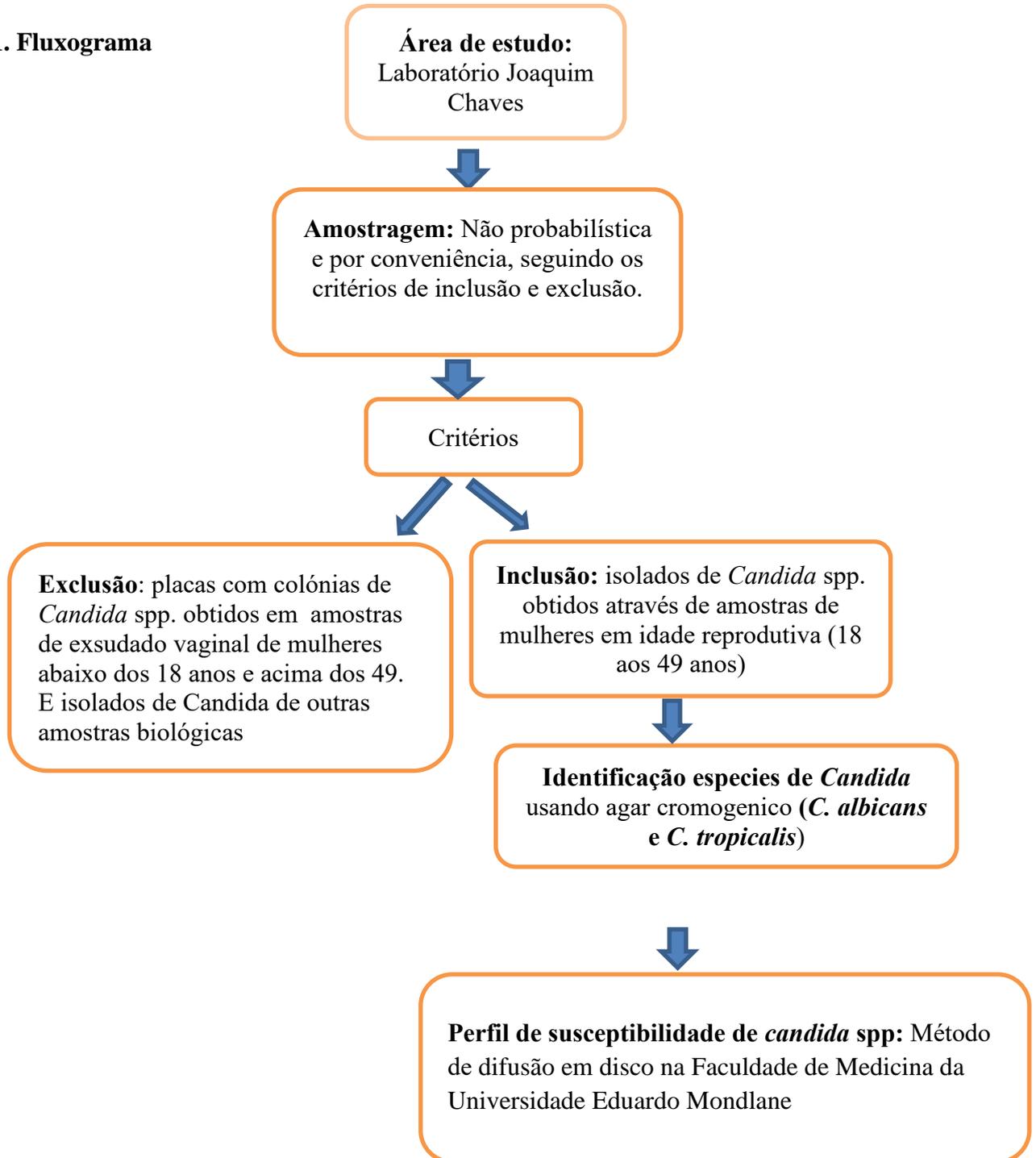
Os testes de diluição em caldo envolvem o contacto do fungo estudado aos agentes antimicrobianos em um caldo de cultura (Navarini, 2007). Cada microrganismo é testado usando uma série de concentrações comumente expressas em microgramas da droga por mililitro de caldo ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Navarini, 2007).

Normalmente, a série de concentrações testadas para cada antifúngico é composta de concentrações de forma que a seguinte seja sempre a metade da testada anteriormente (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µg/ml), e, a menor concentração que inibe completamente o crescimento fúngico visível, que é observado pela turvação do meio utilizado, é registada como a concentração inibitória mínima (CIM) para este antimicrobiano, nesta estirpe testada (Carrillo & Muñoz *et al.*, 2016)

## 5. Metodologia

O presente estudo foi de carácter descritivo transversal, com abordagem retrospectiva, através da análise de isolados de *Candida* spp., inoculados no skim milk e guardados no congelador a -20°C no Laboratório Joaquim Chaves, sector de Microbiologia no período de Fevereiro à Abril de 2023.

### 5.1. Fluxograma

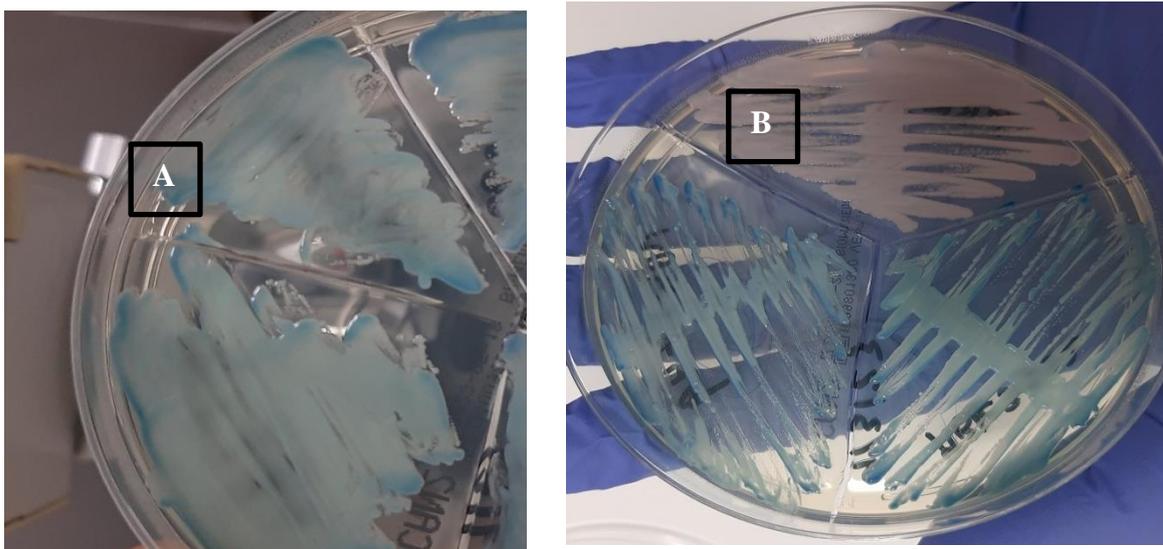


Para a realização deste trabalho foram inclusas 369 amostras de exsudados vaginais processados no Laboratório Joaquim Chaves, com suspeita de CVV.

As amostras foram semeadas no meio de cultura Agar Sabouraud Gentamicina Clorafenicol (para o crescimento e isolamento de leveduras), incubadas na estufa por 24 a 48h a uma temperatura de 37°C.

De seguida foram feitos os exames directos a fresco e a coloração de Gram para a observação microscópica. Posteriormente foi feita a identificação das espécies usando meio cromogénico chromID *Candida*, onde as colónias de *C. albicans* apresentaram-se coradas de azul e as de *C. tropicalis* apresentaram uma coloração rosada. De seguida foram inoculados no Skim milk que foi guardado congelador a -20°C

## 5.2. Identificação de isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*



**Figura 1: Identificação das espécies de *Candida* no meio cromogenico chromID *Candida* (A- *Candida albicans*; B- *Candida tropicalis*)**

### Subcultura de isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*

1° Com uma ansa bacteriológica descartável, retirou-se os isolados conservados no skim milk

2° Fez-se as subculturas em Agar Sabouraud Dextrose;

3° De seguida estas placas foram incubadas na estufa a 36°C por 24 a 48h;

### 5.3. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*

1° Com recurso a uma ansa, retirou-se 2 ou 3 colónias de leveduras anteriormente subcultivadas e depositou-se em tubo de ensaio contendo 5ml de soro fisiológico a 0,9%;

2° Homogeneizou-se a solução e a turbidez foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland;

3° Usou-se uma zaragatoa seca e estéril para embeber a suspensão e fez-se o inóculo no meio de cultura sabouraud dextrose de forma a preencher toda a placa;

4° Esterilizou-se a pinça e foram fixados os antifúngicos fluconazol 25µg; clotrimazol 50mcg e nistatina 100IU, em cada placa pelo método disco-difusão.

### 5.4. Leitura e interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade aos antifúngicos

Após 48h as placas foram lidas e interpretadas fazendo a medição dos halos de inibição, tendo a seguinte classificação:

**Sensível (S):** Não há crescimento do microorganismo próximo ao disco de antifúngico, apresentando sensibilidade, significando assim que o antifúngico é eficaz.

**Intermediário (I):** Quando o halo de inibição se encontra entre a medida de resistência e de sensibilidade ao antifúngico.

**Resistente (R):** Quando há crescimento do microorganismo próximo ao disco de antifúngico, apresentando resistência significando que o antifúngico não é eficaz para o tratamento desta infecção.

Antifúngicos	Diâmetro do halo de inibição do crescimento fúngico em milímetros (mm)		
	Sensível (S)	Intermédio (I)	Resistente (R)
Fluconazol	>19	14-19	<14
Clotrimazol	≥20	12-19	≤11
Nistatina	≥25	17-24	≤16

Tabela 2: Diâmetros dos halos de inibição, pelo método disco-difusão (Al-mamari *et al.*, 2014).

### **5.5. Área de estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Joaquim Chaves, no sector de Microbiologia, o qual encontra-se localizado em Moçambique, no Distrito de Kampfumo, na Avenida 24 de Julho, nº 382, Polana Cimento, Maputo.

O Laboratório de Análises Clínicas Joaquim Chaves é subdividido em 5 sectores, nomeadamente: Microbiologia, Bioquímica, Imunologia, Endocrinologia e Hematologia. Possui como especialidades médicas, a medicina geral, medicina do trabalho e medicina interna, realizando na maioria análises clínicas voltadas para anatomia patológica, auto-imunidade, biologia molecular, citogénica, análises hormonais, micologia, serologia infecciosa, urinálise, virologia, imunohematologia e possui maioritariamente pacientes ambulatorios (JCS, 2023).



**Figura 2: Mapa da cidade de Maputo**

Fonte: Mapcarta (2023).

## 5.6. Materiais e Equipamentos

Equipamentos	Instrumentos	Reagentes	Material Biológico	Material de escritório
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Congelador;</li><li>➤ Cabine de segurança biológica;</li><li>➤ Estufa;</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Luvas descartáveis;</li><li>➤ Bata branca;</li><li>➤ Bico de Bunsen</li><li>➤ Ansas Bacteriológicas;</li><li>➤ Pinças estéreis;</li><li>➤ Pipetas de Pasteur;</li><li>➤ Parafilme;</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Agar Sabouraud Gentamicina Clorafenicol;</li><li>➤ Ágar cromogénico;</li><li>➤ Skim milk;</li><li>➤ Soro fisiológico;</li><li>➤ Fluconazol;</li><li>➤ Clotrimazol;</li><li>➤ Nistatina.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Isolados de <i>Candida</i> spp.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Computador;</li><li>➤ Caderno;</li><li>➤ Canetas;</li><li>➤ Régua;</li><li>➤ Marcadores</li></ul>

## 5.7. População e Amostragem

A população para este estudo, compreendeu isolados de *Candida* spp, obtidos de mulheres em idade reprodutiva entre 18 aos 49 anos através da colheita de placas de cultura de exsudados vaginais em agar Sabourand Chlorafenicol no laboratório de Análises Clínicas Joaquim Chaves.

A amostragem foi não probabilística e por conveniência, seguindo os critérios de inclusão e exclusão. Foram selecionadas placas de cultura de exsudados vaginais em agar Sabourand Chlorafenicol com suspeita de *Candida* spp.

## 5.8. Critérios de inclusão

Fizeram parte deste estudo isolados de *Candida albicans* e *C. tropicalis* obtidos em de amostras de mulheres em idade reprodutiva (18 aos 49 anos), atendidas no Laboratório de Análises Clínicas Joaquim Chaves entre os meses de Fevereiro à Abril de 2023.

## 5.9. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo isolados de *Candida* spp. obtidos através de amostras de mulheres com idade abaixo dos 18 anos e acima dos 49 anos de idade.

### **5.10. Estimativa do tamanho amostral**

O tamanho da amostra foi constituído pelo número total de isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* (138 e 12 respectivamente) obtidos através de amostras de pacientes que cumpriram os critérios de inclusão acima citados atendidas no laboratório de análises clínicas Joaquim Chaves de Fevereiro à Abril de 2023.

### **5.11. Variáveis**

- Idade (18 aos 49 anos);
- Agente etiológico;
- Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

### **5.12. Análise de dados**

Os dados do estudo foram introduzidos no Microsoft Office Excel 2019 para análise de frequências dos dados sociodemográficos de mulheres com candidíase, e o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp.

A análise descritiva foi feita para descrever a frequência das faixas etárias das pacientes diagnosticadas com CVV.

O teste qui-quadrado de Person foi usado para mediar as possíveis associações entre as faixas etárias, as espécies e o perfil de susceptibilidade. A prevalência de CVV e a frequência de agentes etiológicos foram apresentadas em tabelas e gráficos de barras. A significância estatística foi estimada usando o intervalo de confiança de 95% e a nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **6. Considerações éticas**

O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo (CIBS FM&HCM) com o número, CIBSFM & HCM/55/2023 (Anexo 3).

Durante a realização deste estudo foram observados todos os princípios éticos, não tendo havido necessidade do consentimento informado pois este não envolveu contacto com as pacientes, as variáveis sociodemográficas foram retiradas da base de dados do laboratório porém a confidencialidade dos dados retirados das fichas de registo foi garantida pelos códigos em uso no laboratório Joaquim Chaves. Os nomes das participantes não foram mencionados ou escritos em nenhuma fase da realização do estudo. Os dados recolhidos durante este tempo foram usados apenas para este estudo e não para outros fins.

## **7. Resultados**

### **7.1. Perfil demográfico das pacientes com candidíase vulvovaginal**

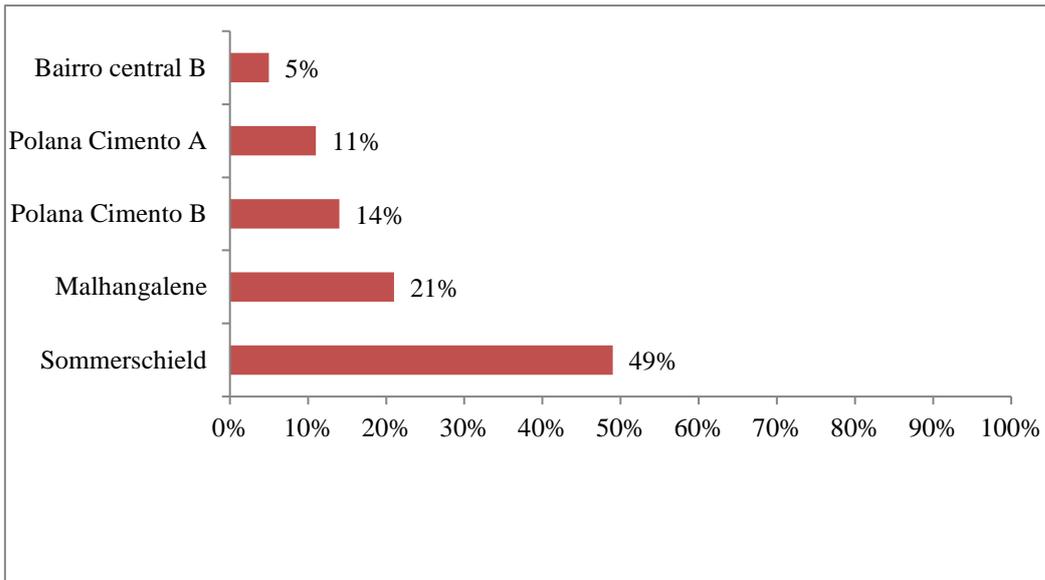
Durante o período de estudo (de Fevereiro a Abril de 2023) foram colhidas 369 amostras de exsudado vaginal, das quais 150/369 (40,6%) amostras foram positivas para *Candida* spp., principalmente para *C. albicans* e *C. tropicalis*. Do total de 150 amostras positivas a *Candida* spp. 138/150 (92%) foram positivas para *C. albicans* enquanto 12/150 (8%), foram positivas para *C. tropicalis*.

#### **7.1.1. Características sociodemográficas das pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal**

Foram incluídas neste estudo as variáveis sociodemográficas como idade e proveniência colhidas na base de registo do laboratório. Foram seleccionadas amostras de mulheres com idade considerada reprodutiva dos 18 – 49 anos, provenientes de diferentes bairros na cidade de Maputo. A idade média dos participantes do estudo foi de 30 com uma mediana de 29 e um desvio padrão de 7,4.

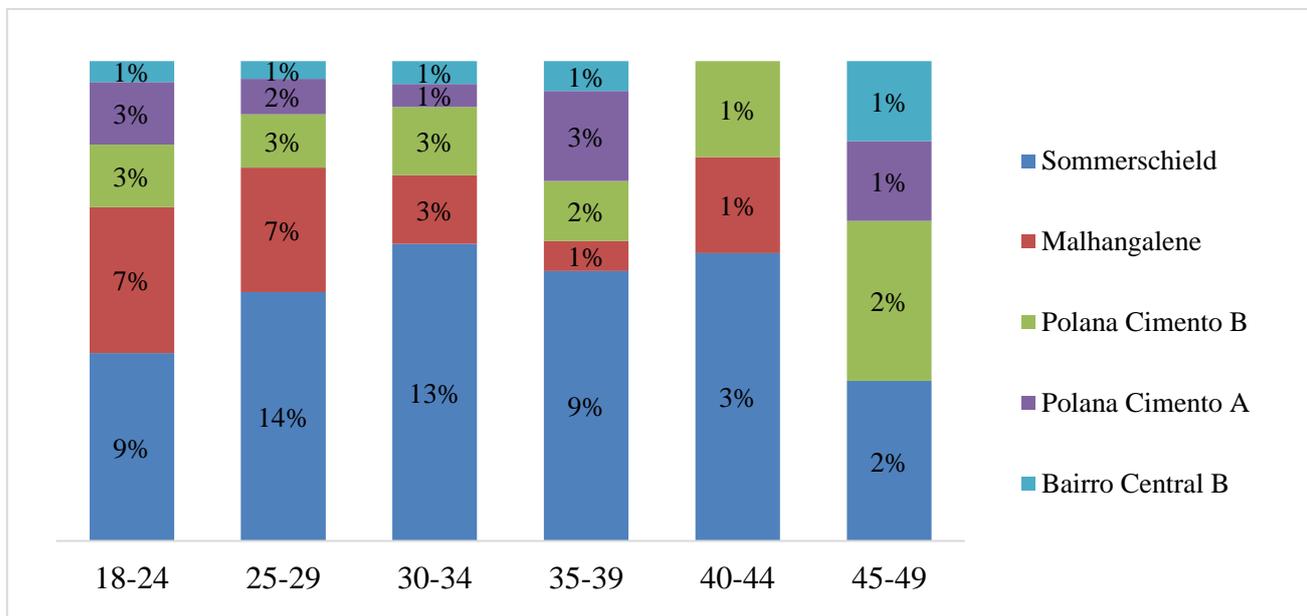
#### **7.1.2. Frequência dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* de acordo com a proveniência das pacientes com candidíase vulvovaginal**

A maioria das espécies de *Candida* foi isolada em amostras de mulheres provenientes do bairro de Sommerschild 74/150, (49%) seguido de Malhangalene com 37/150, (21%) como ilustrado no gráfico 1 abaixo.



**Figura 3: Frequência de isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* por proveniência das amostras de corrimento vaginal.**

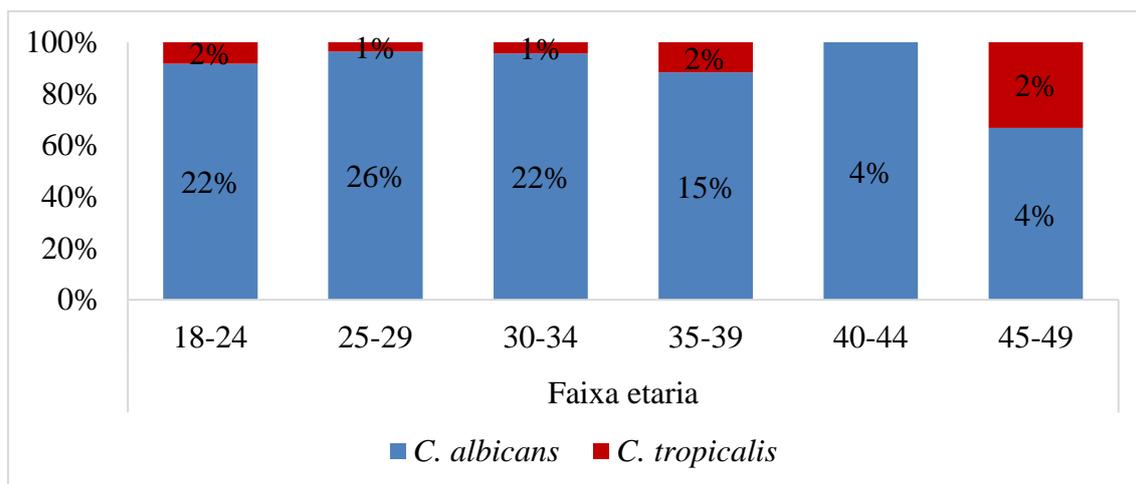
Estratificando os isolados de *Candida spp* por faixas etárias (**gráfico 2**), observou-se que uma maior proporção das amostras provenientes do bairro Sommerschild pertence a faixa etária dos 25 aos 29 anos, com uma percentagem de 14% (21/150) seguido pela faixa dos 30 a 34 anos com 13% (20/150).



**Figura 4: Distribuição dos isolados por faixa etária e proveniência das pacientes.**

## 7.2. Frequência de *C. albicans* e *C. tropicalis* por faixas etárias das pacientes com candidíase

Comparando as espécies de *Candida* por faixas etárias, notou-se que a maior proporção foi isolada em amostras de mulheres com 25-29 anos com 41/150 (27%), seguida por 18-24 anos 36/150 (24%) e por fim a dos 30-34 com 34/150 (23%). As faixas etárias menos frequentes foram 35-39 com 24/150, (16%), 45-49 com 9/150 (6%) e por fim 40-44 com a percentagem de (4%) 6/150 (Gráfico 3).

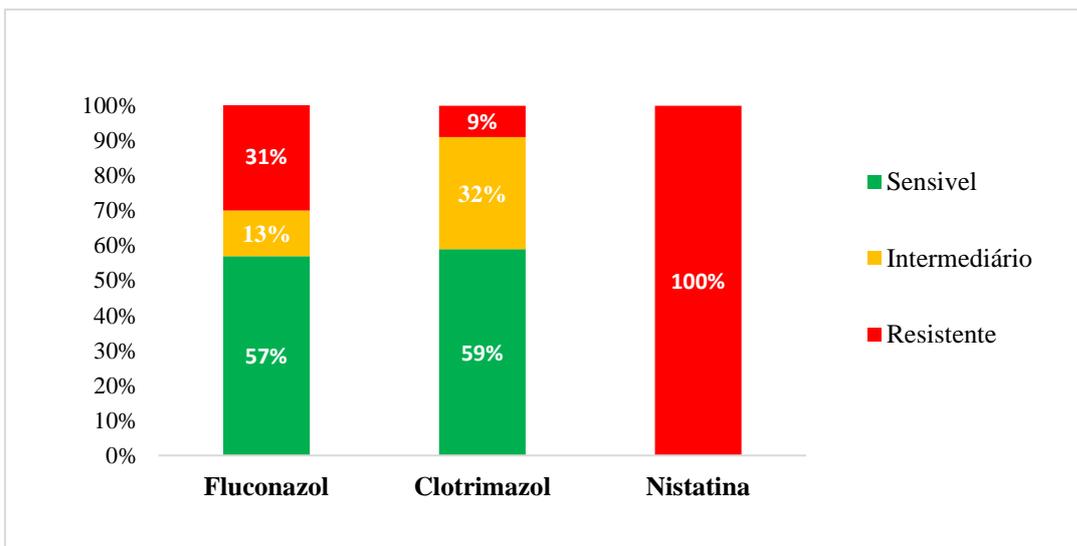


**Figura 5:** Distribuição de *C. albicans* e *C. tropicalis* por faixas etárias.

## 7.3. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos foram realizados em função da disponibilidade dos discos de antifúngicos no laboratório. Em que 150 isolados foram testados para fluconazol (FCZ 25 µg) e nistatina (NYS 100IU) e 90 isolados para clotrimazol (CLT 50mcg).

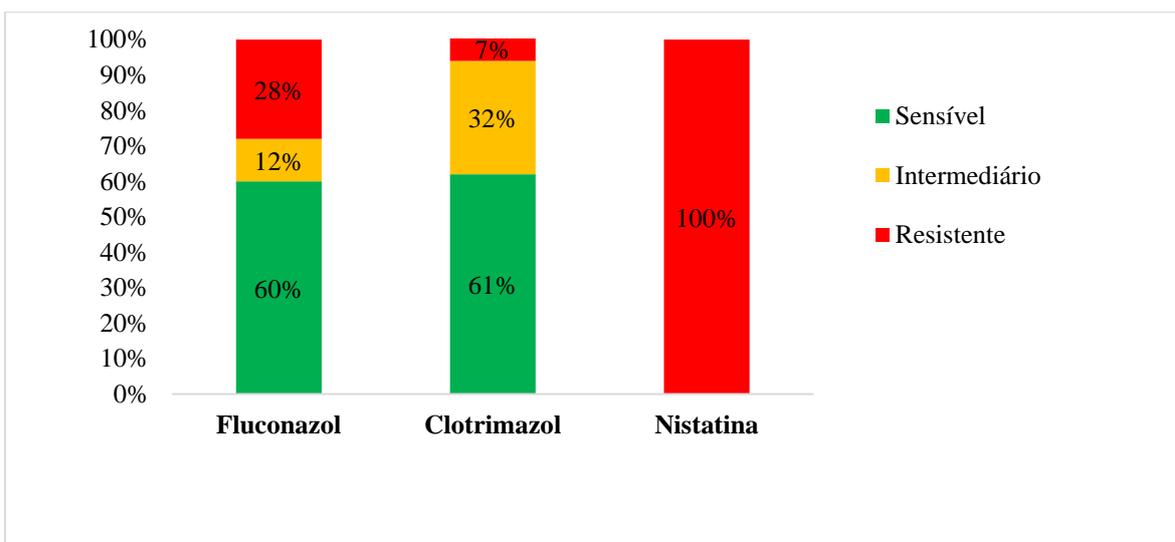
Em geral, os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* demonstraram altas taxas de resistência ao antifúngico nistatina 150/150 (100%), seguido por fluconazol 46/150 (31%) e clotrimazol 8/90 (9%). Como demonstrado (Gráfico 4) a seguir.



**Figura 6: Perfil de susceptibilidade de *C. albicans* e *C. tropicalis***

### 7.3.1. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *C. albicans*

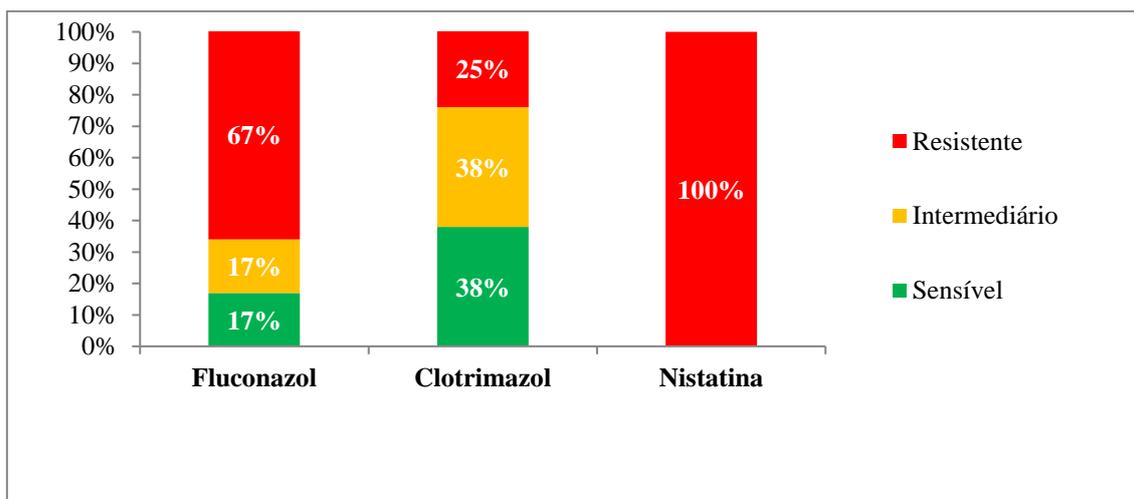
O TSA de *C. albicans* foi feito para um total de 138 isolados. Dos 90 discos CLT disponíveis apenas 82 foram testados para *C. albicans* e 8 para *C. tropicalis*. Onde foi observada sensibilidade ao Clotrimazol de 50/82 (61%), seguido por Fluconazol com 83/138 (60%). 17/138 (12%) e 26/82 (32%) foram intermediários para Fluconazol e Clotrimazol respectivamente, gráfico 5.



**Figura 5: Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de isolados de *Candida* spp.**

### 7.3.2. Perfil de susceptibilidade de *C. tropicalis*

Dos 12 isolados de *C. tropicalis* todos foram testados para os antifúngicos nistatina e fluconazol porém para antifúngico CLT foram testados apenas 8. Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram maior sensibilidade ao Clotrimazol 38% (3/8), seguido por Fluconazol com 17% (2/12), porém apresentaram alta taxa de resistência ao Fluconazol 67% (8/12) e foram todos resistentes a Nistatina 12/12 (100%), conforme ilustrado no gráfico 6.



**Figura 6:** Frequências do perfil de susceptibilidade de *C. tropicalis*

## 8. Discussão

### 8.1. Frequência de Candidíase Vulvovaginal em mulheres com idade reprodutiva

O presente trabalho incluiu um total de 150 isolados de leveduras do género *Candida*, obtidos a partir de secreções vaginais de mulheres em idade reprodutiva na cidade de Maputo.

As espécies do género *Candida* são patógenos oportunistas mais importantes entre as leveduras. O espectro de infecção por *Candida* é amplo, variando desde o envolvimento da mucosa local até infecções disseminadas com risco de vida. A candidíase vulvovaginal (CVV) é a infecção mais comum do trato genital inferior feminino causada por espécies de *Candida* (Zaman *et al.*, 2022).

A CVV é considerada a segunda causa mais comum de infecção genital em mulheres em idade reprodutiva e, embora represente um problema de importância mundial em saúde pública, sua incidência exacta é desconhecida (Brandolt, 2016).

A frequência de CVV obtida no presente estudo (40,6%) é relativamente menor quando comparada com a frequência reportada num estudo anterior realizado na cidade de Maputo (43,5%), concretamente no HCM (Sinussene *et al.*, 2022).

Entretanto, frequência relativamente maior de *C. albicans* (45%) foi observada na África do Sul, envolvendo mulheres com suspeita de candidíase vaginal atendidas no Hospital Universitário Público Terciário no Leste da Província do Cabo (Mnge *et al.*, 2017). Ainda em África, um estudo realizado em Angola, no Hospital Maternidade Irene Neto, Huíla, com 159 pacientes com suspeita clínica de candidíase vulvovaginal, 96/159 (60%) revelaram estar infectadas por leveduras do género *Candida*, das quais 132/159 (83%) destas infecções foram causadas por *C. albicans* (João, 2013) resultados similares foram obtidos no presente trabalho.

Estudo realizado na Índia encontrou 90% (90/100) de culturas positivas para *Candida*, onde 22% (22/100) correspondia a *C. albicans* e 3% (3/100) a *C. tropicalis*, com uma maior frequência (45%) de CVV na faixa etária dos 36 a 45 anos (Lakshmi *et al.*, 2015).

Adicionalmente, em Cabo-verde, Hospital Agostinho Neto e no Centro de Saúde Reprodutiva de um total de 116 amostras de exsudado vaginal, 42 foram positivas para *Candida*, das quais 40/42 (95%) correspondiam a *C. albicans* (Silva, 2013).

Em um estudo que incluiu 108 pacientes realizado no Peshawar (Paquistão), obteve-se maior frequência 28,7% (31/108) de CVV na faixa etária dos 21 aos 24 anos de idade, seguida da faixa dos 17 aos 20 anos com 25,9% (28/108) e a menos prevalente foi a dos 41 aos 45 com uma percentagem de 2,7% (3/108) (Khan *et al.*, 2018), concordando com os resultados obtidos neste estudo.

Pesquisas anteriores realizadas em Maputo, no centro de saúde 1º Junho demonstrou elevada frequência de *C. albicans* 80% (109/136) e os restantes 20% (27/136) pertenciam a *C. krusei* (Jentivo *et al.*, 2017), na faixa etária dos 15 - 49 anos, sendo a dos 15 - 24 anos a faixa que demonstrou maior frequência de *C. albicans*.

No HCM de um total de 201 isolados de *Candida* spp., obteve-se 73,1% (147/201) de *C. albicans* e 26,9% de *Candida* não *albicans*, das quais 20,4% foram identificadas como *C. tropicalis* (Sinussene *et al.*, 2022) e a faixa etária mais frequente foi a dos 20 aos 24 anos. Entretanto no presente estudo as espécies de *Candida* foram mais prevalentes numa faixa diferente.

Resultados contrários ao nosso estudo foram reportados no Brasil em que a faixa etária mais predominante de mulheres com CVV foi de 40-49 anos e a menos frequente foi dos 18 - 29 anos (Batista, 2020).

A avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos é geralmente feita determinando a viabilidade, ou crescimento de células de leveduras, quando em contacto com o agente antifúngico (Pereira, 2010).

Múltiplos factores podem afectar o desenvolvimento de resistência ao fluconazol e a diferentes antifúngicos incluindo a duração da exposição, frequência de dosagem e nível de exposição (Autmizguine *et al.*, 2018).

Estudo realizado em Maputo no HCM mostrou uma elevada sensibilidade de isolados de *C. albicans* ao clotrimazol (88,7%), (Sinussene *et al.*, 2022), resultado semelhante ao do presente estudo. Porém, resultados similares foram obtidos na Líbia, onde observou-se 100% de susceptibilidade de *C. albicans* ao clotrimazol (Zafar *et al.*, 2015).

Outro estudo feito no Irão, incluindo 50 isolados *C. albicans* observou-se 70% de sensibilidade de *C. albicans* ao clotrimazol, 16% (8/50) foram intermediários e 14% (7/50) resistentes (Tamai, 2021), sendo similares aos resultados obtidos no presente estudo.

No Egito, constatou-se que 85,7% dos isolados de *Candida* eram sensíveis ao clotrimazol (Mona *et al.*, 2015).

Entretanto, uma pesquisa conduzida na Nigéria, envolvendo pacientes com CVV observou-se uma baixa sensibilidade de *Candida spp.* ao antifúngico clotrimazol 36,2% (25/69) e uma resistência de 63,8% (44/69) (Ojogba *et al.*, 2017). Estes resultados sugerem uma variação do perfil de susceptibilidade de *C. albicans* aos antifúngicos entre os país e em determinados períodos de tempo.

Neste estudo observou-se que um total de 25% de isolados de *C. tropicalis* eram resistentes ao clotrimazol. A resistência aos azóis pode estar associada a diferentes mecanismos moleculares, tais como: mutações no local alvo de ligação dos azólicos que resultam na redução ou perda de afinidade com azóis ou ainda na incapacidade de se ligar a azóis (Forastiero *et al.*, 2013) havendo por conseguinte necessidade de continuação de estudo focando nos mecanismos de resistência de *Candida spp* aos antifúngicos. Foi recentemente demonstrado que o aumento de isolados de *Candida spp.* resistentes a um ou mais antifúngicos azóis tem sido associado ao seu uso indiscriminado (Zaman *et al.*, 2022).

Para o fluconazol, obteve-se sensibilidade de 60% (83/138) e 17% (2/12) para *C. albicans* e *C. tropicalis* respectivamente, resultado similar ao obtido por (Sinussene, *et al.*, 2022) que encontrou 62,9% (39/62) de sensibilidade. Resultados de sensibilidade relativamente maiores foram obtidos em uma pesquisa realizada em Gana em que a sensibilidade ao fluconazol foi de 73% (29/40) (Adjapong *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da resistência ao fluconazol em *C. tropicalis* pode estar ligado à regulação positiva de dois genes transportadores de efluxo de múltiplas drogas, CtMDR1 e CtCDR1 (Forastiero *et al.*, 2013).

Porém os resultados deste estudo são discordantes aos obtidos por (Khan *et al.*, 2018), em um estudo realizado nos hospitais terciários de Peshawar, em que em 62% de isolados de *C. albicans* 53,3% (24/45) foram resistentes ao fluconazol.

No Irão foi observada resistência de 16/50 (32%) de *C. albicans* ao fluconazol (Tamai, 2021). Adicionalmente, estudo realizado no Brasil demonstrou elevadas taxas de resistência de *C. albicans* e *C. tropicalis* ao fluconazol, nomeadamente 3/8 (37,5%) e 1/2 (50%) respectivamente (Menezes, 2016).

Na China, as estirpes de *C. tropicalis* demonstraram tendência crescente de resistência ao fluconazol em 35,6% (26/73), e 6,8% (5/73) foram intermediários (Song *et al.*, 2020).

Para o antifúngico nistatina, as estirpes de *C. albicans* e *C. tropicalis* na presente pesquisa mostraram altas taxas de resistência, 100% (150/150). Resultados similares a este foram reportados por (Sinussene, *et al.*, 2022). Porém, resultados contrários aos desta pesquisa foram obtidos por (Samuel *et al.*, 2019), numa pesquisa feita no Centro de Saúde de Xipamanine, Maputo em a taxa de resistencia nistatina foi de 1,7%, aproximando-se aos resultados anteriormente obtidos por (Jentivo, *et al.*, 2017) no Centro de Saude 1° de Junho.

Adicionalmente, um estudo conduzido na Nigéria, observou-se 79,7% (55/69) de resistência de *C. albicans* a nistatina e *C. tropicalis* demonstrou uma resistência de 66,7% (2/3) (Ojogba *et al.*, 2017).

## 9. Limitações

Durante a realização deste estudo teve-se como limitações os seguintes aspectos:

- Por ser um estudo secundário, carece de representatividade, sendo que os resultados desta pesquisa não poderão ser inferidos para a população geral, mas para uma população com características similares as deste estudo.
- A exclusão de algumas amostras (por insuficiência de variáveis demográficas) e a não realização de TSA a todos os isolados de *Candida* spp no período de estudo poderá de alguma forma ter influenciado os resultados aqui observados.
- A não inclusão de todos os isolados durante o período de estudo por exiguidade de fundos pode também influenciar nos resultados aqui observados.
- Elevado custo de drogas antifúngicas, dificultando a prática rotineira dos testes de sensibilidade.

## 10. Conclusões

- Observamos uma elevada prevalência de candidíase vulvovaginal em mulheres com idades compreendidas entre 25-29 anos, provenientes do bairro sommerschield, seguido pelo bairro malhangalene;
- *Candida albicans* foi o agente da candidíase vulvovaginal mais prevalente neste estudo;
- *C. albicans* apresentou altas taxas de sensibilidade ao clotrimazol, seguido de fluconazol. Entretanto, *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram taxas de resistência a nistatina de 100%.

## 11. Recomendações

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, recomenda-se o seguinte:

- A realização de estudos similares utilizando meios de cultura cromogénicos de modo a identificar mais espécies de *Candida* de interesse clínico como *C. glabrata* e *C. krusei*) ou a utilização de métodos moleculares para a identificação destas espécies;
- Realização de mais pesquisas para identificar os mecanismos de resistência de *Candida spp.* aos antifúngicos;
- As mulheres com candidíase vulvovaginal recomenda-se a não automedicação;
- E aos profissionais de saúde recomenda-se a realização de TSA nos isolados de *Candida spp* para escolha de terapia adequada.

## 12. Referências bibliográficas

1. Adjapong, G, M, H e, A Garrill (2016) Uma investigação comparativa da susceptibilidade aos azóis em *Candida*, isolados de candidíase vulvovaginal em pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente em Gana. *International society for human and animal mycology*. (55): 656-659;
2. Alastruey-Izquierdo, A., M. S. C. Melhem, L. X. Bonfietti e J. L. Rodriguez-Tudela (2015). Susceptibility test for fungi: Clinical and Laboratorial correlations in Medical Mycology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 57 (19): 57-64.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). Microbiologia Clínica para o controle da infecção relacionada a assistência a saúde Módulo 8: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. *Anvisa*, 9 (1): 24-27.
4. Álvares, C, A., T, I, E. Svidzinski, M, E, L. Consolaro (2007). Vulvovaginal Candidiasis: Susceptibility Factors Of The Host And Virulence Of The Yeast. *Journal Bras Patol Med Lab*, 43 (5): 320-322.
5. Autmizguine, J., P. Brian, K, P. Smith, B, Catherine, N, Girija, B, Margarita, D, A. Kaufman, J. David, B, Ashley S. R, Pandit P, Wiley A. Schell, G, Jamie, K. Daniel., J. Benjamin (2018) Efeito da profilaxia com fluconazol sobre *Candida* susceptibilidade ao fluconazol em prematuros. *J Quimioterapia antimicrobiana*, 73 (34): 82–87
6. Barbedo, L.S. e D.B.G. Sgarbi (2010). Candidíase. *J-bras doenças sex transm* 22 (1): 1-29.
7. Batista, J, E.Oliveira, A, P., Aragão, F,B. Santos, G, R. Lobão, W, J, Cunha, C, C. Santos, T, S, Sousa, C, P., V, P, Rodrigues (2020) Factores associados à presença de *Candida* spp. em amostras de fluido vaginal de mulheres residentes em comunidades quilombolas. *Revistas usp br*. 53 (2): 171-181;
8. Bilbao, B, N (2018) Estado actual de las resistências de *Candida* a los fármacos antifúngicos y estudio de los mecanismos implicados. *Facultad de medicina y enfermeira* (16): 5-6
9. Brandolt, T, M. Clafkea, G, B., Gonçalves, C, V. Bitencourta, L. Martinez, A, M. Mendes, B. Furtado J, Meireles M, C, A., M, O, Xavier (2016) Prevalência de

- Candida* spp. Em amostras cérvico vaginais e susceptibilidade em vitro de isolados. *Brazilian journal of microbiology* (1): 145-150;
10. Bulacio, L., M. Paz, S. Ramadán, L. Ramos, C. Pairoba, M. Sortino, L. Escovich e C. López (2012). Oral infections caused by yeasts in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. Identification of the yeasts and evaluation of their antifungal susceptibility. *Journal de Mycologie Médicale*. 22: 348-353.
  11. Carrillo-Muñoz, A. J., M. C. Diaz, e R. Camponovo, I. Araya, A. Cerda e M. P. Santander (2016). Identification and in vitro antifungal susceptibility of vaginal *Candida* spp. Isolates to fluconazole, clotrimazole and nystatin. *Revista espanhola de quimioterapia*. 29 (3): 151-154.
  12. Comé, C., O. Alfredo, E. Cotoconia., F. Nhassengo, A. Nhantumbo, A. Z. Cuco, G. Cunha. H, Schirmer, E, S, Gudo. V, Caantarelli (2018). Frequência E Perfil de Susceptibilidade de *Candida* spp. Isoladas de Mulheres da Cidade de Maputo. *Revista Moçambicana de Ciências de Saúde*, 4 (Edição Especial): 69.
  13. Dovník, A, Golle A., D. Novak, A, Darja. I, Takac (2015). Tratamento da candidíase vulvovaginal: uma revisão da literatura. *Acta Dermatovenerologica*, 24:5-7
  14. Ferracin, I. e M. Oliveira (2005) Corrimento Vaginal: Causa, Diagnóstico e Tratamento Farmacológico. *Infarma*, 17 (1): 82.
  15. Ferrer, J. (2000) Vaginal Candidosis: Epidemiological and Etiological Factors. *Int Journal Gynaecol Obstet*, 71 (1): 21-27.
  16. Forastiero, A, Arango A, C., Izquierdo, A. Fuoli. L.Martinez, T. Pelaez, J, F, Lopez. J, O., Grimalt, A. Lopez, O, Zaragoza., E., Melado (2013). *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance is related to different azole target (Erg11p) Modifications. *Journals.ASM.org*, 57(10): 4769-4781;
  17. Jentivo, P.J., J. Langa., A. Manjate e A. Chauque (2017). Perfil de Sensibilidade de *Candida albicans*, isolada em pacientes com suspeita de candidíase vaginal atendidas no centro de saude 1º de Junho- Maputo.

18. João, E.C., B. S (2013) Etiologia das infecções Fúngicas Vaginais na Região de Lubango-huíla e a Resistência aos Fármacos Antifúngicos. Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
19. Joaquim Chaves Saúde. Disponível em: <[www.jcs.co.mz](http://www.jcs.co.mz)>. Acessado em 28 de Abril de 2023.
20. Khan, F. e R. Baqai (2018). In vitro antifungal sensitivity of Fluconazole, Clotrimazole and Nystatin against vaginal candidiasis in females of childbearing age. 4pp. Karachi. Journal of Ayub Medical College. 22 (4).
21. Lacaz, C. S, E, Porto. J, E, C, Martins. E. M. Heins-Vaccari, N, T, Melo (2002). Tratado de 145 Micologia Médica Lacaz, 9ª ed, 1104. São Paulo, Editora Sarvier.
22. Lakshmi, N., G. R. Kumari, M. D. Purushottham e P. B. M. Krishna (2015). Isolation and Speciation of *Candida* from Vulvovaginitis and their Antifungal Susceptibility. International journal of current Microbiology and applied sciences. 4 (12): 121-129.
23. Manólea, M, M., Ofiteru, A, M, E. Sandulescu, Camém, E, V. Dijmarescu, E, A. Vraiva, C, S, S. A, M., Simnel (2022) Ensaio clínico e morfológico na candidíase vulvovaginal. *Rom J Morphol Embriol* (3):511–520;
24. Mapcarta. Disponível em <[mapcarta.com/pt/](http://mapcarta.com/pt/)> Acessado em 12 de Junho de 2023.
25. Mendes, A, P (2020) Candidíase vulvovaginal: Manifestações e tratamento. *Centro de informação do medicamento* 2-3;
26. Menezes, E. A. Cunha, M, C., Capelo, E, B., Braz, L., F. A Cunha (2013). Susceptibilidade a antifúngicos e factores de virulência de *Candida* spp. isoladas em Russas, Ceará *Rev Patol Trop* 42 (1): 49-55;
27. Ministério da Saúde (2017). *Lista nacional de medicamentos essenciais*. 94pp. MISAU – Departamento Farmacêutico
28. Mnge, P., B. I. Okeleye, S. D. Vasaikar e T. Apalata (2017). Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from a public tertiary teaching hospital in the Eastern Cape Province, South Africa. 7pp. South Africa. Mthatha

29. Mona, F., N. Asmaa., B. Ashgan., N.E. Mohamed e A. Hydi (2015). Antifungal Susceptibility Pattern and Species Distribution of *Candida* Isolates from Patients with Vulvovaginal Candidiasis. *International Journal of Advanced Research*. 3(5): 1376- 1386
30. Moore, K e I.I. A. F. Daley (2014). Anatomia Orientada para Clínica, 7ª ed, 1307. Rio de Janeiro, Guanabara koogan.
31. Nasser, A. (2012) Mecanismos de resistência de *Candida albicans*. (1): 1-4.
32. Navarini, A. (2007). Avaliação de testes de identificação e sensibilidade que podem ser utilizados em Laboratórios Clínicos em cepas de *Candida* spp. Tese de Mestrado. 58pp. São Paulo. Santa Casa de São Paulo.
33. Peixoto, V, J., M, G. Rocha, R, T, L. Nascimento, V. Velosomoreira, T, G, B. Kashiwabara (2014). Candidíase -uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*, 8 (2): 1-6.
34. Phillips, N, A, M. Rocktashel, L Merjanian .(2022). Ibrexafungerp para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal: Desenho, Desenvolvimento e Lugar na Terapia *Pombaimprensa*, 3 (3): 363-364;
35. Pereira A.P.V. (2010). Identificação molecular de candidoses invasivas no centro Hospitalar Cova da Beira. Tese de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical Universidade Nova de Lisboa
36. Rodrigues, M. T. (2013) Associação entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas e manifestações clínicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 35 (12): 2-9.
37. Rodrigues, D, D., Silva, M, F, C, Bicalho, P, H, N., Sousa, M, A, B I., N, A. Ricci (2020) Evaluation of the frequency of candida species isolates in vaginal secretions and the profile of susceptibility to antifungals. *Rev científica da faminas*. 15 (2): 46-48
38. Rodrigues, M. L. T. (2008). Avaliação de métodos para susceptibilidade para enxaguantes bucais frente a espécies do género *Candida*. Tese de Mestrado. 92pp. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

39. Samuel, I.B., A. Manjate., J. Sumbana (2019). Candidíase causada por *Cândida* spp. em Adolescentes e Jovens dos 16 aos 24 anos no Centro de Saúde de Xipamanine: Perfil de Susceptibilidade aos Antifúngicos de *Candida albicans*. Tese de Licenciatura. 39pp. Universidade Eduardo Mondlane.
40. Silva, Z. D. L (2013). Ocorrência, diagnóstico molecular e resistência a antifúngicos de *Candida* sp. de infecções vaginais em Portugal e Cabo-Verde. Faculdade de ciências e tecnologia.
41. Sinussene, C. T, F., A. Manjate., J. Sumbana (2022) Teste de Susceptibilidade a Antifúngicos de *Candida albicans* Isolado em Amostras de Corrimento Vaginal de Pacientes Atendidos no Hospital Central de Maputo, no Período de Março - Julho de 2022. Tese de Licenciatura. 14-15pp. Universidade Eduardo Mondlane.
42. Soares, D, M., E, O. Lima, M, M. Soares, N. F, Siva, N, G, M. Costa, F.S, E, D, V. Faria, A, F, R. Rodrigues (2018). Candidíase Vulvovaginal: Uma Revisão de Literatura Com Abordagem Para *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*, 25 (1): 1-7.
43. Song, Y, S, Xianlian, C. Yan, Y, Zhe, W. Liu, W., L, Ruoyu (2020) Prevalence and Antifungal Susceptibility of Pathogenic Yeasts in China. *Frontiers in Microbiology*, 11(1401): 6-8;
44. Souza, M. A. F. (2017). patogenia e Diagnóstico da Candidíase Vaginal. Tese de Licenciatura. Recife, Instituto Nacional de Ensino Superior E Pesquisa Centro de Capacitação Educacional.
45. Tamai, I, A, Pakbin, B., B, N, Fasaie (2021) Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from Iranian HIV-infected patients with oral candidiasis. *BMC Res Notes-* (14): 6-7;
46. Vieira, A, J, H. J, I. Santos (2017) Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anitericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC* 49 (3) 236-239
47. Yano, J, M. Brian. P, Mairi. C. Noverr, L, Paul. J, Fidel. (2018). Novo mecanismo por trás da imunopatogenia da candidíase vulvovaginal. *American society for microbiology*, 86 (3):

48. Zafar, S., M. Khurram, R. Usman, F. Khan e R. Nasim (2015). Clotrimazole, Fluconazole, Ketoconazole and Itraconazole Susceptibilities of *Candida* Species in vulvovaginitis. *Journal of Medical Science*. 23 (3): 130-133.
49. Zaman, R., Ullah, I, Adeeb. H., A. Ambreen (2022) Resistência a azóis de espécies de *Candida* causando vulvovaginite em mulheres em idade reprodutiva. *Pak J Med Sc*. 38 (8): 2239-2245.

# **13. ANEXOS**

Faculdade de Ciências  
Departamento de Ciências Biológicas  
Curso de Licenciatura em Biologia e Saúde  
Apêndice 1: Ficha de recolha de dados

1.	Idade da paciente	
2.	Proveniência	
3.	Data do diagnóstico laboratorial de candidíase vulvovaginal	
4.	Código da amostra no Laboratório Joaquim Chaves rio	
5.	Código da amostra no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina	



### Apêndice 3: Carta do comité de bioética

 <p>UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE</p>		<p>FACULDADE DE <b>MEDICINA</b> FUNDADA EM 1982</p>		<h2>Carta do Comité de Bioética</h2>	
<b>I. IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO</b>					
1. Título		Etiologia da Candidíase Vulvovaginal e Perfil de Susceptibilidade aos antifúngicos de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> isoladas de secreção vaginal de mulheres com idade reprodutiva na cidade de Maput			
2. Investigador Principal		Lucineid Rafaela da Laura			
3. Supervisor		<p><i>A escolha do supervisor é adequada ao tema proposto (experiência, nível académico, área)? O supervisor a provação do projecto? (verificar se tem carta de cobertura assinada pelo supervisor).</i></p> <p>R:</p>			
<b>II. Aspectos gerais do protocolo/projecto</b>					
4. Relevância Científica		<p><i>É um tema interessante sob ponto de vista clínico ou de saúde pública tendo em conta a agenda de investigação, extensão e/ou inovação?</i></p> <p>R: Correcta</p>			
5. impressão geral		<p><i>Apresenta uma estrutura de acordo com as normas, forma, ortografia? Tem indícios de plágio? Qual é a sua impressão geral do protocolo e recomendações?</i></p> <p>R:</p>			
<b>III. AVALIAÇÃO POR CAPÍTULOS</b>					
6. Título		<p><i>O título reflecte o conteúdo do protocolo?</i></p> <p>R:</p>			sim
7. Motivação		<p><i>Apresenta o seu interesse pessoal sobre o tema e a razão que levou a escolha deste tema?</i></p> <p>R:</p>			
8. Objectivos		<p><i>O(s) objectivo(s) está(ão) claramente formulado(s)?</i></p> <p>R:</p>			
9. Contribuição		<p><i>Qual será a Contribuição dos resultados do estudo para as políticas de saúde locais ou internacionais ou para as comunidades em geral</i></p> <p>R:</p>			sim

10. Problema/Questão de pesquisa	<i>A questão de pesquisa foi bem colocada? É relevante tendo em conta o tema? Será respondida com a metodologia proposta?</i> R:	sim
11. Revisão bibliográfica	<i>Foi apresentada uma revisão de leitura local e internacional? Rem uma justificação plausível para realizar o estudo?</i> R:	sim
12. Enquadramento teórico ou conceptual	<i>Identifica o tipo de enquadramento? Se conceptual apresenta um mapa conceptual, distingue a variável dependente e explica quais elementos a pesquisa vai cobrir? Se teórico, apresenta uma teoria, justificativa a escolha e explica como vai utilizar a teoria na análise de dados?</i> R:	sim

13. Método	a) Desenho do estudo	<i>Explica o tipo de estudo que pretende realizar?</i> R:	sim
	b) Local do estudo	<i>Indica o local (ais) de estudo?</i> R:	sim
	c) Período de estudo	<i>Indica o período de estudo?</i> R:	sim
	d) População, amostra, amostragem	<i>Indica a população a estudar, o cálculo do tamanho da amostra e a técnica de amostragem (se aplicável)?</i> R:	sim
	e) Procedimentos, técnicas e instrumentos de recolha de dados	<i>Descreve claramente os procedimentos do estudos as técnicas a usar para a recolha de dados e os respetivos instrumentos de recolha de dados?</i> R:	sim
	f) Variáveis	<i>São apresentada as variáveis de estudo/possíveis construtos? Estão alinhado/as com os objectivos específicos do estudo e com os instrumentos propostos.</i> R:	sim
	f) Gestão e análise dos dados	<i>Apresenta o plano e as técnicas de análise de dados? Se a abordagem é mista, distingue claramente a análise para as partes quantitativas e qualitativas?</i>	sim
14. Limitações do estudo	<i>Apresenta as limitações do estudo e o que vai fazer para minimizar as limitações</i> R:	sim	

15. Resultados esperados	<i>Os resultados esperados estão bem descritos? Reflectem os objectivos? E o plano de divulgação dos resultados foi apresentado?</i> R:	sim
16. Considerações Éticas	<i>Os aspectos éticos foram considerados? Declaração de conflito de interesse?</i> R:	sim
17. Cronograma	O cronograma é realístico tendo em conta a metodologia proposta? R:	sim
18. Orçamento	<i>O orçamento é realístico tendo em conta a metodologia proposta?</i> R:	sim
19. Referências bibliográficas	<i>Apresenta referências bibliográficas relevantes e/ou actuais? Usa um modelo de referenciamento padrão?</i> R:	sim
Recomendações	R: O Protocolo é aprovado sem alterações	