



Natasha de Fátima Oliveira Esteves Rosário

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Natural Transformation in *Acinetobacter* spp.” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Paulo Monteiro, da Dr.^a Florbela Braga e da Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Natasha de Fátima Oliveira Esteves Rosário

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Natural Transformation in *Acinetobacter* spp.”

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Natural Transformation in *Acinetobacter* spp.” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Paulo Monteiro, da Dr.^a Florbela Braga e da Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho, 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

• AGRADECIMENTOS •

À **Professora Doutora Sara Domingues**, pela paciência infinita, pela permanente disponibilidade, pela confiança no laboratório e pela partilha de conhecimento.

Ao **Dr. Paulo Monteiro** e a toda a **equipa da Farmácia São José**, pelo apoio constante, pela completa disponibilidade, pela amizade e, sobretudo, por me acolheram como se fosse da família.

À **Dr.ª Florbela Braga** e a toda a **equipa dos Serviços Farmacêuticos do IPO-PORTO**, pela experiência proporcionada, pela sensibilidade para compreender a condição humana em contexto hospitalar e pelo crescimento a nível profissional e pessoal.

Aos **meus pais**, que serão sempre o meu porto-seguro; pelo amor incondicional, pelos sacrifícios, pela força e pela fé inabaláveis.

À **minha irmã**, que será sempre a minha pessoa; pelo exemplo que é, pela cumplicidade inexplicável.

Ao **Pedro**, por gostar sempre de mim mesmo com tantas mudanças de humor, por nunca me deixar desistir e por me fazer acreditar que, no fim, tudo dará certo.

À **Mónica**, minha madeirense preferida, pela revelação, pelo companheirismo, pela confiança, e, especialmente, pela amizade que construímos.

A **Coimbra**, pela magia, pelos laços que criaste e pelo amor que me deste.

A **mim**, por me superar diariamente.

This work is part of the following publications:

H. Ben Cheikh, S. Domingues, E. Silveira, Y. Kadri, **N. Rosário**, M. Mastouri, G.J. Da Silva (2018). Molecular characterization of carbapenemases of clinical *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolates from a University Hospital in Tunisia. *3 biotech.* 8:297. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1310-3>.

S. Domingues, **N. Rosário**, H. Ben Cheikh, G.J. Da Silva (2018). IS*AbaI* and Tn*6168* acquisition by natural transformation leads to third-generation cephalosporins resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Infection Genetics and Evolution.* 63:13-16. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.007>.

S. Domingues, **N. Rosário**, D. Neto, K.M. Nielsen, G.J. da Silva (2017). DNA uptake by clinical multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. P3-11, 11th *Acinetobacter*, Seville, Spain.

• ÍNDICE •

	pp.
CAPÍTULO I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA	6
Lista de Abreviaturas	7
Introdução	8
1) Farmácia São José	9
2) Análise SWOT	10
2.1) Pontos Fortes	10
2.2) Pontos Fracos	14
2.3) Oportunidades	16
2.4) Ameaças	17
Conclusão	20
Referências Bibliográficas	21
Anexos	23
CAPÍTULO II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA HOSPITALAR	24
Lista de Abreviaturas	25
Introdução	26
1) IPO-PORTO	27
1.1) Serviços Farmacêuticos	27
2) Análise SWOT	28
2.1) Pontos Fortes	28
2.2) Pontos Fracos	32
2.3) Oportunidades	33
2.4) Ameaças	35
Conclusão	37
Referências Bibliográficas	38
Anexos	40

CAPÍTULO III – MONOGRAFIA “Natural Transformation in <i>Acinetobacter</i> spp.”	..43
List of Abbreviations	44
Resumo	45
Abstract	46
Introduction	47
1.1) ESKAPE Pathogens	47
1.2) <i>Acinetobacter</i> spp.	48
1.3) Dissemination of Antibiotic Resistance	49
1.3.1) Horizontal Gene Transfer	50
1.3.1.1) Natural Transformation	51
1.4) Aims	53
Material and Methods	54
PART I – Screening of naturally competent <i>Acinetobacter</i> spp. isolates	54
1.1) Bacterial strains	54
1.1.1) Recipient bacteria	54
1.1.2) Donor bacteria	54
1.2) Growth conditions	54
1.3) DNA extraction	54
1.3.1) Total DNA	54
1.3.1.1) Determination of the concentration and purity of the DNA	55
1.3.2) Boiled DNA	55
1.4) Natural transformation assays	55
1.5) Characterization of transformants	56
PART II – Acquisition of resistance determinants by natural transformation	57
2.1) Bacterial strains	57
2.2) Natural transformation assays	57
2.3) Antimicrobial susceptibility testing	58
2.4) Molecular characterization of bacterial isolates	58
Results	60
PART I – Screening of naturally competent <i>Acinetobacter</i> spp. isolates	60
PART II – Acquisition of resistance determinants by natural transformation	62
Conclusion	68
References	70

• Capítulo I •

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



• LISTA DE ABREVIATURAS •

DCI	Denominação Comum Internacional
FC	Farmácia Comunitária
FSJ	Farmácia São José
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MSRM	Medicamento Sujeito a Receita Médica
SWOT	Pontos Fortes, Ponto Fracos, Oportunidades e Ameaças, do inglês <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

• INTRODUÇÃO •

É inquestionável a evolução do conceito de Farmácia Comunitária (FC) e, conseqüentemente, do papel do farmacêutico perante a sociedade. Cada vez mais, as farmácias se têm tornado a primeira opção dos utentes para a resolução de questões e/ou de situações de menor gravidade, uma vez que o profissional de saúde mais próximo e mais acessível é, muitas vezes, o farmacêutico¹.

Atualmente, as farmácias não são somente locais de dispensa de medicamento. De facto, têm-se assumido cada vez mais como espaços de saúde, em que são prestados serviços diversificados e de qualidade, que visam a educação e a promoção para a saúde^{1,2}.

Esta nova realidade exige ao farmacêutico atual uma permanente atualização de conhecimentos e um desenvolvimento contínuo de valências, para que se diferencie e procure estar à altura dos desafios que vão sendo propostos^{2,3}.

Neste sentido, nos meses de setembro a dezembro de 2017, realizei um estágio curricular em FC, na Farmácia São José (FSJ), em Coimbra, sob a orientação do Dr. Paulo Monteiro.

Esta etapa foi, por um lado, uma oportunidade para pôr em prática todos os conhecimentos que fui adquirindo durante a minha formação e, por outro lado, permitiu que trabalhasse as minhas competências sociais e humanas.

O facto de nunca ter estagiado nesta área foi, sobretudo, um fator estimulante, uma vez que todos os processos foram uma novidade.

Posto isto, o presente relatório consiste numa análise crítica não só ao estágio realizado na FSJ, mas também à posição, atual e futura, da FC e do papel do farmacêutico comunitário. Esta análise é apresentada segundo o modelo SWOT – acrónimo inglês de **S**trengths, **W**eaknesses, **O**pportunities and **T**hreats, na qual pretendo identificar e analisar alguns dos aspetos positivos e negativos, bem como oportunidades e ameaças que tornaram toda a experiência mais completa⁴.

I) Farmácia São José

A FSJ é uma das farmácias de eleição de cidade de Coimbra, reconhecida pela competência e pelo cuidado e preocupação para com os utentes.

Esta divide-se em dois andares, havendo uma separação física entre a zona acessível ao público e a zona de *back office*.

Relativamente à primeira, esta contempla a área de atendimento, possuindo dez balcões, dois dos quais estão localizados no espaço de dermofarmácia e cosmética. Conta ainda com dois gabinetes individualizados: um destinado às consultas de nutrição e outro, à determinação de parâmetros bioquímicos, tais como a glicémia e o colesterol total, à medição da pressão arterial e à administração de vacinas não incluídas no plano nacional de vacinação.

No diz respeito à zona de *back office*, esta possui dois escritórios: um adaptado às consultas de podologia e outro destinado a reuniões de equipa, com delegados de informação médica e outros profissionais e a conferência do receituário. Dispõe também, de um laboratório para a preparação de medicamentos manipulados, várias zonas de armazenamento e uma área para a realização, receção e conferência de encomendas, que inclui um *robot*, sistema que se revela fundamental para a organização e gestão de *stocks*, bem como para a otimização da dispensa de medicamentos, reduzindo o tempo de espera do doente.

Quanto à equipa da FSJ, esta é formada por cinco técnicos de farmácia e por oito farmacêuticos, incluindo o Diretor Técnico.

Face à dimensão da farmácia, torna-se necessário que haja uma boa organização e distribuição de tarefas entre a equipa, assegurando assim, que sejam prestados serviços de excelência.

2) Análise SWOT

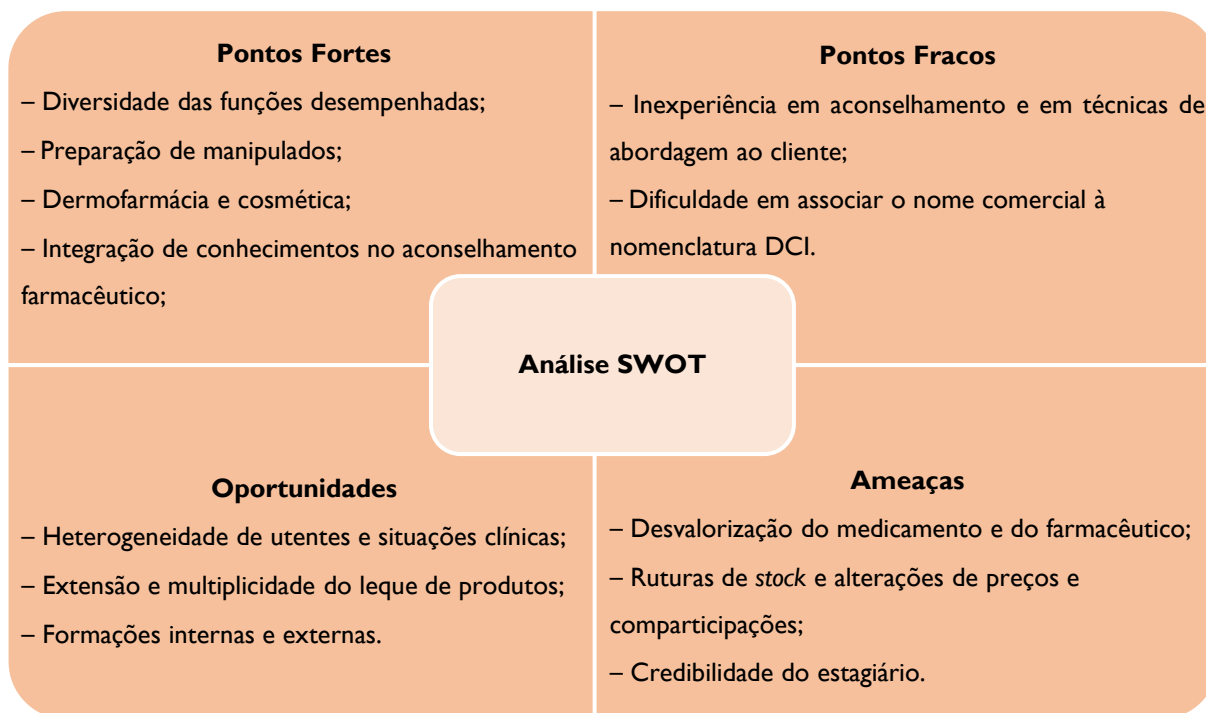


Figura 1: Análise SWOT do estágio em Farmácia Comunitária. Neste esquema, estão representados os pontos fortes e os pontos fracos, bem como as oportunidades e as ameaças da experiência, em contexto de estágio, na Farmácia São José.

2.1) Pontos Fortes

2.1.1) Diversidade das funções desempenhadas

A FC é um espaço de saúde, enquadrado numa estrutura empresarial. Deste ponto de vista, é importante destacar o papel fundamental das tarefas de *back office* que garantem, não só, uma dispensa de medicamentos e produtos farmacêuticos com qualidade e de forma eficiente, assim como criam condições para que todos os serviços prestados à comunidade sejam de excelência. É, por isso, crucial a coordenação e otimização da gestão e da saúde como um todo, para a sustentabilidade da farmácia.

Na FSJ, o estágio é planeado a fim de haver rotatividade do local de trabalho e das funções que lhe são subjacentes, o que nos proporciona uma visão global da dinâmica da farmácia, das valências multifacetadas e das funções que competem a um farmacêutico comunitário.

No que toca às funções de *back office*, estas consistiram em:

- Conferência do receituário: foi útil para me familiarizar com todos os regimes de comparticipação e para me alertar para eventuais não conformidades nas receitas prescritas que inviabilizam o pagamento das comparticipações pelas entidades competentes à farmácia;
- Realização, receção e conferência de encomendas, bem como gestão de *stocks* e de devoluções: são tarefas que exigem atenção e rigor. Todos os detalhes são importantes, desde

o estado das embalagens, aos preços ou ao cálculo das margens de lucro. De um modo geral, ajudou-me a entender a escala diária de entrega das encomendas por todos os fornecedores (i.e., até que horas pode ser feita uma encomenda e quanto tempo demora a chegar), conhecê-los e contatá-los, quando assim era necessário. Ao mesmo tempo, sendo o meu primeiro contato com os medicamentos e produtos farmacêuticos, auxiliou o processo de associação dos nomes comerciais às substâncias ativas e de que forma os laboratórios se posicionam em termos de acondicionamento;

– Armazenamento e reposição de produtos, incluindo a organização de lineares e gôndolas: foi indispensável para compreender a organização espacial da farmácia, facilitando a minha adaptação ao espaço e reduzindo o tempo de espera do utente, quando solicitava um produto que não se encontrava no *robot*.

Além disto, auxiliiei o planeamento de campanhas promocionais e de ações de promoção para a saúde, com vista à dinamização da farmácia. Saliento, por exemplo, o dia das mães e bebés em que, além das várias promoções em produtos de puericultura, havia a oferta, sem obrigatoriedade de compra de produtos, de 5 minutos de uma ecografia 3D/4D realizada pela empresa BEBÉ4D. Como facilitam a aproximação do utente à farmácia, estas ações possibilitaram pôr em prática as técnicas de abordagem ao cliente, proporcionando-me uma maior confiança e segurança para futuros atendimentos.

Todas as funções de *back office* que desempenhei permitiram compreender como é, na realidade, administrada uma farmácia de grandes dimensões, o que complementou a minha formação relativamente às unidades curriculares de Organização e Gestão Farmacêutica e Marketing Farmacêutico. Por outro lado, acredito que, agilizaram o meu desenvolvimento durante o atendimento, na medida em que, já tendo noção da disposição e da disponibilidade dos produtos, prontamente os aconselhava, dispensava e/ou encomendava, quando assim era necessário e possível. Esta desenvoltura ao balcão só é praticável se estivermos a par de tudo o que passa fora da vista dos utentes.

Relativamente às funções que envolvem o contato direto com os utentes, estas consistiram na dispensa de medicamentos mediante prescrição médica, na intervenção e no aconselhamento de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) ou de produtos farmacêuticos, na preparação de medicamentos manipulados, na determinação de parâmetros bioquímicos, tais como a glicémia e o colesterol total, e a avaliação da pressão arterial. Em todas estas situações, procurei adaptar o atendimento ao tipo de utente, esclarecendo sempre as dúvidas que surgiam ou poderiam surgir e intervindo sempre que considere pertinente.

O contato diário com esta multiplicidade de atividades, aliado à confiança e ao sentido de responsabilidade inculcados em mim pela equipa, tornaram-me uma futura profissional (e, sobretudo, pessoa) mais competente, autónoma e preparada para ingressar no mercado de trabalho.

2.1.2) Preparação de manipulados

Face à massiva industrialização da produção de medicamentos, a preparação de medicamentos manipulados em FC tornou-se uma realidade cada vez menos frequente. Todavia, esta prática é imprescindível em áreas como a pediatria, geriatria, oncologia ou dermatologia, para situações de indisponibilidade e/ou inexistência de formulações no mercado ou de ajuste de dose.

Diariamente, a FSJ recebe pedidos para a preparação de manipulados, inclusive de outras farmácias, mantendo, por isso, uma produção regular. Para dar resposta a toda esta procura, a farmácia dispõe de um *software* – *SoftGaleno*[®] – que auxilia a gestão dos clientes e dos fornecedores, do *stock* das matérias-primas, dos pedidos e dos preços das preparações.

Durante o período de estágio, assisti e auxiliei todo o processo de preparação – preparar, acondicionar e rotular o medicamento e preencher a ficha de preparação – de vários manipulados. Dos manipulados preparados, destaco a preparação de cápsulas de perclorato de potássio 450 mg (Anexo I), de papéis medicamentosos de ciprofloxacina 350 mg e de pomada de enxofre precipitado a 12%.

Portanto, esta experiência permitiu que desempenhasse um papel ativo e proporcionou a aplicação, em contexto profissional, dos conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica.

2.1.3) Integração de conhecimentos no aconselhamento farmacêutico

O domínio da arte do atendimento requer habilidade e, principalmente, dedicação. De facto, sem uma prática permanente e atualização contínua, não há como prestar um serviço de qualidade.

Considero, por isso, que o atendimento foi, sem dúvida, a função que me permitiu aplicar todos os conhecimentos teóricos e, assim, desempenhar, na prática, o sentido verdadeiro da profissão.

Assim, apresento dois casos práticos que exemplificam situações que experienciei durante o estágio:

1) Utente com 25 anos, sexo masculino, queixa-se que, desde há dois ou três dias, sente dor de garganta e tem o nariz muito entupido. Refere também que tem feito lavagens nasais com água do mar hipertónica, mas não tem sentido muitas melhorias.

Com o objetivo de despistar a etiologia da dor de garganta, questionei se sentia dor ao engolir ou se apenas era desconforto, e se já tinha tido febre ou algum problema respiratório, ao que este referiu que não.

Perante a sintomatologia, aconselhei a toma de pastilhas Strepfen[®], alertando para a toma máxima diária de 5 pastilhas. Devido às propriedades analgésicas e anti-inflamatórias locais do seu princípio ativo (flurbiprofeno), as pastilhas aliviam a dor e reduzem a inflamação da garganta⁵.

Tendo em consideração que o utente não apresentava nenhuma contraindicação, sugeri a utilização de Nasex[®], descongestionante nasal tópico de ação longa (oximetazolina) sob a forma de nebulizador, para um alívio mais rápido da congestão. Recomendiei 1 a 2 pulverizações em cada narina, duas vezes ao dia, num período máximo de 3 dias consecutivos, a fim de evitar efeito *rebound*⁶.

Para finalizar, expliquei a importância de aumentar a ingestão de líquidos (especialmente, de bebidas quentes) e de manter a lavagem nasal com água do mar, para o alívio de ambos os sintomas.

2) Utente com 40 anos, sexo feminino, está com diarreia desde a tarde do dia anterior e solicita uma caixa de Imodium Rapid[®] 2 mg, pois está sem condições de ir trabalhar. Embora não tenha vomitado, queixa-se de mal-estar e dores abdominais.

Atendendo ao que me reportou, a fim de identificar a causa da situação, questiono se alterou algum hábito alimentar ou medicamentoso, ao que respondeu que não. Perguntei ainda se teve febre ou se verificou a presença de sangue nas fezes, tendo respondido, novamente que não.

Na maioria dos casos, a diarreia é autolimitada e de origem infecciosa, sendo que a normalidade do trânsito gastrointestinal é restabelecida num curto espaço de tempo. No entanto, como há uma grande perda de fluídos e eletrólitos é muito importante a sua reposição, a fim de prevenir a desidratação e reestabelecer a flora intestinal.

Desta forma, comecei por recomendar a toma de Dioralyte[®] (uma saqueta após cada dejeção) para a reposição de fluídos e eletrólitos e a toma de ArKoBiotics[®] SUPRAFLOR (uma cápsula por dia, a qualquer refeição até ao fim da embalagem), um suplemento alimentar à base de fermentos lácteos, que auxilia a reposição da flora intestinal^{7,8}. Além disso, como a utente

não apresentava sinais de febre, dispensei o Imodium Rapid® 2 mg (dose inicial de dois comprimidos, seguida de um comprimido após cada dejeção) que me havia solicitado, alertando que o tratamento deve ser interrompido assim que a o trânsito intestinal normalizar⁹.

Por fim, expliquei a importância de aumentar a ingestão de líquidos e de ter uma alimentação cuidada, evitando produtos lácteos e alimentos muito condimentados ou gordurosos. Alertei ainda que, caso os sintomas continuassem ou piorassem nas 48h seguintes, era aconselhado consultar um médico.

2.1.4) Dermofarmácia e cosmética

A área de dermofarmácia e cosmética é um mundo de possibilidades, no qual a FSJ sobressai. Esta dispõe de um amplo espaço dedicado a esta área e de profissionais especializados – membros da equipa e conselheiras das marcas – que primam pelo aconselhamento exemplar.

A pluralidade do leque de escolha disponível na farmácia espelha a amplitude da público-alvo, procurando corresponder às necessidades e preferências dos utentes.

Enquanto estagiária, houve inúmeras situações em que prestei aconselhamento, tanto de cuidados capilares, como cuidados de pele. Em todos os casos, fui sempre apoiada pelos membros da equipa, o que me permitia indicar o tratamento e/ou produto mais adequado à situação e atender, assim, o utente com mais segurança.

Deste modo, considero que a aquisição de novos conhecimentos na área da dermofarmácia e cosmética, complementou a formação teórica obtida durante o curso, que acredito não se adequar à prática profissional.

2.2) Pontos Fracos

2.2.1) Inexperiência em aconselhamento e em técnicas de abordagens ao cliente

Embora o conhecimento teórico seja fundamental, a vertente comercial envolvida no contexto da FC exige que, os farmacêuticos também sejam dotados de competências sociais, comportamentais e de comunicação.

Na FSJ, o primeiro contato com o atendimento é observacional, o que permite compreender como devemos abordar cada cliente, bem como o quão importante são a escuta ativa e a linguagem corporal de ambas as partes naquele momento. Além disso, a equipa procura salientar quais as perguntas adequadas a fazer e demonstrar a aplicabilidade de algumas

técnicas de venda – *up-selling* e *cross-selling* – que visam aumentar a rentabilidade e a rotatividade dos produtos. Neste sentido, em determinadas situações, a equipa confronta-nos com casos fictícios para que criemos metodologias de atuação e identifiquemos qual o aconselhamento a prestar ou como devemos intervir. Progressivamente, passamos a ter um maior grau de autonomia e o próprio processo de atendimento torna-se mais natural.

Contudo, considero que a inexperiência em aconselhar, sobretudo, MNSRM e em técnicas de abordagens ao cliente constituíram a minha principal limitação durante o estágio.

Tal como se verifica na unidade curricular de Intervenção Farmacêutica nos Autocuidados de Saúde e Fitoterapia, na qual são abordados casos práticos e é feita a simulação do aconselhamento e da intervenção, esta mesma componente prática poderia ser alargada a outras unidades curriculares, como Farmácia Clínica, Farmacoterapia e Farmacologia I e II.

Esta simulação em contexto de aula permite uma maior aplicabilidade dos conhecimentos teóricos, adequando-os à prática clínica profissional. Acredito que potencializaria, a todos os níveis, o aproveitamento do estágio.

2.2.2) Dificuldade em associar o nome comercial à nomenclatura DCI

Segundo o Decreto-Lei n.º 11/2012 de 8 de Março, a prescrição dos medicamentos é, obrigatoriamente, realizada por Denominação Comum Internacional (DCI) da substância ativa (salvo exceções), conferindo ao utente poder de escolha entre um medicamento genérico ou um de marca¹⁰.

Esta alteração de legislação, especialmente, para um estagiário, facilita a identificação da indicação terapêutica do medicamento, dado estar mais familiarizado com as substâncias ativas do que com os nomes comerciais, que pouco são abordados ao longo da formação académica.

Todavia, frequentemente, as exceções à prescrição por DCI são aplicadas e é prescrito o medicamento de marca. Além da diversidade de genéricos existentes na farmácia, há substâncias ativas ou associações de substâncias ativas – como a Metformina + Sitagliptina – que apresentam várias designações comerciais (Efficib, Janumet, Velmetea ou Ristfor)¹¹⁻¹⁴. Numa fase inicial, estes fatores dificultam a associação das marcas às respetivas substâncias ativas, criando um dos principais obstáculos para a fluidez do atendimento.

No entanto, esta dificuldade foi sendo ultrapassada com a experiência adquirida ao balcão e em tarefas de *back office*, como a reposição de produtos no *robot* ou conferência de encomendas.

2.3) Oportunidades

2.3.1) Heterogeneidade de utentes e situações clínicas

A FSJ está localizada numa zona estrategicamente privilegiada de Celas: a Avenida Calouste Gulbenkian. Além de ser uma área caracterizada pela elevada densidade residencial e comercial, possibilita a proximidade com variadas redes de prestação de cuidados de saúde públicas (p. ex. Hospitais da Universidade de Coimbra e Unidade de Saúde Familiar de Celas) e privadas (p. ex. clínicas dentárias e consultórios de especialidades médicas).

Este aspeto contribui, não só para a elevada afluência de utentes, como para a diversificação da faixa etária, do grau de literacia, da classe socioeconómica e cultural e, o mais interessante no meu ponto de vista, da situação clínica e, conseqüentemente, do tipo de produtos procurados.

Deste modo, o atendimento tornou-se uma experiência desafiante. Diariamente, lidava com uma disparidade de cenários, incluindo a dispensa de medicação crónica a utentes habituais, a cedência e/ou manipulação de terapêutica para reprodução medicamente assistida ou o aconselhamento em afeções menores (como bucodentárias, gastrointestinais ou dermatológicas) a todo o público.

Todos estes fatores exigiram o alargamento dos meus conhecimentos em diversas áreas e o desenvolvimento de *soft skills*, o que proporcionou uma relação farmacêutico-utente moldável e cada vez mais personalizada e adaptada a cada situação.

2.3.2) Extensão e multiplicidade do leque de produtos

Tendo em consideração a elevada afluência e heterogeneidade de público a frequentar a FSJ, é fulcral procurar responder às necessidades, às expectativas e, principalmente, aos desejos dos clientes. Posto isto, uma boa organização e eficiente gestão, não só de *stocks*, como da multiplicidade do leque de produtos, são um dos pontos-chave para o sucesso conquistado da farmácia.

Além da diversidade de medicamentos – de marca e genéricos – de diferentes laboratórios, acresce uma vastidão de produtos, nomeadamente, medicamentos e/ou produtos veterinários, homeopáticos, naturais, de alimentação especial, fitofarmacêuticos, cosméticos e de higiene corporal, suplementos alimentares, dispositivos médicos, artigos de puericultura e produtos de conforto e ortopédicos.

Ainda que o desconhecimento inicial de alguns dos produtos existentes, da indicação clínica associada ou até do seu local de armazenamento fosse assoberbante, o contato diário com uma extensão tão grande de produtos foi contrariando essa sensação e tornou-se

estimulante compreender mais sobre os produtos, particularmente, sobre os quais ainda não tinha tido contato, como é caso dos destinados à puericultura. Esta foi, de facto, uma das grandes mais-valias de estagiar na FSJ.

2.3.3) Formações internas e externas

Dada a magnitude do mercado farmacêutico e a constante evolução inerente à área da saúde, o farmacêutico deve procurar manter-se em permanente atualização, acompanhando o crescimento da indústria farmacêutica. Desta forma, estará mais apto a prestar um melhor serviço.

Durante o estágio em FC, assisti a inúmeras formações em diferentes áreas (p. ex. cosmética, suplementação, higiene íntima e saúde ocular), das quais distingo a formação promovida pela Bausch+Lomb relativa ao diagnóstico e tratamento do olho seco e alergia ocular e a formação promovida pela multinacional Bayer relativa ao diagnóstico e tratamento de infeções vaginais, que permitiram colmatar algumas falhas da minha formação académica.

Estas formações foram, essencialmente, organizadas pelos laboratórios farmacêuticos, sendo tanto apresentadas na farmácia por delegados de informação médica, em período laboral, como apresentadas em ambientes externos por médicos, por delegados de informação médica ou outros representantes das marcas, em período pós-laboral.

Além de informarem a respeito de produtos e gamas já existentes no mercado, as formações possibilitam o conhecimento de novidades, de reformulações ou de fins de linha de produtos e de técnicas de venda. Proporcionam ainda um espaço importante para a troca de impressões entre os vários profissionais envolvidos, contribuindo, assim, para a constante melhoria dos produtos e do aconselhamento, o que no final se traduz num maior benefício para o utente.

Assim, considero que o acesso às formações facilitou a familiarização com os medicamentos e produtos farmacêuticos, bem como com as indicações clínicas e recomendações associadas, alargando a minha base de conhecimentos e, refletindo-se, principalmente, no aconselhamento prestado ao utente.

2.4) Ameaças

2.4.1) Desvalorização do medicamento e do farmacêutico

Com a promulgação do Decreto-Lei n.º238/2007 de 19 de Junho, foi autorizada a venda de MNSRM fora dos locais da farmácia e, o mais preocupante, é o serviço ser prestado por profissionais sem formação adequada.

Desconsiderando o óbvio impacto económico que se traduz para as farmácias – devido à vantagem competitiva criada pelos baixos preços praticados, esta situação, aliada à facilidade de acesso aos meios de comunicação, promove a automedicação irresponsável e o uso irracional do medicamento. Contribui ainda para a geração de informações contraditórias e, muitas vezes, pouco fidedignas acerca dos medicamentos, o que fomenta a descredibilização por parte dos utentes em relação às indicações fornecidas na FC.

Em determinadas situações, durante o atendimento, era evidente a banalização do uso dos medicamentos, tanto para com MNSRM, como para com Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM). Aliás, diariamente, fui confrontada com pedidos de dispensa de MSRM – antibióticos e antidepressivos – sem a apresentação de prescrição. Nem sempre havia sinais de qualquer indicação médica. Embora a equipa técnica me tenha alertado para o modo de atuação nestes casos, os utentes demonstravam alguma relutância e insatisfação perante a minha recusa em ceder o medicamento.

Sendo esta uma forte ameaça à saúde pública, ao medicamento e aos farmacêuticos, é imperativo que, enquanto profissionais de saúde, os farmacêuticos procurem contrariar a falta de importância dada à toma de medicamentos e se diferenciem pela qualidade e pela clareza do aconselhamento e atendimento prestados, zelando pelos utentes e pela profissão.

2.4.2) Ruturas de stock e alterações de preços e participações

Enquanto estrutura empresarial, um dos principais pontos-chave para o sucesso de uma farmácia prende-se com uma eficiente gestão de stocks.

A diversidade e a constante inovação do mercado farmacêutico aliadas à variação das prescrições, obrigam a um aprovisionamento racional. Este deve garantir a disponibilidade de qualquer artigo a todo o momento (prevendo possíveis ruturas de stock) e evitar quebras.

Neste sentido, a FSJ procura manter uma excelente relação com os laboratórios e com todos os distribuidores, o que lhe permite, em determinadas situações, encomendar diretamente produtos que já estão esgotados ao nível de alguns distribuidores. Contudo, quando essa situação é inviável, a maioria dos utentes não compreende que, a falta de certos medicamentos não é da responsabilidade da farmácia, o que cria desconfiança no trabalho executado por nós.

É, também, essencial mencionar que, as alterações de preços e de participações dos medicamentos, fragilizam a relação farmacêutico-utente. Como as receitas eletrónicas informam sobre os encargos para o utente, quando há um aumento de preço ou uma diminuição da percentagem de participação e os encargos reais divergem dos indicados

na receita, o utente interpreta essa alteração, mais uma vez, como da responsabilidade da farmácia, em prol do benefício próprio.

Todos estes fatores descentralizam o atendimento e interferem na interação com o utente, situação que experienciei durante o estágio com alguma frequência. O diálogo é dificultado e confiança comprometida, o que revela a forte ameaça que as ruturas de stock e alterações de preços e comparticipações constituem para a profissão farmacêutica.

2.4.3) Credibilidade do estagiário

Embora haja uma grande heterogeneidade de clientes a frequentar a FSJ, uma elevada percentagem corresponde a utentes fidelizados. Contrariamente a outros clientes, estes têm estabelecido um elo de confiança e de ligação com a equipa técnica da farmácia, pelo que é natural preferirem ser atendidos por um colaborador que já lhes seja familiar.

Por consequência, muitos utentes demonstravam uma certa resistência em serem atendidos por mim. Em alguns, era notória a desconfiança na qualidade do serviço que lhes era capaz de prestar, pelo que solicitavam outro colega. Ainda que estas situações se tenham tornado menos frequentes com o decorrer do estágio, interferem não só com a autoconfiança e autonomia de qualquer estagiário, como reduzem as oportunidades de aprendizagem.

• CONCLUSÃO •

Toda a experiência que vivenciei na FSJ transformou a minha visão da FC, tendo superado, a todos os níveis, as minhas expectativas e os meus estigmas.

Embora o foco da área farmacêutica seja o medicamento, constatei que o farmacêutico comunitário desempenha um papel muito mais abrangente. Cada vez mais, o centro é o utente, sendo, por isso, fundamental criar uma relação farmacêutico-utente moldável, personalizada e adaptada a cada situação.

Durante este período, o meu principal receio era não ser capaz de esclarecer corretamente as questões colocadas ou de transmitir informações que colocassem o bem-estar e a saúde do utente em risco. Ainda que esta preocupação persista, os desafios que enfrentei permitiram que gradualmente encarasse as situações com mais segurança e lidasse com mais tranquilidade.

O constante acompanhamento por parte da equipa, a interação com os utentes e a diversidade de produtos e serviços disponíveis, foram essenciais para o meu crescimento tanto a nível profissional, como pessoal. Ao mesmo tempo, considero que a vasta formação académica que o plano curricular nos proporciona foi determinante para o êxito desta etapa final.

Enquanto futura farmacêutica, acredito (e anseio), mesmo que utopicamente, pelo reconhecimento absoluto do valor da profissão e pela contínua ampliação das nossas funções e serviços perante a sociedade.

• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS •

1. Ordem dos Farmacêuticos – **Boas Práticas de Farmácia Comunitária: Norma geral sobre as infraestruturas e equipamentos.** (2015). [Acedido a 25 de abril de 2018]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_geral_sobre_as_infraestruturas_e_equipamentos_20240917255ab147e12498f.pdf
2. Ordem dos Farmacêuticos – **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos.** [Acedido a 5 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc10740.pdf.
3. Ordem dos Farmacêuticos – **Boas Práticas de Farmácia Comunitária: Norma geral sobre o farmacêutico e pessoal de apoio.** (2015). [Acedido a 25 de abril de 2018]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_geral_sobre_as_infraestruturas_e_equipamentos_20240917255ab147e12498f.pdf
4. IAPMEI – **A análise SWOT.** (2016) [Acedido a 10 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <http://iapmei.innovagencyhost.com/getattachment/PRODUTOS-E-SERVICOS/Empreendedorismo-Inovacao/Empreendedorismo/Guias-praticos/A-analise-SWOT.pdf.aspx>
5. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento: Strepfen Laranja sem açúcar 8,75 mg pastilhas.** (2014) [Acedido a 15 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=53219&tipo_doc=rcm
6. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento: Nasex 0,5 mg/ml solução para inalação por nebulização.** (2018) [Acedido a 15 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=53219&tipo_doc=rcm
7. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento: Dioralyte, pó para solução oral.** (2004) [Acedido a 15 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2677&tipo_doc=rcm
8. Arkopharma Laboratoires – **ArkoBiotics® SUPRAFLOR, cápsulas.** (2014) [Acedido a 15 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.arkopharma.com/pt-PT/arkobioticsr-supraflor-capsulas>

9. INFARMED – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento: Imodium Rapid 2 mg comprimido orodispersível.** (2016) [Acedido a 15 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=rcm

10. Diário da República – **Decreto-Lei n.º 11/2012 de 8 de Março.** Lisboa. (2012). [Acedido a 7 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/file/a/542306>

11. European Medicines Agency – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento: Efficib 50 mg/850 mg comprimidos revestidos por película.** EMA. (2018) [Acedido a 20 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000896/WC500021374.pdf

12. European Medicines Agency – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento: Janumet 50 mg/850 mg comprimidos revestidos por película.** EMA. (2018) [Acedido a 20 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000861/WC500038805.pdf


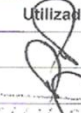

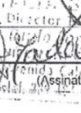
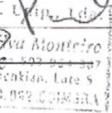

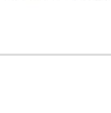
13. European Medicines Agency – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento: Velmetia 50 mg/850 mg comprimidos revestidos por película.** EMA. (2018) [Acedido a 20 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000862/WC500048250.pdf

14. European Medicines Agency – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento: Ristfor 50 mg/850 mg comprimidos revestidos por película.** EMA. (2018) [Acedido a 20 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR-Product_Information/human/001235/WC500080003.pdf

15. Diário da República – **Decreto-Lei n.º 238/2007 de 19 de Junho.** Lisboa. (2007). [Acedido a 11 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/file/a/639189>

• ANEXOS •

Anexo I: Exemplo de uma Ficha de Preparação de Medicamento Manipulado da Farmácia São José. Este documento representa a ficha de preparação de cápsulas de perclorato de potássio 450 mg que são utilizadas como meio de contraste em determinados exames.

FARMÁCIA S. JOSÉ		Ficha de Preparação do Manipulado												
		Cápsulas de Perclorato de Potássio 450mg												
Cliente:	IPO	Forma Farmacêutica:		CAPSULA		Prazo Validade:		02/07/2018						
Data de Preparação:	03/01/2018	Nº Lote:		3.I.18		Registo Copiador:		1.499						
Condições de Conservação:		Em local seco e fresco.												
Posologia:														
Qtd. Total Medicamento:		1 X 100,00 uni												
Director Técnico:		Dr. Paulo Monteiro												
Operador:		Dra. Andreia Madanelo												
Médico:														
Honorários:		4,92 €		Valor Net:		37,56 €		<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Valor PVP</th> </tr> <tr> <td>Valor IVA:</td> <td>2,25 €</td> </tr> <tr> <td>Valor Total:</td> <td>39,81 €</td> </tr> </table>	Valor PVP		Valor IVA:	2,25 €	Valor Total:	39,81 €
Valor PVP														
Valor IVA:	2,25 €													
Valor Total:	39,81 €													
Factor Multiplicativo:		*5,00		Valor IVA:		2,25 €								
				Valor Total:		39,81 €								
Matérias Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid	Preço Aq. s/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima						
Lactose		161771-N-	Acofarma	30,00	g	0,03 €	1,90	1,60 €						
(IPO) Perclorato de Potássio		00009553	Panreac	45,00	g	0,00 €	1,90	0,00 €						
							Subtotal	1,60 €						
Preparação														
Verificar o estado de limpeza e conservação do material e laboratório.														
Pesar 45 g de perclorato de potássio.														
Pesar 30g de lactose.														
Pulverizar os pós separadamente e misturar por diluição geométrica.														
Proceder ao encapsulamento.														
Acondicionar e rotular.														
Limpar e arrumar o laboratório.														
Aparelhagem														
Encapsulador Capsunorm 2000														
Balança electrónica														
Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac	Qtd	Preço	Fact. Mult.	Valor Net						
Cápsulas nº0	EMBAL		Acofarma	0,68 mL	++++	0,02 €	1,20	1,92 €						
Frasco de Vidro 150 mL	EMBAL		Plural	150 mL	1,00	0,64 €	1,20	0,77 €						
							Subtot	2,69 €						
Ensaio	Especificação	Conforme	Utilizador	Assinatura										
Cor	Cápsulas brancas	<input checked="" type="checkbox"/>												
Odor	Inodoro	<input checked="" type="checkbox"/>												
Quantidade	100 cápsulas	<input checked="" type="checkbox"/>												
		3.I.18												
		(Data)												

• Capítulo II •

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar



• LISTA DE ABREVIATURAS •

FH	Farmácia Hospitalar
IPOPFG, E.P.E.	Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, Entidade Pública Empresarial
TSDT	Técnico(s) Superior(es) de Diagnóstico e Terapêutica
SF	Serviços Farmacêuticos
SWOT	Pontos Fortes, Ponto Fracos, Oportunidades e Ameaças, do inglês <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>
UCQ	Unidade Centralizada de Quimioterapia
UEC	Unidade de Ensaio Clínicos
UPE	Unidade de Preparação de Medicamentos Estéreis
UPN	Unidade de Preparação de Medicamentos Não Estéreis

• INTRODUÇÃO •

A Farmácia Hospitalar (FH) é uma área integrada numa rede de cuidados multidisciplinar, cuja responsabilidade consiste em garantir a segurança, eficácia e qualidade do medicamento e, conseqüentemente, do seu circuito, assegurando, assim, a terapêutica de todos os doentes.

Além disso, compete-lhe não só a gestão dos medicamentos e de outros produtos farmacêuticos, como também a promoção de ações de investigação científica e de formação^{1,2}.

Para além do estágio obrigatório na área de Farmácia Comunitária, a possibilidade de realizar estágios em outras áreas, como a FH, amplia o nosso contato com o mercado de trabalho, complementando, de uma forma mais prática, as bases adquiridas ao longo do percurso académico.

Neste sentido, nos meses de fevereiro a abril de 2018, realizei um estágio curricular em FH, nos Serviços Farmacêuticos (SF) do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, Entidade Pública Empresarial (IPOPFG, E.P.E.), sob a orientação da Dr.^a Florbela Braga.

Optei por realizar o estágio nesta instituição, a fim de não só experienciar a realidade hospitalar, mas também expandir os meus horizontes na área da oncologia. Por se tratar de uma área que constitui um grande desafio para a ciência e para os doentes, considero que me irá proporcionar um enriquecimento a nível profissional e, principalmente, pessoal.

Posto isto, o presente relatório consiste numa análise crítica não só ao estágio realizado nos SF do IPOPFG, E.P.E., mas também à posição, atual e futura, da FH e do papel do farmacêutico hospitalar. Esta análise é apresentada segundo o modelo SWOT – acrónimo inglês de **S**trengths, **W**eaknesses, **O**pportunities and **T**hreats, na qual pretendo identificar e analisar alguns dos aspetos positivos e negativos, bem como oportunidades e ameaças que tornaram toda a experiência mais completa³.

I) IPO-PORTO

O IPOFG, E.P.E. foi inaugurado em 1974, representando desde então, uma instituição de saúde de excelência no âmbito da formação e do ensino, do tratamento e da investigação do cancro.

Este hospital dispõe de 11 clínicas e 26 serviços que se dedicam ao doente oncológico, sendo que estes serviços se encontram agrupados em Consulta Externa (Programadas e Urgentes), Hospital de Dia, Cirurgia de Ambulatório, Internamento, Cuidados Paliativos, Serviços Domiciliários e Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica.

Além disso, a instituição contempla:

- Um centro de investigação que procura compreender os mecanismos biopatológicos do cancro, possibilitando, assim, a prevenção, o diagnóstico precoce, a correta avaliação do prognóstico e o desenvolvimento de outras terapias mais eficazes;
- Uma escola portuguesa de oncologia que se destina ao ensino e à integração profissional dos seus alunos e profissionais na área da Oncologia, Medicina, Saúde e outras áreas complementares⁴.

I.1) Serviços Farmacêuticos do IPOFG, E.P.E.

Os SF estão localizados no Piso -I do edifício central da instituição, salvo exceção do setor de distribuição de medicamentos em regime de ambulatório, localizado no edifício do Hospital de Dia.

Quanto ao departamento dos SF, este detém autonomia técnico-científica e está integrado numa rede de cuidados multidisciplinar, cujo foco é o doente.

A equipa dos SF é também multidisciplinar, sendo formada por 18 Farmacêuticos, incluindo a Diretora Técnica, 16 Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), 9 Assistentes Operacionais e 3 Administrativos.

Todos estes profissionais envolvidos visam prestar informações e esclarecimentos da área do medicamento aos doentes e a todos os profissionais de saúde alheios aos SF e procuram garantir a segurança, eficácia e qualidade do medicamento e, conseqüentemente, do seu circuito, assegurando, assim, a terapêutica de todos os doentes^{1,2,4}.

2) Análise SWOT

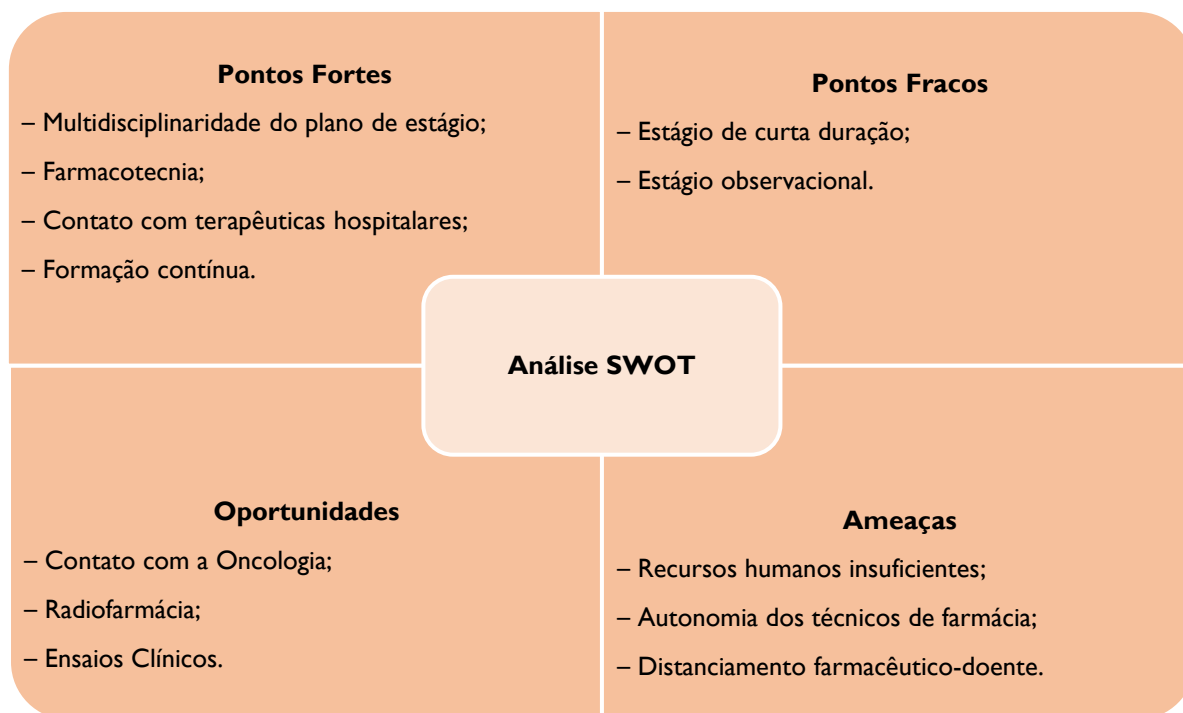


Figura 1: Análise SWOT do estágio em Farmácia Hospitalar. Neste esquema, estão representados os pontos fortes e os pontos fracos, bem como as oportunidades e as ameaças da experiência, em contexto de estágio, nos serviços farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil.

2.1) Pontos Fortes

2.1.1) Multidisciplinaridade do plano de estágio

Nos SF do IPOFG, E.P.E., o estágio é programado e organizado com o intuito de incluir a passagem por todos os setores, possibilitando uma visão global do funcionamento do serviço e, principalmente, do circuito do medicamento.

A cada duas semanas, somos integrados num novo setor, sendo esta a planificação que me foi atribuída:

- Duas semanas nos setores de Distribuição Individualizada Diária em Dose Unitária (DIDDU: representa o circuito do medicamento para a maioria dos serviços clínicos que garante a dispensa individualizada de medicação a cada doente para um período de 24h)^{2,3,5}, Distribuição Tradicional e Distribuição de medicamentos sujeitos a legislação especial (refere-se a um outro circuito especial de medicamentos, nomeadamente, estupefacientes e psicotrópicos e eritropoetinas e hemoderivados, que está integrado na DIDDU e exige o cumprimento de legislação específica)^{2,3,6-11};

- Duas semanas no setor de Distribuição de Medicamento em Regime de Ambulatório e uma manhã em Radiofarmácia, no serviço de Medicina Nuclear;

- Duas semanas na Unidade Centralizada de Quimioterapia (UCQ);

- Duas semanas na Unidade de Preparação de Medicamentos Estéreis (UPE) e na Unidade de Preparação de Medicamentos Não Estéreis (UPNE);
- Dois dias na Unidade de Ensaio Clínicos (UEC).

Esta planificação foi indispensável para compreender a interligação e interdependência entre todos os setores e para aplicar, em contexto profissional, os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de Farmácia Hospitalar e Farmácia Clínica. Acredito que, estes conhecimentos estabeleceram um suporte fundamental para a minha adaptação e integração aos serviços.

2.1.2) Farmacotecnia

Nos SF, este setor encontra-se subdividido em três: UCQ, UPE e UPNE, sendo que cada um possui instalações específicas, garantindo a segurança e o controlo de qualidade das formulações e preparações aí realizadas.

No que diz respeito à UCQ, esta é responsável pela preparação dos tratamentos (adjuvantes, neoadjuvantes e paliativos) de quimioterapia para o internamento, para o hospital de dia adultos e pediatria, para os ensaios clínicos e para outros hospitais (p. ex. Centro Hospitalar do Médio Ave). Nesta unidade, pude observar e auxiliar todo o processo de preparação de quimioterapia (validação das prescrições médicas, preparação de tabuleiros com a medicação a ser manipulada na câmara de fluxo laminar vertical, conferência, rotulagem e embalagem da preparação e transporte até ao respetivo serviço – Anexo I e II). Pude também assistir à parametrização de alguns protocolos de quimioterapia que iam ser utilizados pela primeira vez e visitar inúmeras vezes o hospital de dia adultos com a farmacêutica responsável pela validação das prescrições deste serviço. Estas visitas visam assegurar o cumprimento dos horários dos tratamentos e auxiliar os enfermeiros, caso surjam dúvidas ou irregularidades^{2,3,12}.

Relativamente à UPE, esta é responsável pelas preparações que exigem esterilidade e apirogenicidade, requerendo a utilização de técnicas assépticas. Desta forma, são preparados todos os produtos estéreis, tais como bolsas de nutrição parentérica individualizadas e misturas de analgesia para tratamento de dor aguda administradas em sacos, por via epidural (PCEA – *Patient Control Epidural Analgesia*) ou por bombas infusoras de ritmo constante (DIBs – *Drug Infusion Ballons*), por via endovenosa, subcutânea e epidural. Nesta unidade, foram-me explicados todos os processos envolvidos (validação da prescrição médica, cálculo das quantidades a serem adicionadas de cada componente, emissão de rótulos e fichas de preparação, preparação, embalagem e transporte até ao respetivo serviço) na preparação

dos produtos referidos anteriormente e pude observá-los e auxiliá-los. Além disso, pude observar e acompanhar a preparação, rotulagem e embalagem de colírios de ciclosporina 0,2% e de soluções orais de metotrexato 2 mg/ml que, embora estejam sob a responsabilidade da UPE, são realizadas na UCQ porque requerem a utilização de uma câmara de fluxo laminar vertical – que não existe na UPE – para garantir a esterilidade do produto e a segurança do operador^{2,3,13}.

No que toca à UPNE, esta é responsável por toda a preparação de medicamentos manipulados não estéreis. Nesta unidade, acompanhei e auxiliei a preparação de colutórios desenvolvidos pelo IPO, frequentemente utilizados pelos doentes oncológicos, na prevenção e no tratamento da mucosite oral (Anexo III). Também participei na preparação de outros manipulados, como a suspensão oral de ácido ursodesoxicólico a 50 mg/ml, a partir de cápsulas ou a solução oral de captopril a 1 mg/ml, a partir de comprimidos (Anexo IV). Além disso, visitei o serviço de pediatria com a farmacêutica responsável para que, de forma racional, fosse feito o agendamento semanal das preparações de medicamentos manipulados. Paralelamente à visita ao serviço, o ambulatório partilha um documento *excel* com a UPNE com o agendamento da preparação de medicamentos manipulados, consoante a necessidade dos doentes. Desta forma, a unidade organiza-se para realizar as preparações, em função das estabilidades e dos prazos de validade das mesmas, garantido uma terapêutica contínua, sem interrupções a todos os doentes^{2,3,14}.

De um modo geral, a minha experiência no setor de Farmacotecnia foi surpreendente. Não só pude compreender a dinâmica de funcionamento do setor, como ampliei os meus conhecimentos na área da oncologia e consolidei tantos outros na área da nutrição parentérica, farmácia galénica e tecnologia farmacêutica.

2.1.3) Contato com terapêuticas hospitalares

Embora uma parte dos medicamentos e produtos farmacêuticos dispensados em Farmácia Comunitária estejam presentes no contexto hospitalar, há um grande número de medicamentos e terapêuticas que são de uso exclusivo hospitalar, com os quais ainda não tinha contactado.

Durante o estágio nos SF, em todos os setores, houve medicamentos ou terapêuticas que desconhecia. Esta realidade foi muito frequente nos seguintes setores:

– DIDDU: aquando da validação das prescrições dos doentes internados, pude contactar com todos os medicamentos e terapêuticas utilizadas no hospital, o que permitiu que

correlacionasse os medicamentos com as patologias e com a situação em que o doente se encontra (p. ex. pré ou pós-operatório);

– Distribuição de medicamentos sujeitos a legislação especial (psicotrópicos e estupefacientes; eritropoetinas e hemoderivados): Relativamente aos psicotrópicos e estupefacientes, devido às suas características, encontram-se armazenados num cofre, sendo que a sua distribuição exige uma requisição especial que permita o seu controlo rigoroso. Neste setor, pude colaborar na validação das requisições, registar o movimento diário destes medicamentos e dispensá-los. Estas tarefas permitiram que me familiarizasse com os fármacos (p. ex. morfina, naloxona ou petidina), as indicações clínicas e os mecanismos de ação associados^{2,3,6-8}. Quanto aos hemoderivados, por serem derivados do plasma humano, possuem um risco biológico associado, sendo, por isso, necessário um circuito de distribuição especial que visa assegurar a sua rastreabilidade. Neste setor, pude colaborar no processo de dispensa dos hemoderivados, o que possibilitou um contato mais direto com estes medicamentos (p. ex. albumina, cola de fibrina ou imunoglobulinas) e com as indicações clínicas associadas^{2,3,9,10}. No que diz respeito às eritropoetinas, como constituem medicamentos biológicos, é exigido, mais uma vez, um circuito especial de distribuição exclusivamente hospitalar. Neste setor, pude colaborar no registo diário e mensal dos movimentos destes medicamentos e dispensá-los, o que me permitiu familiarizar com os diferentes tipos e dosagens de eritropoetina^{2,3,11};

– Distribuição de Medicamento em Regime de Ambulatório: devido ao alargado formulário de ambulatório que inclui vários grupos farmacoterapêuticos, como por exemplo, antineoplásicos (hormonoterapia, quimioterapia convencional e terapêutica-alvo), fatores de crescimento e imunomoduladores, a dispensa destes medicamentos aos doentes exigia que dominasse o seu aconselhamento e que soubesse as indicações terapêuticas, os esquemas posológicos ou os efeitos adversos associados^{2,3,15};

– UCQ: o contato direto com os antineoplásicos e com os protocolos de quimioterapia possibilitou ampliar os meus conhecimentos em relação à classificação dos diferentes tipos de antineoplásicos, às indicações terapêuticas e aos mecanismos de ação respetivos e às condições de estabilidade e conservação de cada fármaco.

Este contato diário com medicamentos e terapêuticas de contexto hospitalar foi muito enriquecedor, na medida em que não só complementou a minha formação teórica, como também permitiu que estivesse a par de novas terapêuticas.

2.1.4) Formação contínua

A contínua evolução científica e tecnológica na área da saúde visa a descoberta e o aperfeiçoamento de meios de diagnóstico e de terapêutica. Neste sentido, todo o profissional de saúde, especialmente a nível hospitalar, deve procurar manter-se em permanente atualização para prestar um melhor serviço ao doente.

Na sua globalidade, a experiência no IPOPFG, E.P.E. foi uma aprendizagem constante: a cada mudança de setor, foi-me fornecido o respetivo manual de procedimentos, a fim de me instruir sobre as normas de funcionamento, as tarefas a serem desempenhadas e as legislações em vigor. Esta instrução prévia facilitava a compreensão das explicações que a equipa transmitia, enquanto os observava e auxiliava.

Além disso, diariamente, em determinados setores, como a UCQ, UPE e UPNE, foram solicitados pequenos trabalhos de pesquisa, dos quais, saliento um trabalho referente a medidas a realizar em caso de extravasão, consoante o tipo de citotóxico injetável por via intravenosa e os antídotos disponíveis. Estes trabalhos, aliados ao facto de ser constantemente incentivada a pesquisar e a procurar mais informação, permitiram alargar os meus conhecimentos no âmbito hospitalar e fomentar o meu espírito crítico perante as dúvidas que surgiam e os desafios que eram propostos.

2.2) Pontos Fracos

2.2.1) Estágio de curta duração

Embora a possibilidade de realizar um outro estágio curricular – além do obrigatório na área de Farmácia Comunitária – seja uma mais-valia, a duração que lhe é atribuída (dois meses) impossibilita a completa e sólida preparação do estagiário para a realidade profissional, representando, simultaneamente, um ponto fraco e uma ameaça.

Como a cada duas semanas me foi apresentado um novo setor, após o período de adaptação ao serviço e à equipa, o tempo que restou para contribuir e retribuir foi insuficiente. Num tão curto espaço de tempo, torna-se complicado haver uma aprendizagem gradual e uma absoluta assimilação dos conhecimentos (que, muitas vezes, são totalmente novos), bem como adquirir um grau de autonomia que permita executar tarefas de forma independente.

Ainda que a passagem por todos os setores seja um ponto forte, a cada troca de setor, há uma interrupção na minha formação. Há setores, tais como a DDDU, que carecem de uma maior permanência para que todas as suas potencialidades sejam exploradas.

Tendo em consideração a minha experiência, acredito que seria vantajoso, a todos os níveis, prolongar o período de estágio.

2.2.2.) Estágio observacional

Para um profissional usufruir de uma formação global, deve haver uma dimensão teórica e uma dimensão prática. No entanto, a nível hospitalar, a dimensão prática é quase inexistente, sendo o estágio, principalmente, de carácter observacional.

A curta duração do estágio, a sobrecarga de trabalho dos profissionais e a responsabilidade subjacente às tarefas a executar são um obstáculo à dimensão prática desta experiência.

Do pequeno número de tarefas que pude realizar autonomamente ou sem necessidade de supervisão constante, destaco, por exemplo, a contagem semanal do *stock* do cofre onde estão armazenados os psicotrópicos e estupefacientes ou a rotulagem e embalamento de preparações de quimioterapia. São exemplos de tarefas repetitivas e morosas que, sempre que as realizava, eram reconhecidas e valorizadas pelos farmacêuticos, visto que permitiam que dedicassem o seu escasso tempo útil a outras atividades que requeriam mais responsabilidade e competência.

Contudo, para uma maior evolução das minhas aptidões profissionais, teria sido enriquecedor não só observar, como auxiliar e executar um maior número de tarefas.

2.3) Oportunidades

2.3.1) Contato com a Oncologia

O IPOFG, E.P.E. representa uma instituição de saúde de excelência no âmbito da formação e do ensino, do tratamento e da investigação do cancro.

Neste sentido, considero que o estágio nos SF desta instituição não me possibilitou apenas uma visão da realidade da prática farmacêutica em âmbito hospitalar, como também me proporcionou o primeiro contato com a área oncológica.

A nível profissional, esta experiência foi determinante para me consciencializar e demonstrar a importância do papel do farmacêutico hospitalar no diagnóstico, no tratamento e no acompanhamento do doente oncológico. Ao mesmo tempo, a nível pessoal, confesso que foi um desafio. Não é fácil absorver todas as informações, explicações e conhecimentos que nos são transmitidos e, muito menos, gerir emoções.

De qualquer forma, sinto que este estágio foi, sem dúvida, uma experiência única de aprendizagem a todos os níveis, mas sobretudo, pessoal.

2.3.2) Radiofarmácia

Este setor, apesar de constituir um SF, pertence e está localizado (por questões de radioproteção) no serviço de Medicina Nuclear.

É uma área recente e ainda pouco explorada da Farmácia Hospitalar, na qual há apenas uma farmacêutica especializada no IPOPFG, E.P.E., que é responsável pela manipulação, pela dispensa sob a forma de doses individualizadas, pelo controlo de qualidade e pela gestão dos produtos radiofarmacêuticos e dos “kits frios”, garantindo a sua efetividade e segurança.

O radiofármaco é constituído por um sistema químico (responsável pela sua distribuição num órgão ou tecido específico) e por um radionuclídeo (que emite radiação, permitindo a visualização ou destruição seletiva de tecidos). Este último, de acordo com a finalidade pretendida, pode ser utilizado tanto no diagnóstico, como na terapêutica.

Durante a visita-guiada à Radiofarmácia, foi-me apresentado todo o serviço de Medicina Nuclear, incluindo todas especificações que devem ser cumpridas no que concerne à segurança do operador, do doente e de todo o público. Neste sentido, destaco a utilização de diferentes materiais de proteção, nomeadamente, o chumbo que serve de barreira às radiações γ e o acrílico às radiações β , que permitem a segura conservação e manipulação consoante o tipo de radiofármaco utilizado. Também me foram explicadas as funções do serviço, nomeadamente, como são obtidos e preparados os radiofármacos e os procedimentos a cumprir pelos doentes antes e depois da sua administração.

Para além disso, acompanhei uma farmacêutica e uma TSDT na observação e análise do processo de obtenção de imagens de cintilografias ósseas para deteção de metástases, o que ajudou a cimentar as explicações que me foram dadas previamente.

O contato com esta área possibilitou a expansão dos meus conhecimentos acerca do tipo de radiofármacos e das suas aplicações e, principalmente, do papel do farmacêutico em Radiofarmácia e Medicina Nuclear, complementando a minha formação académica em Farmácia Hospitalar.

2.3.3) Ensaios Clínicos

Tendo em conta o caráter central e a experiência no uso racional do medicamento, os SF, nomeadamente, a UEC é responsável pela gestão de todo circuito do medicamento experimental no hospital, assegurando também o controlo das amostras provenientes dos ensaios clínicos que se encontrem a decorrer.

No que diz respeito aos ensaios clínicos, o farmacêutico tanto deve garantir que a sua realização cumpra todas as normas éticas, legais e da boa prática clínica, como deve certificar que os objetivos preconizados nos protocolos dos ensaios clínicos sejam cumpridos.

Independentemente do pouco tempo que contatei com este setor, sinto que tive a possibilidade de complementar e aplicar os conhecimentos relativos aos ensaios clínicos apreendidos em Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia. Também permitiu que acompanhasse todo o circuito do medicamento experimental (receção e verificação do medicamento, armazenamento e conservação, manipulação/manuseamento, dispensa e informação ao doente e, por fim, devolução do medicamento pelo doente) e me familiarizasse com toda a legislação e burocracia associadas aos ensaios clínicos^{2,3,16}.

2.4) Ameaças

2.4.1) Recursos humanos insuficientes

Em contexto hospitalar, os SF estão integrados numa rede de cuidados multidisciplinar, responsável por garantir a segurança, eficácia e qualidade do medicamento e, consequentemente, do seu circuito, assegurando, assim, a terapêutica de todos os doentes.

Como referi anteriormente, a equipa de farmacêuticos dos SF do IPOFG, E.P.E. é constituída por 18 profissionais, incluindo a Diretora Técnica. No entanto, durante o estágio, a equipa nunca esteve completa devido a férias e baixas médicas, sem substituição, o que se traduzia numa sobrecarga de trabalho evidente em todos os setores.

Além de comprometer a quantidade e, sobretudo, a qualidade do trabalho realizado, há um agravamento da probabilidade de ocorrência de erros, estando a segurança do doente em risco. Ao mesmo tempo, esta sobrecarga conduz, progressivamente, a um esgotamento físico e mental do farmacêutico.

Desta forma, considero que a inexistência de recursos humanos suficientes representa uma ameaça para o farmacêutico e para o utente, mas também para o estagiário. Como todo o serviço está sobrecarregado, não há disponibilidade para me acompanharem constantemente, o que impossibilita a execução de tarefas sem supervisão e interfere negativamente na minha aprendizagem.

2.4.2) Autonomia dos técnicos de farmácia

Sendo a equipa dos SF multidisciplinar, durante o estágio, pude contactar com vários profissionais de saúde e observar as tarefas que desempenham diariamente. No que diz

respeito aos TSDT, constatei que funções outrora eram destinadas aos farmacêuticos foram atribuídas a estes profissionais.

Em determinadas situações, principalmente, em farmacotecnia, os TSD possuem o papel de manipulador e o farmacêutico, apesar de dotado de aptidões para assumir esse papel, apenas apoia e observa o seu trabalho.

Por um lado, reconheço que a existência de TSDT seja necessária, devido à sobrecarga de trabalho a que o farmacêutico está sujeito. Todavia, acredito que gere competitividade no mercado de trabalho, constituindo uma ameaça à nossa profissão.

2.4.3) Distanciamento farmacêutico-doente

Contrariamente ao que vivenciei em Farmácia Comunitária, o farmacêutico hospitalar não estabelece um contato direto com o doente e, conseqüentemente, não cria uma relação de proximidade, salvo exceção em regime de ambulatório.

A limitação deste contato reflete-se, principalmente, sobre a validação das prescrições médicas. Não havendo participação nas visitas clínicas, nem nas visitas aos diferentes serviços do hospital, a validação resume-se ao que consta no sistema informático. Embora haja acesso ao processo clínico do doente, há detalhes que apenas suscitam a atenção quando o doente é realmente observado e acompanhado, o que compromete a qualidade do trabalho realizado pelo farmacêutico.

Além disso, a impossibilidade de fazer anotações relevantes no processo clínico, aliada a este distanciamento, inviabiliza a execução de tarefas que beneficiariam o doente, tais como a monitorização clínica e a reconciliação da terapêutica e o acompanhamento farmacoterapêutico.

Um outro fator que contribui para a não participação ativa no acompanhamento do doente prende-se com o número insuficiente de farmacêuticos, que obriga à sua presença física nos SF.

Face ao exposto, o distanciamento farmacêutico-doente traduz-se numa ameaça não só ao trabalho que realizamos e que poderíamos realizar, mas também ao reconhecimento do nosso valor como profissionais de saúde, perante os doentes e os demais profissionais.

• CONCLUSÃO •

Embora curta, a experiência que vivenciei no IPOPFG, E.P.E. tornou-me uma (futura) farmacêutica mais completa a todos os níveis.

É compreensível que não tenha adquirido todas as competências que me permitem dominar a área de FH, mas este estágio possibilitou que correlacionasse os conhecimentos teóricos com a realidade profissional, o que considero uma mais-valia. Ao mesmo tempo, proporcionou o primeiro contato com a área oncológica, expandindo os meus horizontes e sensibilizando-me para a importância de saber gerir emoções.

Durante este período, compreendi o quão multifacetado deve ser o farmacêutico hospitalar. Nesta área, é crucial o domínio da teoria e da prática de todos os setores incluídos nos SF, uma vez que além de haver rotatividade entre postos de trabalhos, as funções a desempenhar são interdependentes.

Todavia, sinto que há funções pouco exploradas devido à sobrecarga de trabalho e à falta de reconhecimento do papel do farmacêutico em ambiente hospitalar.

Neste sentido, considero que ainda há um importante caminho a percorrer, especialmente, na exploração do potencial clínico do farmacêutico. A sua inclusão na resolução de problemas clínicos, julgamento e tomada de decisão, bem como um maior contato e acompanhamento dos doentes, representaria um grande benefício tanto para os doentes, como para os outros profissionais de saúde.

Desta jornada tão enriquecedora, fica a certeza de que, independentemente de tudo, nós, farmacêuticos, somos capazes de ser bem-sucedidos em qualquer setor que prestemos serviço e esse reconhecimento pessoal deve ser o que nos motiva a não desistir.

• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS •

1. Ordem dos Farmacêuticos – **Manual de Boas Práticas de Farmácia Hospitalar**. (2018). [Acedido a 25 de abril de 2018]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/mbpfbh_capitulo_i_vfinal_17815111995a8eee5ad0c17.pdf
2. Conselho Executivo da Farmácia Hospitalar – **Manual da Farmácia Hospitalar**. Gráfica Maiadouro. (2005). [Acedido a 10 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/manual.pdf/a8395577-fb6a-4a48-b295-6905ac60ec6c>
3. IAPMEI – **A análise SWOT**. (2016) [Acedido a 10 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <http://iapmei.innovagencyhost.com/getattachment/PRODUTOS-E-SERVICOS/Empreendedorismo-Inovacao/Empreendedorismo/Guias-praticos/A-analise-SWOT.pdf.aspx>
4. IPO-Porto – **Regulamento Interno**. Porto. IPO-Porto. (2013). [Acedido a 7 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ipoportor.pt/dev/wp-content/uploads/2017/08/Regulamento-Interno-Homologado2.pdf>
5. DUARTE, F. – Manual de Procedimentos para Distribuição Individual Diária em Dose Unitária. 5.^a Edição. Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).
6. CARVALHO, C. – Manual de Procedimentos de Medicamentos Estupefacientes e Psicotrópicos. 2.^a Edição, Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).
7. INFARMED – **Portaria n.º 981/98, de 8 de Junho**. Legislação Farmacêutica compilada. Diário da República, 2.^a série. 216. (1998). [Acedido a 2 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1070504/Portaria+n.%C2%BA+981-98%2C+de+8+de+Junho/98730b43-704e-49f1-a2ed-338962a58357>
8. INFARMED – **Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro**. Legislação Farmacêutica compilada. Alterado pela Declaração de retificação n.º 20/93, Série-A. 43. (1993). [Acedido a 20 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/1070504/068-DL_15_93_VF.pdf
9. CARVALHO, C. – Manual de Procedimentos de Medicamentos Hemoderivados. 2.^a Edição, Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).

10. INFARMED – **Despacho conjunto n.º1051/2000, de 14 de Setembro**. Diário de República. 2.ª Série. 251. (2000). [Acedido a 17 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/1068535/despacho_1051-2000.pdf

11. INFARMED – **Despacho n.º9825/98, de 13 de Maio**. Diário de República. 2.ª Série. 133. (1998) [Acedido a 17 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/1072289/110-L_Desp_9825_98.pdf

12. BERNARDO, D. – Manual de Procedimentos para Citotóxicos. 1.ª Edição. Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).

13. CARLOS, C. - Manual de Procedimentos para a Unidade de Preparação de Estéreis. 2.ª Edição, Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).

14. CARLOS, C. – Manual de Procedimentos para a Unidade de Produção de Medicamentos Não Estéreis. 3.ª Edição. Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).

15. BRANDÃO, D. – Manual de Procedimentos para Distribuição em regime de Ambulatório. 2.ª Edição. Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).

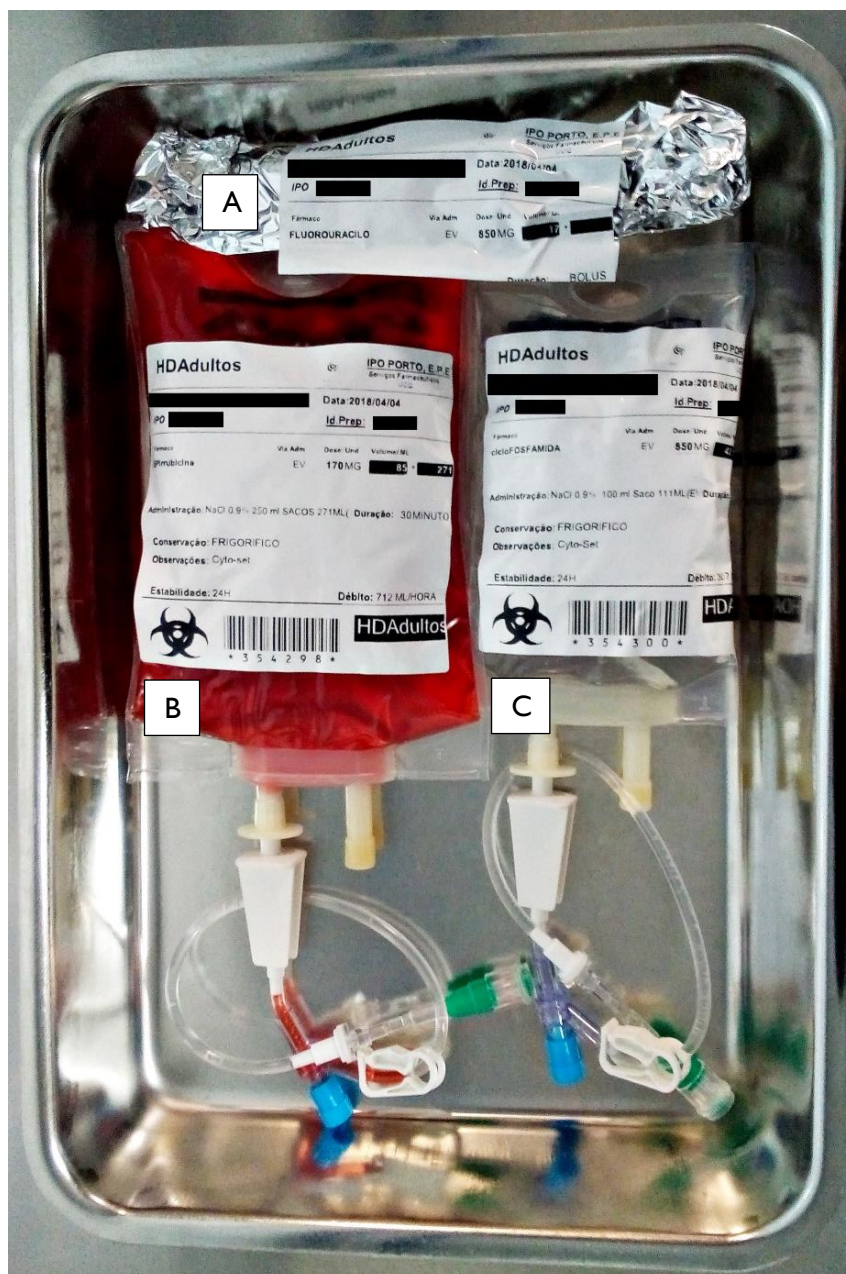
16. PEREIRA, L. – Manual de Procedimentos para a Unidade de Ensaio Clínicos. 3.ª Edição. Serviços Farmacêuticos IPO-Porto. (2016).

• ANEXOS •

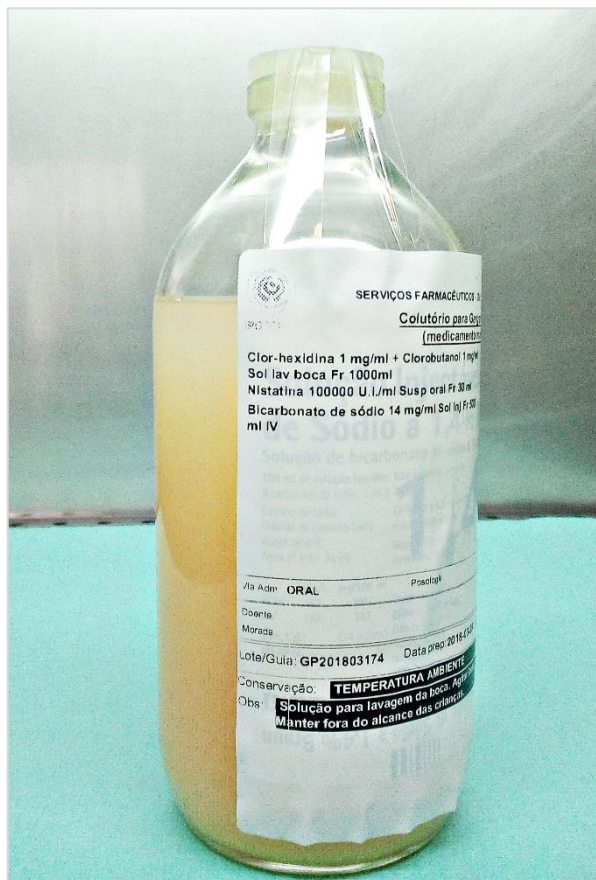
Anexo I: Exemplo de um Mapa de Produção de um Protocolo de Citotóxicos. Este documento representa o mapa de produção de um dos protocolos de Nab-paclitaxel e Gemcitabina recomendado no adenocarcinoma do pâncreas. Após a validação da prescrição, o mapa de produção é impresso e é preparado o tabuleiro, contendo os rótulos das preparações e os fármacos que necessitam de manipulação.

Mapa de Produção - Protocolos de Citotóxicos				
GHPH3615R_3				
Serviço: HD Quimioterapia-Adultos-Geral			Data Prescrição: 2018/04/02	
Nome: ██████████			Dt. act. calendário: 2018/04/02 09:57	
Altura: 165 cm	Peso: 55 kg	Superfície: 1.6 m ²	Data sessão: 2018/04/02 09:30	
Diagnóstico: ADC pancreas			Data Nasc.: ██████████	
Prescrito por: ██████████			Cama:	
PROT PANPAL04 NAB-PALITAXEL+GENCITABINA				
Data : 2018/04/02	Hora:	Ciclo/Dia: 6 / 8	Id. Prep: 353574	
Grupo: Nab - PACLitaxel 200 MG				
Medicamento			Dose	Volume
2795	PACLitaxel 5 mg/ml Pó susp inj Fr IV (Nab-Paclitaxel)		200.0 MG	40.0 ML
Obs : Saco nutritivo				
Obs Grupo : Saco nutritivo com cyto-set D1, 8 e 15				
Data : 2018/04/02	Hora:	Ciclo/Dia: 6 / 8	Id. Prep: 353575	
Grupo: geMCITABina 1600 MG+NaCl 0,9% 500 ml Saco 500 ML				
Medicamento			Dose	Volume
2686	geMCITABina 40 mg/ml Sol inj Fr 50 ml IV		1600.0 MG	40.0 ML
Obs :				
553	Cloreto de sódio 9 mg/ml Sol inj Saco 500 ml IV		500.0 ML	530.0 ML
Obs :				
Obs Grupo : cyto-set				
Observações :				
_____ Farmacêutico			_____ Técnico	
_____ Auxiliar				

Anexo II: Exemplo de um tabuleiro contendo preparações de um protocolo de quimioterapia. Nesta figura, estão representadas as preparações incluídas no protocolo FEC (5-FU, Epirrubicina e Ciclofosfamida) de quimioterapia utilizado no cancro da mama: A) Preparação de 5-Fluorouracil, B) Preparação de Epirrubicina e C) Preparação de Ciclofosfamida. Após a preparação completa do protocolo, as preparações são reembaladas, conferidas e enviadas para o respetivo serviço.



Anexo III: Exemplo de rotulagem e acondicionamento de um manipulado. Nesta figura, está representado o colutório para gargarejos do IPO-PORTO muito utilizado pelos doentes oncológicos para alívio e tratamento da mucosite oral.



Anexo IV: Exemplo de rotulagem e acondicionamento de um manipulado. Nesta figura, está representada uma solução oral de captopril 1 mg/ml preparada a partir de comprimidos, utilizada em pediatria.



• **Capítulo III** •

MONOGRAFIA

“Natural Transformation in *Acinetobacter* spp.”

• LIST OF ABBREVIATIONS •

AMR	Antimicrobial Resistance
bp	base pair
CAZ	Ceftazidime
CFUs	Colony Forming Units
CTX	Cefotaxime
DNA_B	Boiled DNA
dsDNA	Double-stranded DNA
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HAI	Hospital-acquired Infection
HGT	Horizontal Gene Transfer
IMP	Imipenem
LB	Luria Bertani
LBK₃₀	Luria Bertani with 30 µg/ml of kanamycin
MDR	Multidrug-resistant
MGEs	Mobile Genetic Elements
MM	Motility Medium
NDM	New Delhi metallo-β-lactamase
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
OD	Optical Density
ssDNA	Single-stranded DNA
TM	Transformation Mixture
T4P	Type IV Pili
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
WHO	World Health Organization

• RESUMO •

A crescente resistência antimicrobiana entre agentes patogénicos bacterianos, responsáveis por infeções, especialmente, as adquiridas em ambiente hospitalar, tem vindo a constituir uma grande ameaça para a saúde pública a nível global. A transferência horizontal de genes desempenha um papel importante na disseminação de genes de resistência antimicrobiana, incluindo a transformação natural, que é frequentemente negligenciada em ambiente clínico. Ainda assim, um grande número de isolados clínicos parece ser competente para a transformação natural, tal como foi recentemente descrito para *Acinetobacter* spp. Este facto poderá explicar a elevada capacidade de *Acinetobacter baumannii* adquirir multirresistências. Os objetivos deste estudo foram analisar a capacidade de deteção da captura e integração de ADN livre num vasto grupo de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., o seu envolvimento na transferência e aquisição de determinantes genéticos de resistência e de alterações relacionadas com o perfil de resistências das células transformantes. Numa primeira fase, foi usado um protocolo de transformação através da mobilidade em meio semi-sólido para detetar competência em 15 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. obtidos ao longo de 14 anos de cinco hospitais portugueses diferentes. Isolados naturalmente competentes (9 de 15) foram detetados em todos os hospitais, o que sugere que a transformação natural é mais comum em ambiente hospitalar do que o expectável. De seguida, os ensaios de transformação natural foram realizados com dois isolados clínicos de *A. baumannii*: o multirresistente Ab51 como dador de ADN e o naturalmente competente A118 como recetor. As células de A118 foram transformadas pelo ADN de Ab51. A técnica de PCR foi utilizada para determinar a presença da sequência de inserção ISAbal no dador, no recipiente e nas células transformantes, bem como o contexto genético da mesma, seguido da sequenciação dos amplicões. Todos os transformantes testados adquiriram ISAbal adjacente ao gene *ampC*. Em dois transformantes, a aquisição da ISAbal ocorreu por transposição e foi inserida entre os habituais genes *folE* e *ampC*. Os restantes transformantes adquiriram ISAbal adjacente a um segundo gene *ampC*, sendo parte do Tn6168, provavelmente por recombinação homóloga. Globalmente, este estudo revela a elevada prevalência de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. naturalmente competentes, assim como a contribuição do desenvolvimento de competência para a disseminação da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, sendo que a aquisição de determinantes não-codificadores de resistência pode contribuir para alterações no perfil de suscetibilidade de estirpes de *A. baumannii*.

Palavras-chave: *Acinetobacter*; transferência horizontal de genes; transformação natural; resistência antimicrobiana; agentes patogénicos.

• ABSTRACT •

The ever-increasing antimicrobial resistance among the bacterial pathogens causing infections, especially those who are healthcare-acquired has posed as a major life-threat for the public health worldwide. Horizontal gene transfer events play a relevant role in the dissemination of antimicrobial resistance genes, including natural transformation, which is often neglected in the clinical environment. Nevertheless, a high number of clinical isolates seems to undergo natural transformation, as has been recently described for *Acinetobacter* spp. This ability may explain the *Acinetobacter baumannii* high propensity to acquire multidrug resistance. The aims of this study were to assess to what extent the ability to take up naked DNA can be detected in a broad set of clinical *Acinetobacter* spp. isolates, its involvement in the transfer and acquisition of resistance genetic determinants and related changes in the resistance profile of transformed cells. First, an established transformation protocol, during motility in semisolid media, was used to detect competence in 15 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. collected over a 14-year time period from five different Portuguese Hospitals. Naturally competent isolates (9 out of 15) were detected from all the hospitals, suggesting that natural transformation is more common in hospital settings than expected. Then, natural transformation assays were performed with two clinical isolates of *A. baumannii*: the multidrug-resistant Ab51 as a DNA donor source and the naturally competent A118 as a recipient cell. A118 cells were transformed by Ab51 DNA. PCR was used to ascertain the presence of IS*AbaI* in donor, recipient and transformant cells, as well as the genetic context of the insertion sequence, followed by amplicons sequencing. All tested transformants acquired IS*AbaI* upstream the *ampC* gene. In two transformants, the IS*AbaI*'s acquisition was by transposition and its insertion was between the usual *folE* and *ampC* genes. The remaining transformants acquired the IS*AbaI* adjacent to a second *ampC* gene, as part of Tn6168, likely by homologous recombination. Overall, this study reveals the high prevalence of naturally competent *Acinetobacter* spp. clinical isolates, as well as the contribution of competence development to the widespread beta-lactams resistance, where the acquisition of non-resistant determinants can lead to changes in the susceptibility profile of *A. baumannii* strains.

Keywords: *Acinetobacter*; horizontal gene transfer; natural transformation; antimicrobial resistance; pathogens.

• INTRODUCTION •

The large-scale production and unrestrained usage of antibiotics have been linked to the emergence of resistant bacteria¹. The ever-increasing antimicrobial resistance (AMR) along with hospital-acquired infection (HAI) are two of the major life-threats for the public health worldwide².

It has become even more challenging to treat and to eradicate microorganisms either from the hospital environment or the community². As a result, treatment options and clinical efficacy are dwindling, and mortality and morbidity rates associated with resistant microorganisms are growing fast.

HAI, also known as nosocomial infection, occurs in a patient during hospital care and is absent or not incubating at the time of admission^{3,4}.

Even though a wide variety of pathogens, including bacteria, fungi, viruses, parasites, and other agents triggers HAI, bacteria stand out as the most common organism³.

1.1) ESKAPE Pathogens

The ESKAPE Pathogens refers acronymically to a group of multidrug-resistant (MDR) bacteria responsible for the bulk of nosocomial infections⁵. This group includes Gram-positive and Gram-negative species, including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp^{6,7}.

These bacteria have developed several strategies (viz. enzymatic inactivation, modification of drug targets and mechanical protection provided by biofilm formation) to evade the killing mechanisms of the most used antimicrobial agents, together with a strong ability to horizontally transfer the resistance genetic determinants between species⁵. Therefore, infections caused by some strains of these species have limited treatment options, since they are becoming resistant to all antibiotics available.

Among the ESKAPE Pathogens, Gram-negative isolates have been the focus of recent clinical attention due to the extensive increase of AMR along with the lack of new drug or approaches development^{8,9}.

1.2) *Acinetobacter* spp.

The most recurrently Gram-negative genus causing HAI is *Acinetobacter*, an heterogenous group of aerobic encapsulated non-lactose-fermenter and non-motile coccobacillus^{10,11}.

Although this genus is considered ubiquitous in natural environments and different organisms are associated with numerous habitats (e.g. soil, water, animals and humans)¹²⁻¹⁴, there are some species, such as *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter calcoaceticus*¹², that are able to readily contaminate the hospital environment. Among these species, *A. baumannii* (whose reservoir remains unclear) is the most clinically relevant pathogen, being a menace in critically ill and immunocompromised individuals, which include intubated, burned or intensive care unit patients or those carrying intravenous lines and catheters^{10,14,15}.

By the early 1970s, it was considered that clinical isolates of *Acinetobacter* spp., including *A. baumannii*, used to be susceptible to most antibiotic agents¹⁶⁻¹⁸. For this organism, infection was less common than colonization, suggesting its low pathogenicity¹⁹. However, since 1990s, with the increase of AMR, therapeutic alternatives to treat its infections became limited^{16,17}. As a result, this opportunistic human pathogen has been emerging in the clinical settings, due to its plastic genome, enabling it to quickly adapt when in hostile conditions^{16,20}. This trait allied to its capability to grow as a biofilm and survive on dry environments for prolonged periods of time allows it to easily colonize and persist in human surfaces and hospital equipment^{14,21,22}.

Frequently, the majority of *A. baumannii* HAI's involves the respiratory tract and central-line-associated bloodstream infections. Less commonly, it manifests in the skin and soft tissues, at surgical sites and at catheter-associated urinary tract infections^{11,20}. However, because there is a wide range of phenotypic and genotypic variations of *A. baumannii* strains, the infection's type and severity may vary, according to the strain responsible for the infection^{21,23}.

The spread of *A. baumannii* in a nosocomial environment is enabled both by tolerance to desiccation and to its propensity to acquire multidrug (non-susceptibility to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories), extensive drug (non-susceptibility to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 antimicrobial categories) and even pandrug (non-susceptibility to all antimicrobial agents tested) resistance²⁴.

In addition to acquired resistance genes, *A. baumannii* has intrinsic β -lactamase genes, namely *ampC* and *bla*_{OXA-51}-like, which are expressed at low levels. When insertion sequences, such as *ISAbal* or *ISAbal25*, are adjacent to the 5' end of *ampC* and *bla*_{OXA-51}-like, these genes

are strongly expressed. Consequently, it leads to β -lactams resistance, including third-generation cephalosporins and/or carbapenems^{25–29}.

Furthermore, it has been identified in some clinical *A. baumannii* strains, the Tn6168 transposon, carrying an IS*AbaI*-activated *ampC* second gene, which confers third-generation cephalosporin resistance^{30,31}. Another carbapenemase able to confer β -lactams antibiotics resistance, including the carbapenems, is the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), which is carried by multiple Gram-negative species worldwide, including *A. baumannii*. There are at least 16 variants of the *bla*_{NDM} gene that have been identified and its location varies in diverse replicon type plasmids^{14,32–34}.

Resistance to carbapenems, one of the last resort options for treatment of *A. baumannii* infections, has become more common among this species, resulting in the dearth of therapeutic drugs options for *A. baumannii* infections treatment³². As a result, the World Health Organization (WHO) included the carbapenem-resistant *A. baumannii* strains in the critical group in the global list of pathogens that stand as the greatest threat to the human health, prioritizing its research and development efforts for new and effective antimicrobial treatments^{20,35}.

1.3) Dissemination of Antibiotic Resistance

Recently, D'Costa et al.³⁶ recovered multiple DNA fragments from Beringian permafrost samples dating 30000 years old and found similarity to genes associated with resistance against tetracyclines, β -lactams, vancomycin and glycopeptide antibiotics in modern bacteria³⁶. This discovery supports the idea that ancient bacteria carried genes homologous to resistance genes^{36,37}. Additionally, Perron and colleagues³⁷, proved the existence of functional antibiotic resistance mechanisms in bacteria from at least 5000 years ago.

Taking these last findings into account, it is considered that the resistance to antibiotics is a natural phenomenon widespread in the environment that precedes the antibiotic era. However, due to the human hectic use of antibiotics and its selective pressure, resistant bacteria and/or genes are emerging drastically, contributing to resistance wide dissemination^{1,36,37}.

Antibiotic resistance can be either intrinsic or acquired, of which the latter may occur by mutations or by horizontal gene transfer (HGT)¹.

1.3.1) Horizontal Gene Transfer

The movement of resistance genes among bacterial genomes plays a paramount role on the genome plasticity and, therefore, on bacterial adaptation and evolution^{1,38}. This behaviour, also known as lateral gene transfer, includes the transfer of foreign DNA between microorganisms without a parent-offspring relationship³⁹. HGT is facilitated by mobile genetic elements (MGEs), such as plasmids, transposons or integrons, which carry clusters of genes and can lead to marked differences in genome size and pathogenicity⁴⁰.

In order to maintain horizontally acquired genes in the chromosome of the recipient bacteria, they must be incorporated into the host's genome through homologous recombination, illegitimate recombination or transposition, unless a plasmid is acquired⁴⁰⁻⁴². Besides, the foreign genes, generally, have to provide a neutral effect or a selective advantage to the host and cannot cause deleterious effects in the absence of selection, otherwise these bacteria will be lost from the population. In most cases, the acquisition of resistance genes has a fitness cost to the host bacteria⁴²⁻⁴⁴.

There are three main mechanisms to horizontally transfer genes: conjugation, transduction and natural transformation (Figure 1). Conjugation is a process entailing cell to cell physical contact via a conjugation pilus or adhesin, through which genetic material, usually a plasmid, from a donor is transferred to a recipient cell. Transduction is the delivery of genetic material from a previously infected donor cell to the recipient cell by a bacteriophage. Natural transformation is the uptake, integration and functional expression of fragments of exogenous genetic material by naturally transformable bacteria⁴².

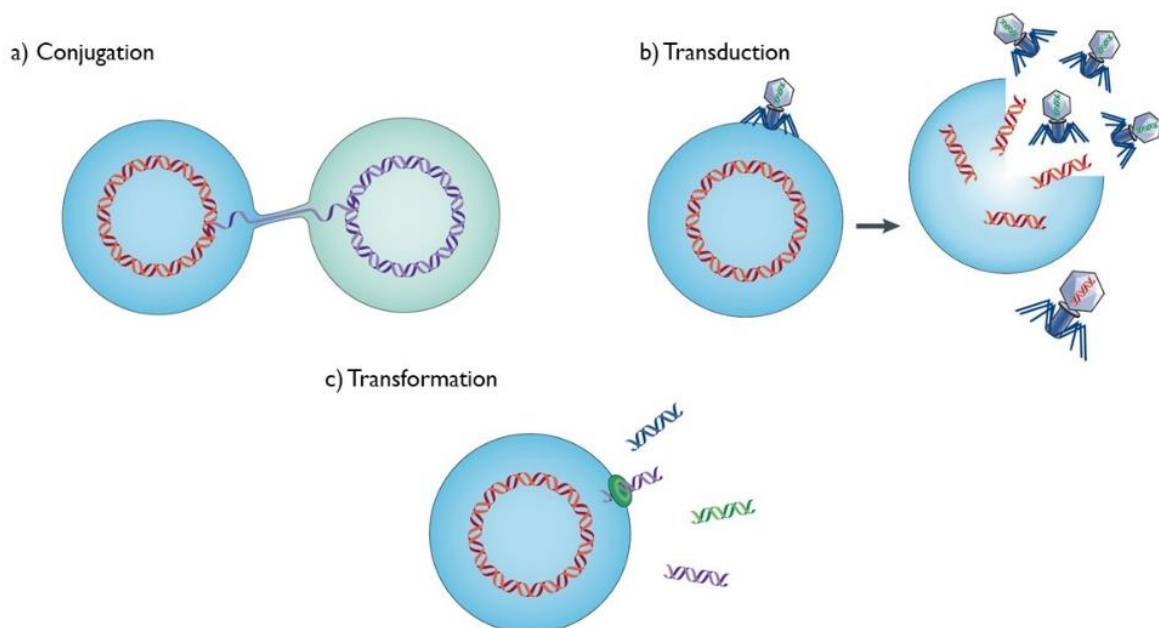


Figure 1: Mechanisms of horizontal gene transfer. Each scheme represents one of the three main mechanisms to horizontally transfer genes: a) conjugation b) transduction and c) natural transformation. Adapted from⁴².

Since natural transformation does not require direct interaction between a donor and a receiver cell, comparatively to conjugation, it might be considered as the simplest mechanism of DNA heritage from foreign species beyond the host range of MGEs and bacteriophages^{45,46}.

1.3.1.1) Natural transformation

A bacterium able to successfully acquire DNA by natural transformation is known as naturally transformable. This phenomenon occurs during a specific genetic physiological state named competence, requiring a coordinated expression of protein complexes by the bacteria, which enables DNA binding, active DNA uptake, processing and genome internalization^{39,47}.

For natural transformation to take place, a few prerequisites must be fulfilled. First, the continuous release of extracellular (free or naked) DNA into the environment from disrupted cells, decomposing cells, viral particles, or by excretion from living cells, and its persistence, since it's crucial for the bacterial exposure time. Second, the presence of recipient bacteria in a competent state. Third, the ability of translocated chromosomal DNA to be stabilized either by integration into the bacterial genome or, in the case of translocated plasmid, by recircularization into self-replicating plasmids⁴⁸.

After meeting the three conditions described above, bacteria may successfully acquire extracellular DNA.

For Gram-negative bacteria, as *Acinetobacter* spp., the double-stranded DNA (dsDNA) is taken up into the host via a DNA-uptake complex across the outer membrane to the periplasmic space through a secretin pore (Figure 2) This process is mediated by a homologous type IV pili (T4P), which are multiprotein surface appendages with extracellular, transenvelop and cytoplasmic components, specially found in Gram-negative bacteria^{39,47}. In most species, when functional, T4P can retract and extend, allowing twitching motility^{49,50}.

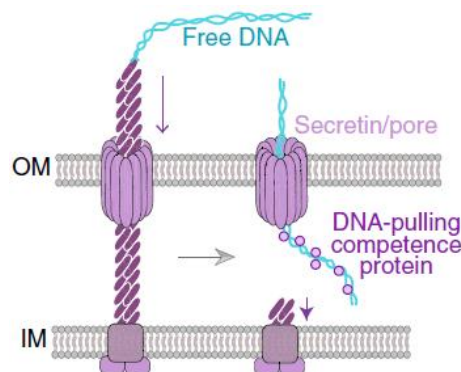


Figure 2: Representation of the DNA-uptake complex of naturally competent Gram-negative bacteria. Naked DNA is taken up into the host across the outer membrane (OM) to the periplasmic space through a secretin pore. The process is mediated by a type IV pilus structure (central part of the DNA-uptake complex), which, upon retraction, might open the secretin pore. Then, competence proteins bind the DNA and pull it into the cell. Adapted from³⁹.

Particularly, for *Acinetobacter* spp., although it lacks flagella, the T4P also enables this genus movement along wet surfaces^{51,52}. In addition, due to T4P functional diversity, it contributes to adhesion, colonization, biofilm formation and natural transformation⁴⁹.

Once in the periplasm, an intact single-stranded DNA (ssDNA) is then translocated into the cytoplasm through a channel, across the cytoplasmic inner membrane, whereas the other strand is degraded^{39,47}.

For Gram-positive bacteria, due to the inexistence of an outer membrane, the DNA is pulled by a pseudopilus system, which create a free space in their thick peptidoglycan wall, acting as a piston⁵³. Before the ssDNA strand is translocated, an endonuclease cleaves it into smaller fragments^{39,47}.

Finally, if there's sequence similarities, the RecA recombinase binds to the translocated DNA strand, mediating homologous recombination, or the DNA strand is degraded, and its nucleotides recycled (Figure 3). Illegitimate recombination and transposition can occur and have also been reported, even though such events are extremely rare³⁹.

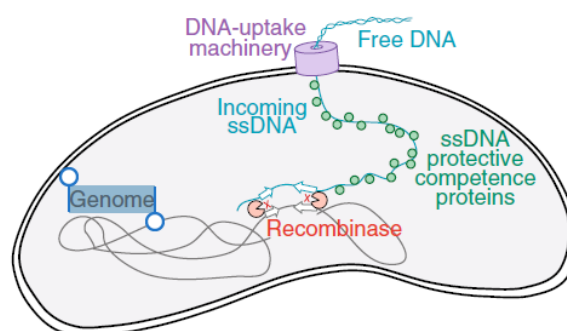


Figure 3: Overview of the natural transformation internal process in naturally competent Gram-negative bacteria. Double-stranded DNA (dsDNA) is taken-up by the DNA-uptake apparatus but only a single-stranded DNA (ssDNA) is translocated into the cytoplasmic inner membrane of the bacteria. Protective competence proteins avoid the ssDNA degradation and the recombinase mediates the DNA strand integration into the genome. Adapted from³⁹.

Although the DNA-uptake apparatus and the process of DNA transportation have been identified in multiple species, they might vary among them and the detailed mechanisms of most naturally competent species remain to be fully characterized⁴⁷.

Nowadays, more than 89 bacterial species have been described with the ability to express competence⁵⁴. However, in a bacterial population, the proportion of bacteria developing competence might vary from near zero to almost 100%⁵⁵. Within most of the bacteria found to be naturally transformable, their competence is time-limited and just developed in special conditions, such as growth environments, nutrient access, cell density or starvation. Indeed, under laboratory conditions is complex to create a standardized method able to mimic the dynamics of natural transformation⁴⁶.

Therefore, the results obtained are often strongly affected by the transformation assays and the number of competent species remain underestimated and yet to be clarified⁴⁴.

Regarding *Acinetobacter* spp. isolates, their ability to take up foreign DNA seems to be widespread among them. Only recently, it has been reported that a few *A. baumannii* clinical strains are naturally competent^{52,56}. As a result, it could explain the dissemination of new antibiotic resistance genes acquisition and provide support to develop alternative treatment strategies, since the underlying mechanisms are not yet clearly understood¹.

1.4) Aims

This study was divided in two main goals:

- To test the natural transformability of 15 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. collected during the period 1994-2008 from five different Portuguese Hospitals;
- To assess the involvement of natural transformation in the transfer and acquisition of resistance genetic determinants by *A. baumannii* after uptake of naked DNA, as well as the related changes in the resistance profile of transformed cells.

• MATERIAL AND METHODS •

PART I – Screening of naturally competent *Acinetobacter* spp. isolates

1.1) Bacterial strains

1.1.1) Recipient bacteria

Fifteen MDR but kanamycin susceptible clinical isolates of *Acinetobacter* spp. collected during the period 1994-2008 from five different Portuguese hospitals were used in this study.

1.1.2) Donor bacteria

Naked DNA from *A. baumannii* 179 (kindly provided by G. Wilharm), carrying a kanamycin resistance gene inserted into the sulphite reductase gene, was used as the donor source to transform *A. baumannii* 121 cells. Afterwards, DNA from transformant 121-1, containing the kanamycin marker, was used as the transforming DNA.

1.2) Growth conditions and media

Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) (Fluka) agar (Liofilchem) media and incubated at 37 °C to obtain single colonies.

Natural transformation was performed in semisolid medium, here called motility medium (MM), as described previously⁵², containing 0,5% agar (Liofilchem), 5 g/l tryptone (Difco) and 2,5 g/l sodium chloride (Scharlau).

Selection of transformant cells was performed in LB agar supplemented with 30 µg/ml of kanamycin (Sigma) (LBK₃₀).

Transformants were also streaked in Simmons citrate agar (Pronadisa). All wild-type recipient bacteria grow in this medium. However, cells acquiring the transforming DNA fail to grow on this medium (G. Wilharm, personal communication).

1.3) DNA extraction

1.3.1) Total DNA

Genomic DNA used in the transformation assays was isolated from bacterial cultures using anion exchange columns (QIAGEN, Germany) according to the manufacturers protocol and resuspended in EB buffer, pH 8.5 (QIAGEN, Germany).

1.3.1.1) Determination of the concentration and purity of the DNA

The absorbance measurement with GeneQuant Pro Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spectrophotometer (Biochrom™) was used to assess DNA concentration and purity.

For calculating DNA concentration, absorbance readings were performed at 260 nm, since it's the UV wavelength of maximum absorption for nucleic acids. Also, at 260 nm, dsDNA with a concentration of 50 ug/ml has an absorbance of 1.0, which allows to determine DNA concentration of a sample.

To evaluate DNA purity, absorbance was measured from 230 nm to 320 nm to detect protein or other possible contaminants (e.g. phenol). The A_{260}/A_{280} ratio provides an indicative of nucleic acid purity and values should be equal or greater than 1.8 for DNA samples. If there is contamination, the ratio will be lower than the optimal values and the amount of DNA present will not be accurate. Additionally, as the A_{260}/A_{230} ratio provides the level of salts present, it can be used as another indicator of nucleic acid purity in the sample and values should be greater than 1.5.

Finally, absorbance readings performed at 320 nm indicates if there is turbidity in the solution and, consequently, non-specific contamination. It is important to note that to improve accuracy of all ratios or absorbance values, they can be adjusted for turbidity by subtracting its value as a background reading.

1.3.2) Boiled DNA

A small loop of cells grown overnight in LB agar with appropriate antibiotic was suspended in an Eppendorf tube with 50 µl of distilled water and boiled at 100 °C in a water bath for 10 min. The sample was centrifuged for 2 min at 14600 rpm at room temperature.

The supernatant containing boiled DNA (DNA_B) was transferred to a clean Eppendorf tube and stored at -20 °C to be later used in Polymerase Chain Reaction (PCR) assays.

1.4) Natural transformation assays

The transformation protocol during surface motility in semisolid medium, described by Wilharm et al.⁵² was tested with some adaptations. Briefly, a single colony of the tested recipient cell was suspended in 20 µl of sterile phosphate-buffered saline (PBS). From the 20 µl of the previous suspension, 10 µl were mixed with 10 µl of donor DNA (400 ng/µl), thus obtaining the transformation mixture (TM). Afterwards, a total of 14 µl of TM was added to the motility medium by 7 perforations (2 µl per stab) (Figure 4). The plate was sealed with parafilm to prevent desiccation and was incubated at 37 °C for 24 hours.

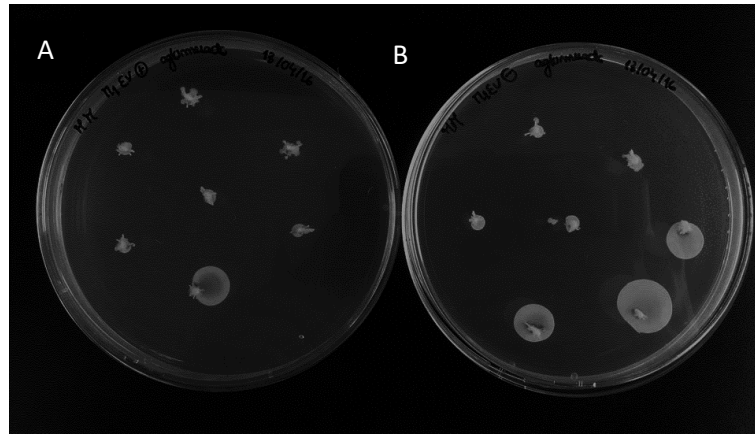


Figure 4: Example of the natural transformation assay with of *A. baumannii* clinical isolates. Semisolid medium was stabbed with the transformation mixture (A) or water in the negative control (B).

After 24 hours, bacteria were recovered from the medium surface and suspended in 1 ml of PBS. One hundred microlitres of the undiluted sample were plated in LBK₃₀ agar medium. Incorporation of the kanamycin resistance marker into the chromosome of the recipient cell by homologous recombination allows the detection of transformants and, consequently, the competent isolates.

For each experiment, a negative control, with water instead of DNA, was always included.

1.5) Characterization of transformants

The possible transformants would grow as Colony Forming Units (CFUs) on LBK₃₀ plates. Selected CFUs were re-streaked in LBK₃₀ and Simmons citrate agar. Cells growing in LBK₃₀ but failing to grow in Simmons Citrate plates, as well as the recipient cell, were further tested by PCR with the goal to target the sulphite reductase gene⁵².

In this particular study, the PCR amplification was carried out in a MJ Mini™ (BIO-RAD) thermal cycler and performed in a 20 µl of reaction mixture, containing 8 µl of distilled water, 0,5 µl of each primer 10 µM, 10 µl of MasterMix Dynazyme II (Finnzymes, Finland) and 1 µl of DNA_B. The primers used were Mu179F (5'- ATCGGTAATAAAGCCGATATGCG -3') and Mu179R (5'- TCAGCAGCTGATTAATCAACGAG -3') (G. Wilharm, personal communication).

Amplification included an initial denaturation step at 94° C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1', 60 °C for 1' and 72 for 3', and a final extension step at 72 °C for 5' (G. Wilharm, personal communication).

Amplicons were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, which contains ethidium bromide, run in Tris-acetate-EDTA (TAE) 1x buffer for 1 h at 80 V and visualized by UV transillumination.

Cells that acquired the transforming DNA produce a PCR amplicon of approx. 2400 base pairs (bp), while in wild-type cells the amplicon size was 1200 bp, due to the absence of the kanamycin marker insert⁵².

PART II – Acquisition of resistance determinants by natural transformation

2.1) Bacterial strains

For natural transformation experiments, two clinical isolates of *A. baumannii* were used: the Ab51 as a donor DNA source and A118 as a recipient cell.

A. baumannii Ab51 is a multidrug and carbapenem-resistant strain, carrying the *bla*_{NDM-1} gene, isolated in the Monastir University Hospital, Tunisia, in 2015. Total DNA used as donor was extracted as explained in subsection 1.3.1).

A. baumannii A118 is an Argentinian strain, susceptible to several antibiotics (including 3rd generation cephalosporins and carbapenems) and has been previously described as naturally competent⁵⁶.

2.2) Natural transformation assays

Natural transformation assays were performed in semisolid media as described in part 1.2)⁵², with selection done in LB (Fluka) agar (Liofilchem) with cefotaxime (CTX) 30 µg/ml or imipenem (IMP) 4 µg/ml (Sigma).

In order to determine the number of CFUs, the recovered bacteria suspension was adjusted to 10 optical densities (so that the 10-fold dilution yielded an OD at 600 nm [OD₆₀₀] of 1.0). Then, to select the transformant cells, 100 µl of the non-diluted suspension and of the 10⁻¹ dilution were plated on the selective agar, with 30 µg/ml of CTX or 4 µg/ml of IMP and, to obtain the total number of CFUs, 100 µl of the 10⁻⁶ and the 10⁻⁷ dilution were plated on LB. After incubation at 37 °C for 24 hours, the transformation frequency was calculated as the number of transformant cells divided by the total CFUs.

For each experiment, three replicates were performed. Additionally, a positive control, with homologous DNA (from transformant 121-1)⁵², and a negative control, with distilled water, were always included.

2.3) Antimicrobial susceptibility testing

The disk diffusion method standardised by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁵⁷ was chosen to evaluate antimicrobial susceptibility of donor, recipient and transformant cells to specific β -lactams, such as cefotaxime (30 μ g), ceftazidime (CAZ; 30 μ g) and imipenem (10 μ g) (Oxoid).

This method is based on the Kirby-Bauer technique using Mueller-Hinton agar with an inoculum suspension corresponding to a McFarland 0.5 turbidity standard.

First, bacteria were grown in LB agar and incubated at 37 °C. Then, a bacterial suspension was prepared and inoculated in four directions with a cotton swab to completely cover the entire surface plate.

Subsequently, antimicrobial disks were applied on the agar surface and the plates were incubated at 37 °C for 16 to 20h.

An antibiotic concentration gradient is produced as the antibiotic diffuses radially outward through the medium. If the antibiotic inhibits bacterial growth, a clear inhibition zone is formed around the antimicrobial disk.

After incubation, plates were examined, and inhibition zones were read at the point where no obvious growth is visible by the unaided eye with the plates held about 30 cm from the eye.

2.4) Molecular characterization of bacterial isolates

Selected transformants were tested by PCR in order to assess if antimicrobial resistance determinants were successfully transferred and acquired. For all PCR assays and analyses, the donor Ab51 and the recipient A118 were used as positive and negative controls, respectively.

In this experiment, the PCR amplification was carried out in a MJ Mini™ (BIO-RAD, Portugal), a T-personal (Biometra) or T1 (Biometra) thermal cycler and performed in a 20 μ l of reaction mixture, containing 8 μ l of distilled water, 0.5 μ l of each primer 10 μ M, 10 μ l of MasterMix Dynazyme II (Finnzymes, Finland) or PCR Master Mix (Thermo Scientific™) and 1 μ l of DNA_B. Boiled DNA was obtained as explained in 1.3.2).

Each pair of primers were used according to each gene. To determine the presence of the *bla*_{NDM-1} gene, NDM-F and NDM-R primers⁵⁸ were used. For amplification of the *ISAbal* gene, *ISAbal*a and *ISAbal*b primers²⁷ were used. To identify *ISAbal*'s insertion upstream the *ampC* or *bla*_{OXA-51}-like genes, primers *ISAbal*b²⁷-ACI6²⁵ or *ISAbal*b²⁷-OXA-51-likeR²² primers were used, respectively.

To identify the *ISAbal*'s intracellular acquisition mechanism, the amplicons from selected transformants were amplified with primers RH581²⁶ and ACI6²⁵ and sequenced with primers RH581²⁶ and AMPCS (5'-ATAACACCCACAGCCATACC-3') by STAB VIDA (Portugal). RH581 binds in the *folE* gene, which is usually linked to *ampC*²⁶, and ACI6 and AMPCS bind in the *ampC* gene. Additionally, for Tn6168³¹, which contains a second *ampC* gene, detection was performed with primer pairs *ISAbal*b²⁷-RH582²⁶ and RHI379³¹-*ISAbal*a²⁷.

Amplicons were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel, which contains ethidium bromide, run in Tris-acetate-EDTA (TAE) 1x buffer for 1 h at 80 V and visualized by UV transillumination.

The thermal profile and pair of primers for each PCR is described in Table I.

Table I – List of studied genes with correspondent PCR conditions and primers used.

Gene(s)	PCR conditions	Pair of primers	Amplicon size	Primers reference
<i>bla</i> _{NDM-1}	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 56 °C for 1' - 72 °C for 1' 3) 72 °C for 3'	NDM-F + NDM-R	621 bp	52
<i>ISAbal</i>	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 52 °C for 1' - 72 °C for 1' 3) 72 °C for 3'	<i>ISAbal</i> a + <i>ISAbal</i> b	389 bp	21
<i>ISAbal</i> - <i>ampC</i>	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 52 °C for 1' - 72 °C for 2' 3) 72 °C for 5'	<i>ISAbal</i> b + ACI6	1695 bp	19,21
<i>ISAbal</i> - <i>bla</i> _{OXA-51-like}	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 52 °C for 1' - 72 °C for 2' 3) 72 °C for 5'	<i>ISAbal</i> b + OXA-51-likeR	1252 bp	21,22
<i>folE</i> - <i>ISAbal</i> - <i>ampC</i>	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 58 °C for 1' - 72 °C for 3' 3) 72 °C for 5'	RH581 + ACI6	1350 bp w/o <i>ISAbal</i> 2500 bp w/ <i>ISAbal</i>	19,20
Tn6168	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 52 °C for 1' - 72 °C for 2' 3) 72 °C for 5'	1) <i>ISAbal</i> b + RH582	1) 2000 bp	21,25
	1) 94 °C for 5' 2) 30 cycles of: - 94 °C for 1' - 58 °C for 1' - 72 °C for 3' 3) 72 °C for 5'	2) RHI379 + <i>ISAbal</i> a	2) 3000 bp	20,21

• RESULTS AND DISCUSSION •

PART I – Screening of naturally competent *Acinetobacter* spp. isolates

To investigate whether *Acinetobacter* spp. isolates exhibit competence, 15 kanamycin susceptible clinical isolates were tested with the transformation protocol.

Cells that were able to grow in LBK₃₀ but failed to grow in Simmons Citrate plates were considered possible transformants.

The randomly selected transformants and recipient cells were further tested by PCR to detect the presence of the kanamycin marker. All selected transformants produced a PCR amplicon of approx. 2400 bp, while in wild-type recipient cells the amplicon size was 1200 bp, due to the absence of the kanamycin marker insert (Figure 5). This data sustains the acquisition of transforming DNA by the competent *Acinetobacter* spp. isolates.

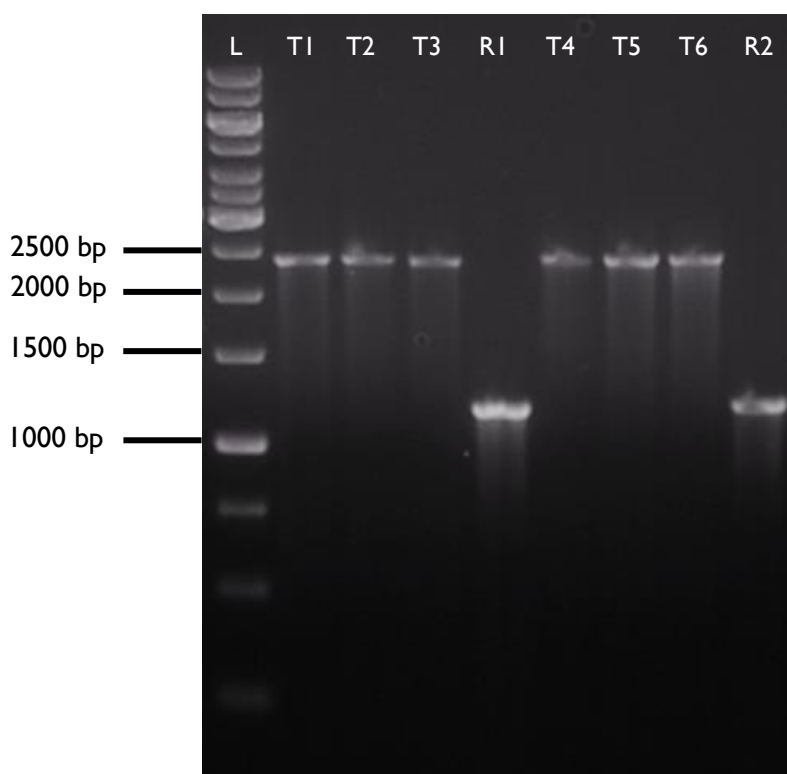


Figure 5: Example of the detection of transformants after natural transformation of *Acinetobacter* spp. isolates. Agarose gel (1%) electrophoresis used for separation of the different multiplex PCR products. Lane “L” correspond to the DNA ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). Lanes “T1-T6” are possible transformants and “R1” and “R2” are recipient cells. If the amplicon produced is approx. 2400 bp, the kanamycin marker insert is present (T1-T6), confirming transforming DNA acquisition; while in wild-type cells the amplicon size is 1200 bp, due to the kanamycin marker absence (R1 and R2).

In total, 9 out of 15 (60%) isolates of clinical *Acinetobacter* spp. were detected to be naturally transformable. Except for one isolate that could not be identified to the species level, all the isolates identified as naturally competent were *A. baumannii* (Table 2). Since all transformable isolates were from the same species, it may indicate that the conditions required to trigger competence development and to successfully transform bacteria population are often species-specific⁵⁸.

Table 2 – Competence detection in clinical *Acinetobacter* spp. isolates.

Isolate designation	Species	Isolation Year	Hospital/Region of Collection	Natural Competence
3605	n.d.	1994	Porto	-
3625	<i>A. baumannii</i>	1995	Porto	+
65FFC	<i>A. baumannii</i>	1998	HUC/Coimbra	-
118	<i>A. bereziniae</i>	1998	HUC/Coimbra	-
121	<i>A. baumannii</i>	1998	HUC/Coimbra	+
132	<i>A. baumannii</i>	1998	HUC/Coimbra	+
65HSM	<i>Acinetobacter</i> sp.	1999	HSM/Lisbon	+
241	<i>A. baumannii</i>	2005	HSAC/Lisbon	+
245	<i>A. baumannii</i>	2005	HSAC/Lisbon	-
274	<i>A. baumannii</i>	2006	HSAC/Lisbon	-
292	<i>A. baumannii</i>	2006	HSAC/Lisbon	+
319	<i>A. baumannii</i>	2007	HSAC/Lisbon	+
F₁EV (138022)	n.d.	2008	HES/Évora	-
A₁EV (532331)	<i>A. baumannii</i>	2008	HES/Évora	+
M₁EV (144417)	<i>A. baumannii</i>	2008	HES/Évora	+

+ competence detected; - competence not detected

n.d. – not determined

HES – Espírito Santo Hospital; HSAC – Santo António dos Capuchos Hospital;

HSM – Santa Maria Hospital; HUC – University Hospitals of Coimbra.

Some of the *A. baumannii* isolates failed to produce transformants in all transformation attempts. This might indicate that small variations in the bacteria features or environmental conditions that induce and maintain the competence state may hinder naturally transformable bacteria recognition. In the study of Wilharm et al.⁵², depending on the type of transforming DNA, *A. baumannii* isolates showed differences in the ability to uptake DNA⁴⁶, whereas in a recent study, natural transformability of *A. baumannii* A118 was not affected neither by the concentration or the source of the DNA. Instead, it was influenced by the pH of the medium.

Also, both Ca^{2+} ions and albumin were shown to induce the level of transformation in the three *A. baumannii* strains tested⁵⁹.

Accordingly, the hypothesis that the *Acinetobacter* spp. isolates from this study established as negative may be transformable cannot be excluded.

PART II – Acquisition of resistance determinants by natural transformation

To determine the impact of natural transformation in the transfer and acquisition of resistance genetic determinants, *A. baumannii* A118 cells were transformed by *A. baumannii* Ab51 DNA, according to the transformation protocol.

When the selection was performed with CTX, the transformation frequency was 6.85×10^{-4} transformants per total CFUs. With the IMP selection, since only two transformants were acquired, the transformation occurred at a 3.45×10^{-9} frequency (Table 3).

For the positive control, the transformation frequency was 1.18×10^{-4} transformants per total CFUs (Table 3). As it is known, the intracellular acquisition of donor DNA by natural transformation often rely on homologous recombination^{52,60}. Furthermore, this mechanism has been previously described after uptake of *A. baumannii* DNA by natural transformation by *Acinetobacter baylyi* BD413 with similar transformation frequency⁶¹.

Table 3 – Natural transformation of *A. baumannii* A118 with DNA from *A. baumannii* Ab51.

Assays	No of transformants (CFU)	No of total cells (CFU)	Transformants per total cells
CTX selection ^a	5.21×10^5	7.6×10^8	6.85×10^{-4}
IMP selection ^a	2×10^0	5.8×10^8	3.45×10^{-9}
Positive control ^b	5.1×10^8	6.0×10^4	1.18×10^{-4}

^aTransformants selected in cefotaxime (CTX) or imipenem (IMP)

^bPositive control with homologous DNA from transformant 121-1.

Negative control experiments, in the equal experimental conditions, except that no DNA was added, were included in each transformation assay. For each experiment, three replicates were performed.

Since the order of magnitude of the frequencies transformation obtained with Ab51 DNA under CTX selection and with the positive control are similar, it suggests that homologous recombination might be involved in the acquisition of donor DNA, leading to third generation cephalosporins resistance in A118⁶¹.

After selecting possible transformants, their antimicrobial susceptibility profiles were determined, demonstrating that all cells changed the susceptibility profile to CAZ and CTX, in comparison with the recipient A118 and the majority of the cells became resistant to both antibiotics. Regarding the susceptibility profile to IMP, since the diameter of the inhibition zone was inferior to 17 mm, the two transformants selected with IMP (T4 and T5) exhibit IMP resistance. On the other hand, for the transformants selected with CTX (T1-T3 and T6-T10), the diameter of the inhibition zone for IMP was equal or superior to 23 mm, indicating susceptibility, according to EUCAST guidelines⁵¹. In addition, the Ab51 and the A118 antimicrobial susceptibility profiles were ascertained, revealing that Ab51 was resistant to all antibiotics, whereas A118 was susceptible, as expected (Table 4).

Table 4 – Antimicrobial susceptibility profile of clinical *Acinetobacter* spp. isolates.

Isolates tested	Inhibition zone diameter (mm)		
	CAZ	CTX	IMP
Ab51	0	0	0
A118	26	21	33
T1	0	0	30
T2	0	0	32
T3	0	0	30
T4	0	0	0
T5	0	0	0
T6	15	0	30
T7	15	0	27
T8	0	0	30
T9	0	0	31
T10	0	0	31

CAZ – Ceftazidime; CTX – Cefotaxime; IMP – Imipenem

To assess if the resistance determinants present in the donor Ab51 were successfully transferred and acquired, selected transformants were tested by PCR. Initially, it was thought that the *bla*_{NDM-1} gene, responsible for conferring resistance to β -lactams, including carbapenems^{32,62}, carried by the donor, could be present in the selected transformants and, consequently, explain their alterations in the antimicrobial susceptibility profile. However, this hypothesis failed, since none of the transformants cells tested showed an amplicon size of approx. 621 bp, which would indicate that the *bla*_{NDM-1} gene was acquired (Figure 6).

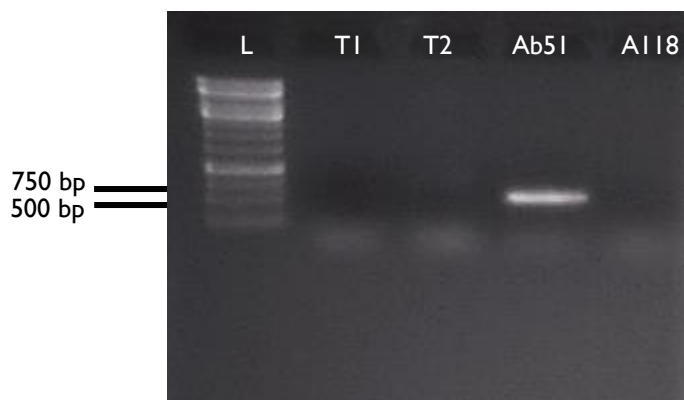


Figure 6: Example of the detection of the *bla*_{NDM-1} gene acquisition in transformants after natural transformation of *Acinetobacter* spp. isolates. Agarose gel (1%) electrophoresis used for separation of the different multiplex PCR products. Lane “L” correspond to the DNA ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). Lanes “T1” and “T2” are the possible transformants, “Ab51” is the DNA donor and “A118” is the recipient cell. If the amplicon produced is approx. 621 bp, the *bla*_{NDM-1} gene is present (Ab51).

Considering the results above, the presence of other resistance determinants known to confer β -lactams resistance, including third-generation cephalosporins and/or carbapenems, was assessed^{25–28,63}.

In previous studies, acquisition of the *ISAbal* upstream the *ampC* gene and, consequently, overexpression of the *ampC* gene has been associated with changes in the susceptibility profile to CAZ and CTX^{27,63–65}. PCR assays confirmed that the donor and all tested transformants carried *ISAbal*, while it was absent from the recipient (data not shown), suggesting the acquisition of this mobile element by transformant cells. Subsequently, it was checked whether the insertion was acquired upstream the *ampC* gene. Figure 7 shows that all transformants acquired *ISAbal* upstream the *ampC* gene, supporting the changes obtained in the antimicrobial susceptibility profile (Table 4).

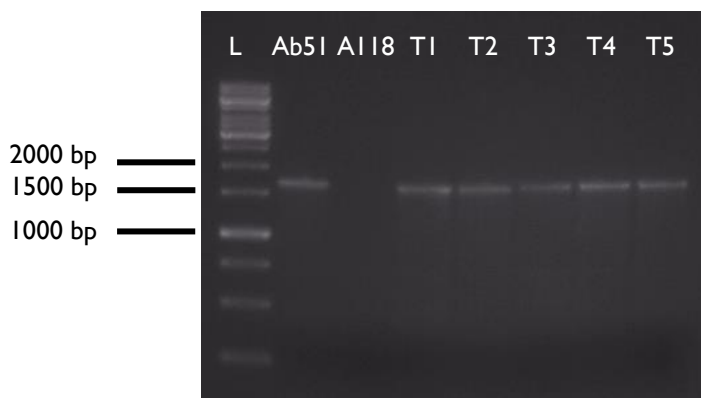


Figure 7: Example of the detection of the ISAbal upstream the ampC gene in transformants after natural transformation of Acinetobacter spp. isolates. Agarose gel (1%) electrophoresis used for separation of the different multiplex PCR products. Lane “L” correspond to the DNA ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). Lane “Ab51” is the donor, “A118” is the recipient and “T1-T5” are the possible transformants. The presence of ISAbal upstream the ampC gene is confirmed with an amplicon size of approx. 1695 bp (Ab51 and T1-T5).

Moreover, the donor also encodes intrinsically a *bla*_{OXA-51}-like gene, which can play an important role in carbapenem resistance⁶⁶⁻⁶⁹. Despite its low hydrolytic activity, some studies relate ISAbal’s integration adjacent to the *bla*_{OXA-51}-like gene to an enhanced efficiency and overexpression of this resistance gene⁶⁷⁻⁶⁹. PCR assay was performed to evaluate if the transformants exhibit integration of the ISAbal adjacent to the *bla*_{OXA-51}-like gene. The results, shown in Figure 8, demonstrate that none of the cells had ISAbal integrated adjacent to the *bla*_{OXA-51}-like gene, excluding its contribution to the resistance profile alterations.

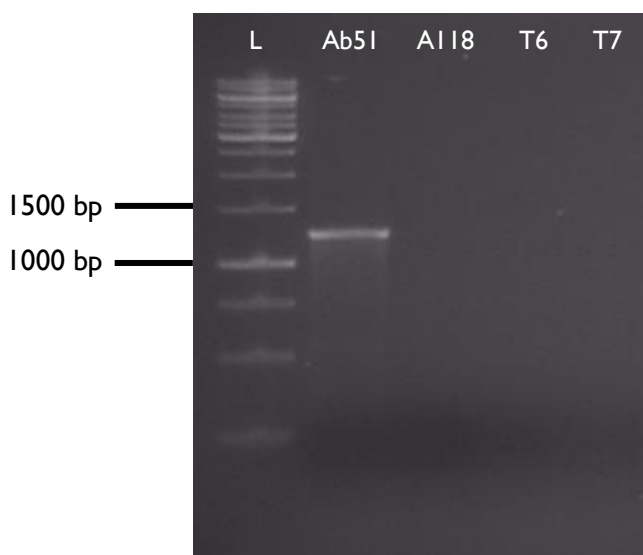


Figure 8: Example of the detection of the integration of the ISAbal adjacent to the blaOXA-51-like gene in transformants after natural transformation of Acinetobacter spp. isolates. Agarose gel (1%) electrophoresis used for separation of the different multiplex PCR products. Lane “L” correspond to the DNA ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). Lane “Ab51” is the donor, “A118” is the recipient and “T6” and “T7” are the possible transformants. The integration of the ISAbal adjacent to the *bla*_{OXA-51}-like gene is confirmed with an amplicon size of approx. 1252 bp (Ab51).

To enlighten the *ISAbal*'s intracellular acquisition mechanism, the usual genetic environment of this insertion sequence was amplified in the donor and select transformants³³. In this assay, the recipient was used as negative control. Given the amplicon sizes (approx. 1350 bp), it was suggested that *ISAbal* was not inserted between the *folE* and the *ampC* genes in the donor, the recipient and all transformants acquired with CTX selection. In contrast, the two transformants selected with IMP showed an amplicon with approx. 2500 bp, consistent with the presence of the insertion sequence between the *folE* and the *ampC* genes (Figure 9), which was later confirmed by nucleotide sequencing of this region^{25,26}.

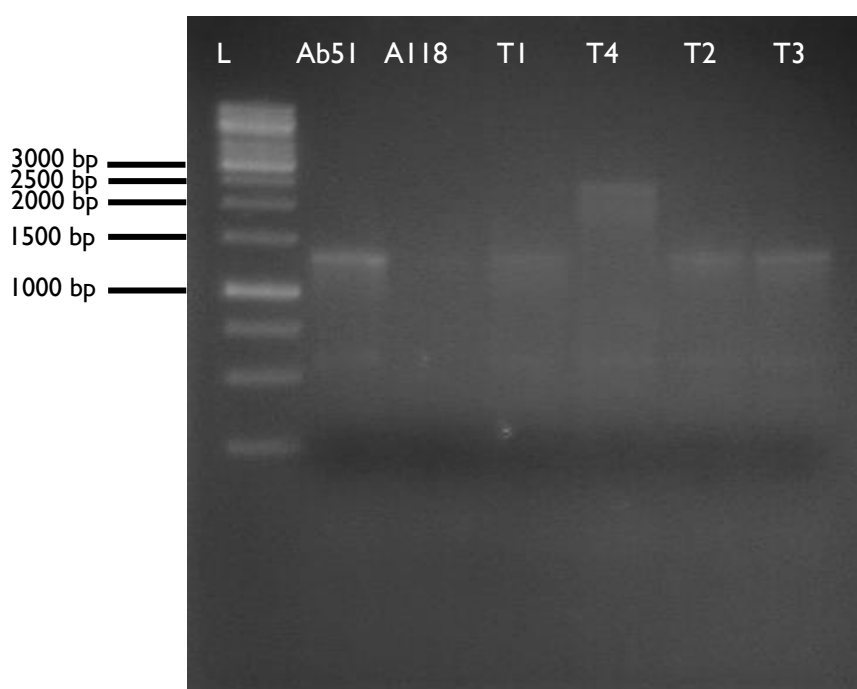


Figure 9: Example of the detection of the acquisition and insertion of *ISAbal* was between the usual *folE* and the *ampC* gene in transformants after natural transformation of *Acinetobacter* spp. isolates. Agarose gel (1%) electrophoresis used for separation of the different multiplex PCR products. Lane “L” correspond to the DNA ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). Lane “Ab51” is the donor, “A118” the recipient and “T1-T4” are referred to the possible transformants. The acquisition and insertion of *ISAbal* was between the usual *folE* and the *ampC* gene is confirmed with an amplicon size of approx. 2500 bp (T4) and its absence with an amplicon of 1350 bp (Ab51, A118 and T1-T3).

The result obtained for the transformants select with CTX suggested the *ISAbal-ampC* positive amplification might be due to a second *ampC* gene, found in the donor embedded into *Tn6168* transposon, which has been previously reported in some *A. baumannii* isolates^{33,52}. *Tn6168* was amplified in the donor and the transformants, and was absent in the recipient *A. baumannii* A118, confirming its acquisition by the transformants (Figure 10). Table 5 summarizes all the PCR-based results.

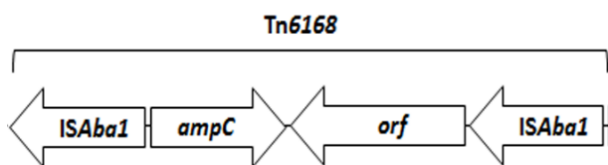


Figure 10: Structure of Tn6168 present in the donor Ab51 and transformant cells.

Table 5 – Molecular characterization of bacterial isolates.

Gene(s)	Recipient <i>A. baumannii</i> A118	Donor <i>A. baumannii</i> Ab51	Transformants ^a	
			CTX	IMP
<i>bla_{NDM}</i>	-	+	n.d.	-
<i>ISAbal</i>	-	+	+	+
<i>ISAbal - ampC</i>	-	+	+	+
<i>ISAbal - bla_{OXA-51-like}</i>	-	+	-	-
<i>folE-ISAbal - ampC</i>	-	-	-	+
Tn6168	-	+	+	-

+ gene present; - gene not present

n.d. – not determined

^aTransformants selected in cefotaxime (CTX) or imipenem (IMP)

As mentioned before, the two transformants selected with IMP acquired *ISAbal* upstream of the *ampC* gene, adjacent to the *folE* gene (Figure 11). Although there is only one report describing intracellular acquisition of DNA by transposition after uptake by natural transformation⁶¹, sequencing of this region showed that *ISAbal* was flanked by a target site duplication of 9 bp, characteristic of this insertion sequence, confirming its acquisition by transposition to this location.

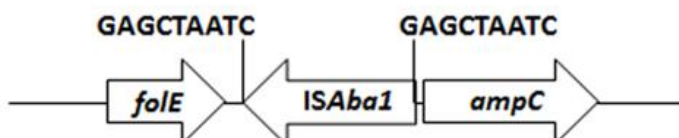


Figure 11: Genetic environment of acquired DNA by transformant cells, where *ISAbal* was acquired by transposition, with the target site duplication shown above.

In addition, *ISAbal* was inserted 9 bp away from the initiation codon of the *ampC* gene, which has been determined before only by nucleotide sequencing analysis as the specific target for *ISAbal* insertion⁶³.

As shown in previous studies, although the insertion of *ISAbal* upstream the *ampC* gene enhances the expression of the *ampC* gene, resulting in third-generation cephalosporins resistance in *A. baumannii*, it cannot explain the observed resistance to the carbapenems, such as IMP^{27,64,67}. Therefore, the mechanism responsible for IMP resistance in these two transformants has not yet been clarified.

• CONCLUSION •

Currently, there is no doubt that antimicrobial resistance is a widespread growing threat that must be controlled. Otherwise, we may face a reality where there aren't any effective therapeutic options available to fight resistant infectious diseases.

The paradigms of resistance, pathogenesis and disease dissemination are a consequence of mutations and resistance genes movement (including natural transformation) among bacterial genomes. These phenomena allow bacteria to evolve and adapt to several environments, which is a concern, particularly, in clinical settings.

Members of the *Acinetobacter* genus, as *A. baumannii*, have been emerging as nosocomial pathogens and, recently, a few clinical isolates have been described as naturally competent.

In this study, it is shown that the ability of *A. baumannii* to undergo natural transformation seems to be more frequently widespread in the clinical setting than previously thought, since the ability to develop competence was detected in a high percentage of isolates collected from all hospitals. It was also demonstrated the contribution of competence development to the spread of antimicrobial resistance genes and different mobile genetic elements in this species. In order to detect more competent bacterial strains and species, further studies should be performed to fully characterize and understand competence inducing conditions and bacterial adaptation, in particular to antimicrobial agents.

Furthermore, this study shows that horizontal transfer of chromosomal DNA fragments enables the dissemination of cephalosporin resistance in *A. baumannii*. Additionally, it proves that natural transformation of non-coding resistance determinants can modify the susceptibility profile to β -lactams in *A. baumannii* strains.

Until now, the intracellular acquisition of DNA by transposition after uptake by natural transformation was only reported once. However, it cannot explain the change in the resistance profile of the two transformants to carbapenems. Further work is needed to clarify the mechanism of this resistance acquisition.

Presently, the literature concerning natural transformation and resistance determinants is limited and, not always unanimous. Therefore, it is fundamental to conduct more studies to elucidate if other naturally competent *A. baumannii* strains share the same resistance acquisition events.

Moreover, since there is an increase of the antimicrobial susceptibility profile alterations, it should raise awareness and trigger research of new therapeutic targets and development of

new approaches to suppress virulence factors and novel strategies to manage resistance growth of pathogens in clinical settings.

Overall, this study provides experimental evidence that natural transformation plays an important role for resistance dissemination in clinical settings and should not be neglected.

• REFERENCES •

1. VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. – Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*. 7:FEB (2016) 1–10.
2. VAN DUIN, D; PATERSON, D. – Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30:2 (2016) 377–390.
3. KHAN, H. A. et al. – Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7:5 (2017) 478–482.
4. TRUBIANO, J. A.; PADIGLIONE, A. A. – Nosocomial infections in the intensive care unit. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 16:12 (2015) 598–602.
5. SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. – Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Bio Med Research International*. 2016 (2016) 1–8.
6. ESPOSITO, S; SIMONE, G. – Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. *Infezioni in Medicina*. 25:4 (2017) 301–310.
7. NAVIDINIA, M. – The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Journal of Paramedical Sciences*. 7:3 (2016) 43–57.
8. KARLOWSKY, J. A. et al. – Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia – Pacific countries: SMART 2013 – 2015. *Journal of Medical Microbiology*. 66 (2017) 61–69.
9. POGUE, J. M. et al. – Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*. 21:4 (2015) 1–31.
10. DOI, Y. et al. – *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance —treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36:1 (2015) 85–98.
11. VIEHMAN, J. A. et al. – Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*. 74:12 (2014) 1315–1333.

12. ATROUNI, A. A., et al. – Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Frontiers in Microbiology*. 7:49 (2016) 1–12.
13. DOUGHARI, H. J. et al. – The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and Environments*. 26:2 (2011) 101–112.
14. SILVA, G.; DOMINGUES, S. – Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 4:29 (2016) 1–23.
15. VAN, T. D. et al. – Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains isolated from a referral hospital in northern Vietnam. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2:4 (2014) 318–321.
16. HOWARD, A. et al. – *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 3:3 (2012) 243–250.
17. MANCHANDA, V., et al. – Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2:3 (2010) 291–305.
18. VAN LOOVEREN, M. et al. – Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *CliniMicrobiol Infect*. 10:8 (2004) 684–70.
19. PARK, S. Y. et al. – Risk factors for mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infect. Chemother*. 45:3 (2013) 325–330.
20. HARDING, C. M. et al. – Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*. 16:2 (2017) 1–12.
21. DIJKSHOORN, L. et al. – An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*. 5:12 (2007) 939–951.
22. VILLAR, M. et al. – Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection. *Medicine*. 93:5 (2014) 202–210.
23. ANTUNES, L. C. S. et al. – *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*. 71:3 (2014) 292–301.

24. MAGIORAKOS, A. et al. – Bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiology*. 18:3 (2011) 268–281.
25. CORVEC, S. et al. – *AmpC* cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52:4 (2003) 629–635.
26. HAMIDIAN, M. et al. – Horizontal transfer of an *ISAbal25*-activated *ampC* gene between *Acinetobacter baumannii* strains leading to cephalosporin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68:1 (2013) 244–245.
27. HÉRITIER, C. et al. – Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 12:2 (2006) 123–130.
28. TURTON, J. F. et al. – Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:8 (2006) 2974–2976.
29. IACONO, M. et al. – Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52:7 (2008) 2616–2625.
30. DOUGAN, G. et al. – Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone I. *Microbial Genomics*. 2:2 (2016) 1–16.
31. HAMIDIAN, M.; HALL, R. M. – *Tn6168*, a transposon carrying an *ISAbal*-activated *ampC* gene and conferring cephalosporin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69:1 (2014) 77–80.
32. KAMOLVIT, W. et al. – Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *Acinetobacter* spp. in Asia and Oceania. *Microbial Drug Resistance*. 21:4 (2015) 424–434.
33. CHANDOLA, P. et al. – Molecular detection of *bla*_{NDM-1} (New Delhi metalloβ-lactamase-I) in nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates by nested, multiplex polymerase chain reaction. *Medical Journal Armed Forces India*. 74:2 (2018) 108–115.
34. DORTET, L. et al. - Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Research International*. 2014 (2014) 1–12.

35. World Health Organization – Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. WHO. (2017). [Accessed in: 15 of march 2018]. Available in: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
36. D’COSTA, V. M. et al. – Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477:7365 (2011) 457–461.
37. PERRON, G. G. et al. – Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS ONE*. 10:3 (2015) 1–19.
38. JUHAS, M. – Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*. 41:1 (2015) 101–108.
39. BLOKESCH, M. – Natural competence for transformation. *Current Biology*. 26:21 (2016) R1126–R1130.
40. BROADERS, E. et al. – Mobile genetic elements of the human gastrointestinal tract: potential for spread of antibiotic resistance genes. *Gut microbes*. 4:4 (2013) 271–280.
41. GYLES, C.; BOERLIN, P. – Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Veterinary Pathology*. 51:2 (2014) 328–340.
42. SOUCY, S. M. et al – Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*. 16:8 (2015) 472–482.
43. FFRENCH-CONSTANT, R. H.; BASS, C. – Does resistance really carry a fitness cost? *Current Opinion in Insect Science*. 21 (2017) 39–46.
44. MELNYK, A. H. et al – The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*. 8:3 (2015) 273–283.
45. JOHNSBORG, O. et al. – Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*. 158:10 (2007) 767–778.
46. MAO, J.; LU, T. – Population-dynamic modeling of bacterial horizontal gene transfer by natural transformation. *Biophysical Journal*. 110:1 (2016) 258–268.

47. MELL, J. C; REDFIELD, R, J. – Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *Journal of Bacteriology*. 196:8 (2014) 1471–1483.
48. NIELSEN, K. M. et al. – Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*. 6:1 (2007) 37–53.
49. LEONG, C. G. et al. – The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi*. *PLoS ONE* 12:8 (2017) 1–25.
50. HARDING, C. M. et al. – *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV Pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *mBio* 4:4 (2013) 1–10.
51. PIEPENBRINK, K. H. et al. – Structural diversity in the type IV pili of multidrug-resistant *Acinetobacter*. *Journal of Biological Chemistry*. 291:44 (2016) 22924–22935.
52. WILHARM, G. et al. – DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of Bacteriology*. 195:18 (2013) 4146–4153.
53. MUSCHIOL, S. et al. – Uptake of extracellular DNA: competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *BioEssays*. 37:4 (2015) 426–435.
54. DOMINGUES, S.; NIELSEN, K. M. – Horizontal gene transfer: Uptake of extracellular DNA by bacteria. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99485-6>.
55. THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. – Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 3:9 (2005) 711–721.
56. RAMIREZ, M. S. et al. – Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:4 (2010) 1488–1490.
57. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0. EUCAST. (2018). [Accessed in: 23 of april 2018]. Available in: <http://www.eucast.org>
58. GODEUX, A. et al. – Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*. (2018) 1–16.

59. TRAGLIA, G. M. et al. – Serum albumin and Ca²⁺ are natural competence inducers in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60:8 (2016) 4920–4929.
60. AMIN, I. M. et al. – A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*. 13:58 (2013) 1–14.
61. DOMINGUES, S. et al. – Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathogens*. 8:8 (2012) 1–15.
62. POIREL L., et al. – Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life*. 63:12 (2011) 1061–1067.
63. HAMIDIAN, M; HALL, R. M. – *ISAbal* targets a specific position upstream of the intrinsic *ampC* gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68:11 (2013) 2682–2683.
64. BOU, G.; MARTINEZ-BELTRAN, J. – Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an *ampC* beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2 (2000) 428–432.
65. DANES, C. et al. – Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (*ampC* inhibitor) on the MICs of different β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50:3 (2002) 261–264.
66. KIM, E. et al. – Structural basis for enhancement of carbapenemase activity in the OXA-51 family of class D β -lactamases. *ACS Chem Biol*. 10:8 (2016) 1791–1796.
67. HSIEH, W. S. et al. – Types and prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in northern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:1 (2014) 201–204.
68. TURTON, J. F. et al. – The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*. 258:1 (2006) 72–77.
69. POIREL, L.; NORDMANN, P. – Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:9 (2006) 826–836.