



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marta Filipa Grilo Matias

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da emergência de resistência à colistina mediada por plasmídeos em *Escherichia coli*” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob a orientação da Dra. Ana Rita Fernandes e Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marta Filipa Grilo Matias

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da emergência de resistência à colistina mediada por plasmídeos em *Escherichia coli*” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob a orientação da Dra. Ana Rita Fernandes e Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020

Eu, Marta Filipa Grilo Matias, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com n.º 2015236505, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da emergência de resistência à colistina mediada por plasmídeos em *Escherichia coli*” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 21 de setembro de 2020.



(Marta Filipa Grilo Matias)

Agradecimentos

Primeiramente, aos meus pais e irmã, sem vocês nada disto teria sido possível. Esta vitória não é minha, é nossa! Um obrigada nunca será suficiente para agradecer tudo o que fizeram por mim.

À Professora Doutora Sara Domingues, pelo apoio, orientação e prontidão em todas as fases da elaboração da Monografia.

A toda a equipa da Farmácia Saúde, por todo o conhecimento transmitido, oportunidades, bons momentos passados e por me terem ensinado o que é ser farmacêutica. Começa agora uma nova etapa, com a certeza de que cada um de vocês marcou de forma indiscutível a profissional que vou ser no futuro.

A toda a minha família, por terem sempre acreditado em mim e me terem dado a força e apoio necessários em cada etapa do meu percurso.

À estrelinha, que sei que tive sempre a torcer por mim. Estarás eternamente no meu coração.

Aos amigos de sempre, por estarem sempre lá.

Aos amigos de Coimbra, por terem tornado esta viagem muito mais mágica e memorável. Serão sempre inesquecíveis.

A ti, Jota, por seres quem és.

À minha família de praxe, à minha madrinha e às minhas afilhadas, que inevitavelmente são uma parte muito importante deste percurso. Obrigada Ninfas por todos os momentos.

Porque somos feitos de momentos e pessoas, a todas as pessoas com que me cruzei neste caminho, nas mais variadas situações, e que de alguma forma partilharam algo comigo, muito obrigada.

A Coimbra, por ser uma cidade que nos permite crescer e aprender a viver, obrigada por estes cinco anos. O teu pôr-do-sol será sempre diferente.

ÍNDICE

Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. Introdução.....	10
2. Contextualização do local de estágio	11
3. Análise SWOT	12
3.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	12
3.1.1. O estágio como parte integrante do plano curricular de MICF	12
3.1.2. O plano de estágio delineado pela farmácia	13
3.1.3. A localização da farmácia	13
3.1.4. A equipa da farmácia.....	14
3.1.5. Número de referências elevado e diversificado	14
3.1.6. A organização da farmácia	15
3.1.7. Serviços prestados.....	16
3.1.8. Aconselhamento farmacêutico diferenciador	17
3.1.9. <i>Sifarma</i> [®]	18
3.1.10. Histórico na ficha de utente	18
3.1.11. Medicamentos Manipulados.....	19
3.1.12. Investigação e Desenvolvimento de formulações galénicas.....	20
3.1.13. Realização de trabalhos.....	21
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	22
3.2.1. Lacunas no plano curricular do MICF.....	22
3.2.2. Insegurança e medo de errar	22
3.2.3. Estágio em tempo de pandemia.....	23
3.2.4. Desconhecimento dos nomes de marca	23
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	24
3.3.1. Formações e contínua aprendizagem.....	24
3.3.2. Educação da população em tempo de pandemia.....	24
3.3.3. Cedência de medicamentos hospitalares	25
3.3.4. Modelos de Prescrição Médica.....	26
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>)	27
3.4.1. Locais de venda de MNSRM e outros produtos de saúde.....	27
3.4.2. Inadvertida cedência de MSRMs, sem receita, noutras farmácias.....	29
3.4.3. Medicamentos Genéricos: dúvidas e (não) aceitação dos utentes.....	30
3.4.4. Constante aparecimento de novas referências.....	31
3.4.5. A <i>internet</i> como fonte de (des)informação	32
3.4.6. Estágio em tempo de pandemia.....	33
3.4.7. Temas tabu e dificuldade no correto aconselhamento	33
4. Intervenção Farmacêutica – Casos Práticos	35
5. Considerações Finais.....	41
Referências Bibliográficas.....	42
Anexo - TABELA ANTIBIÓTICOS.....	44

Parte II - Avaliação da emergência de resistência à colistina mediada por plasmídeos em *Escherichia coli*

LISTA DE ABREVIATURAS	48
Resumo	49
Abstract	50
1. “One Health”	51
2. Antibióticos, a revolução terapêutica do século XX	52
2.1. As resistências aos antibióticos.....	53
3. Antibióticos de última linha: a colistina.....	55
3.1. Mecanismo de ação da colistina.....	56
3.1.1. Espectro de ação da colistina.....	56
3.2. Resistência adquirida à colistina.....	57
3.2.1. Resistência cromossomal à colistina	59
3.2.2. Resistência plasmídica à colistina	60
3.3. Custo biológico da resistência à colistina.....	61
4. Detecção de resistência à colistina	63
4.1. Métodos fenotípicos	63
4.2. Métodos genotípicos	64
5. Trabalho experimental.....	66
5.1. Origem das amostras	66
5.2. Material biológico.....	66
5.3. Pesquisa de genes <i>mcr</i>	66
5.3.1. Amplificação do DNA – PCR <i>multiplex</i>	67
5.3.2. Detecção de resultados – Eletroforese.....	68
5.4. Sequenciação	68
5.4.1. Purificação das amostras.....	68
5.4.2. Sequenciação pelo Método de Sanger	69
5.5. Resultados e conclusões.....	70
6. Conclusão	72
Referências Bibliográficas.....	74

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Saúde, Figueira da Foz

LISTA DE ABREVIATURAS

API – Princípio Ativo

BIL – Bilirrubina

BLD – Eritrócitos

COE – Contraceção Oral de Emergência

CT – Colesterol Total

DCI – Denominação Comum Internacional

DIM – Delegados de Informação Médica

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GLU – Glucose

HbA1c – Hemoglobina Glicada

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

I&D – Investigação e Desenvolvimento

INR – *International Normalized Ratio*

KET – Cetonas

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LEU – Leucócitos

MG – Medicamento Genérico

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

MSRMV – Medicamento Sujeito a Receita Médico-Veterinária

NEF/AAC – Núcleo de Estudantes de Farmácia da Associação Académica de Coimbra

NIT – Nitritos

PIM – Preparação Individualizada da Medicação

PRO – Proteína

SG – Gravidade Específica

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TEV – Tromboembolismo Venoso

TG – Triglicéridos

UBG – Urobilinogénio

I. Introdução

Os profissionais de saúde e os estabelecimentos de saúde são, inegavelmente, partes insubstituíveis para a promoção e manutenção da saúde pública.

Tendo em conta a facilidade de acesso às farmácias, estas são pilares imprescindíveis para um serviço de saúde de qualidade representando, muitas vezes, o primeiro local onde os portugueses se deslocam quando apresentam algum problema de saúde.

O farmacêutico é o especialista do medicamento e a sua intervenção tem um impacto significativo em várias áreas, podendo destacar-se a melhoria da adesão terapêutica e a intervenção em doenças e terapêuticas crónicas. Assim, a ação farmacêutica representa, indiretamente, poupanças financeiras que se traduzem, concretamente, por exemplo, em poupanças em consultas, em Centros de Saúde e Hospitais, em internamentos hospitalares, em urgências hospitalares e no desperdício de medicamentos. (1)

Conforme enunciado na Diretiva 2013/55/EU de 20 de Novembro 2013, Artigo 44º, n.º2, a formação do farmacêutico baseia-se em cinco anos de aprendizagem em entidade de ensino superior, com um mínimo de quatro anos de formação teórica e prática e seis meses de estágio em farmácia aberta ao público ou num hospital. (2) Assim, a realização do estágio curricular, além de uma obrigatoriedade, é uma oportunidade essencial para uma correta e completa formação, preparando da melhor forma possível os futuros farmacêuticos. Na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), a realização do estágio é a etapa final e última unidade curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

O meu estágio foi realizado unicamente em Farmácia Comunitária, na Farmácia Saúde, Lda. da Figueira da Foz, de fevereiro a setembro de 2020, num total de 810 horas, sob orientação da Dra. Ana Rita Fernandes.

No presente documento está apresentada a minha análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) ao meu estágio curricular, avaliando os Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) que, de certa forma, influenciaram esta última etapa da minha formação académica.

2. Contextualização do local de estágio

Informações Gerais	
Nome e logotipo	Farmácia Saúde, Lda. 
Localização	Centro Comercial Atlântico, Loja 7 Rotunda João Alves 3080-510 - Figueira da Foz
Horário de Funcionamento	Segunda a sábado: 9:00h às 20:00h Domingos e Feriados: 9:00h às 13:00h Julho e Agosto Segunda a domingo: 9:00h às 20:00h
Contactos	Telefone: 233 422 534 e-mail: geral@farmaciasaude.pt Site: farmaciasaude.pt
Funcionários	
Proprietários	Anabela Mascarenhas Flávio Maia
Direção Técnica	Anabela Mascarenhas
Farmacêuticos Substitutos	Ana Rita Fernandes Nélio Oliveira
Farmacêuticos	Aline Soares Ana Cabral Joana Santos Marta Dias Mónica Sousa
Técnicos de Farmácia	Diana Pereira Diana Silva Paulo Silva Tânia Claro Tiago Monteiro
Técnicos Auxiliares de Farmácia	Fernanda Marques Paula Santos
Estagiários	Ana Cardoso Andreia Cardoso Irina Fernandes
Técnicos Indiferenciados	Deonilde Fernandes Soraya Schneider

3. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) é uma ferramenta que permite uma observação de uma situação, empresa ou pessoa, avaliando e balanceando os Fatores Internos e Fatores Externos, Positivos e Negativos. Na Tabela I, abaixo apresentada, estão representados os quatro pontos analisados, de acordo com a sua gênese Interna/Externa, Positivo/Negativo.

Tabela I - Análise SWOT.

	Fatores Positivos	Fatores Negativos
Fatores internos	Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)
Fatores externos	Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	Ameaças (<i>Threats</i>)

Na análise SWOT feita relativamente ao meu estágio, abaixo apresentada, considerei como:

- Pontos Fortes (*Strengths*) – as características da farmácia ou do MICF que beneficiaram, de alguma forma, o meu estágio e a minha aprendizagem;
- Pontos Fracos (*Weaknesses*) – as características da farmácia ou do MICF que dificultaram, de alguma forma, o meu estágio e a minha aprendizagem;
- Oportunidades (*Opportunities*) – situações, características ou ocorrências, externas à farmácia ou ao MICF, que de alguma forma, se demonstraram como mais-valias e beneficiaram o meu estágio e a minha aprendizagem;
- Ameaças (*Threats*) – situações, características ou ocorrências, externas à farmácia ou ao MICF que, de alguma forma, se demonstraram como negativas ou que colocaram em risco o meu estágio e a minha aprendizagem.

3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

3.1.1. O estágio como parte integrante do plano curricular de MICF

O tempo de estudo e aprendizagem em ambiente académico estabelece bases essenciais para que sejamos profissionais de saúde qualificados e informados. No entanto, em nada se assemelha à realidade do mundo profissional. Assim, é excecional, e de extrema importância, a existência de um estágio como parte integrante do nosso plano curricular do MICF.

Ainda que considere que este estágio deveria ter uma maior duração, julgo 2 semestres, acho fundamental este contacto com a realidade do que vai ser (possivelmente) a nossa vida profissional. Esta aprendizagem permite que a nossa formação seja mais completa, tateando áreas que não seriam possíveis de abordar em ambiente académico, bem como a consolidação e aplicação dos conhecimentos e temas abordados ao longo do MICF.

3.1.2. O plano de estágio delineado pela farmácia

Na Farmácia Saúde os estágios seguem um plano estipulado pela própria farmácia. Este plano, consiste em 3 fases. No primeiro mês, o estagiário está em trabalho de *backoffice*, com a receção de encomendas, armazenamento dos produtos, etc., o que permite um maior contacto com as embalagens, nomes comerciais e os locais onde estão os medicamentos. Numa segunda fase, é feito um trabalho de “sombra”, que consiste na observação dos atendimentos dos funcionários da farmácia, para percebermos quais os procedimentos a seguir, o tipo de aconselhamento a ser feito, quais as perguntas essenciais e imprescindíveis para uma correta dispensa de medicamentos ou outros produtos de saúde. Esta fase dura entre 15 dias a 3 semanas. Numa fase final é o estagiário que passa a fazer os atendimentos, sempre salvaguardando que nos balcões adjacentes estejam funcionários da farmácia, para que nos possam sempre auxiliar em qualquer tipo de dúvida ou situação. Daí em diante, além do atendimento ao público, outras atividades são também desenvolvidas, como por exemplo a preparação de medicamentos manipulados, Preparação Individualizada da Medicação (PIM) e testes analíticos.

Considero que este plano deveria ser até um modelo a seguir e sugerido pela faculdade pois está extremamente bem organizado e me permitiu ir, lentamente, assimilando qual o funcionamento da farmácia, conhecer os medicamentos e todo o contexto de farmácia comunitária.

3.1.3. A localização da farmácia

A Farmácia Saúde está localizada num centro comercial da zona urbana da Figueira da Foz, com acesso a parque de estacionamento, coberto e ao ar livre, e ainda a um supermercado e outros estabelecimentos comerciais. Tendo em conta estes fatores, a deslocação à farmácia torna-se bastante conveniente, pelo que a heterogeneidade da população que frequenta a mesma é evidente.

Quando começamos a entrar nos meses de Verão, tendo em conta que a Figueira da Foz é uma cidade turística, começa a haver mais afluência também de veraneantes.

A elevada afluência e a heterogeneidade de casos foram fatores extremamente positivos e vantajosos no meu estágio, pois permitiram-me contactar com diferentes realidades e situações. No início é um pouco intimidante, mas com o apoio dos funcionários da farmácia, acaba por se tornar um desafio e um ponto bastante positivo e enriquecedor. Como cada caso é um caso, o aconselhamento, seja na área de puericultura, dermocosmética, Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), ortopedia, suplementos alimentares, etc., para cada utente é diferente, o que me permitiu contactar na mesma área, com vários produtos, de gamas diferentes, tornando-se bastante enriquecedor este processo de aprendizagem.

3.1.4. A equipa da farmácia

A equipa da Farmácia Saúde é uma equipa grande, constituída por profissionais de várias áreas de formação, como Farmacêuticos, Técnicos de Farmácia e Técnicos Auxiliares de Farmácia. É uma equipa jovem, dinâmica e que, desde o primeiro dia, nos fazem sentir “em casa”. Há sempre lugar a colocar as nossas dúvidas e é-nos permanentemente prestado o auxílio que precisamos, tornando o processo de aprendizagem menos intimidante.

O bom ambiente e relacionamento com todos permite uma aprendizagem mais proveitosa e positiva e considero que todos estes fatores tornaram a minha integração e formação bastante mais fácil.

3.1.5. Número de referências elevado e diversificado

A Farmácia Saúde é uma das maiores farmácias da Figueira da Foz e que, conforme já referido, tem uma população bastante heterogénea. Desta forma, o número de referências da farmácia é consideravelmente elevado, desde o número de laboratórios de medicamentos genéricos com que trabalha, às várias marcas dos mais diversos produtos de saúde.

Este é um fator diferenciador da Farmácia Saúde e foi um ponto bastante positivo no meu estágio. Foi-me, desta forma, possível explorar e conhecer vários produtos e ampliar o meu conhecimento, principalmente em áreas como a dermocosmética, puericultura, ortopedia, veterinária e suplementos alimentares.

A maioria do *stock* da Farmácia Saúde é adquirido através de armazéns grossistas, sendo o seu principal fornecedor a *Alliance Healthcare*. Os outros distribuidores que trabalham com a

farmácia são a *Plural – Cooperativa Farmacêutica*, a *Proquifa – Sociedade Química Farmacêutica do Centro, Lda.*, a *Cooprofar Farmácia – Cooperativa dos Proprietários de Farmácia* e a *Empifarma – Produtos Farmacêuticos, S.A.* Para determinados produtos e em determinadas circunstâncias, como por exemplo tendo em conta a sua elevada rotatividade ou indisponibilidade nos fornecedores habituais, são também efetuadas compras diretas aos laboratórios, por vezes através dos seus Delegados de Informação Médica (DIM).

Por haver utentes com distintas necessidades e algumas vezes com situações clínicas muito específicas, mesmo que a referência que o utente necessita não faça parte do *stock* da farmácia, tenta-se sempre encomendar e satisfazer as necessidades do mesmo. A maioria destes pedidos diretos é efetuado ao balcão através da plataforma *business-to-business*. Desta forma, a procura de referências não diretamente trabalhadas na farmácia, permitiu-me ir mais além e adquirir mais conhecimentos de produtos de saúde que, ainda que não sejam bastante conhecidos ou utilizados, são produtos farmacêuticos, que são absolutamente necessários para determinadas situações clínicas.

3.1.6. A organização da farmácia

Um dos pontos que me ajudou no estágio foi a organização dos produtos na farmácia uma vez que, conforme já referido, havendo um vasto leque de referências de produtos, a organização é um ponto-chave. Assim, após o rececionamento das encomendas, os produtos nelas constantes são arrumados nas gavetas ou prateleiras respetivas.

A publicidade segue regras estipuladas no Decreto-Lei n.º 330/90 de 23 de Outubro (3). Desta forma, os produtos expostos à vista do utente no exterior da farmácia são, essencialmente, suplementos alimentares, Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e outros produtos de saúde como por exemplo, cosméticos e artigos de puericultura e ortopedia. Estes produtos estão expostos segundo estratégias de *marketing* e de acordo com a época do ano em prateleiras, gôndolas e lineares.

No interior da farmácia a disposição dos medicamentos está dividida em prateleiras e gavetas, verticais e horizontais, onde:

- Os comprimidos e cápsulas sujeitos a receita médica encontram-se arrumados segundo a Denominação Comum Internacional (DCI), por ordem alfabética, em gavetas verticais. Outros medicamentos encontram-se organizados identicamente em gavetas verticais, mas

por categorias, como pomadas, pós, injetáveis, gotas orais/nasais/auriculares, produtos de uso externo, ginecológicos e antiasmáticos, por ordem alfabética do nome comercial.

- As gavetas horizontais da farmácia acomodam separadamente gotas e pomadas oftálmicas, produtos do protocolo da diabetes, Medicamentos Sujeitos a Receita Médica Veterinária (MSRMV) e alguns Suplementos Alimentares.
- Xaropes e pós para preparação de suspensões orais são armazenados por ordem alfabética do seu nome comercial em prateleiras horizontais.
- Os produtos termolábeis são armazenados em frigorífico controlado.
- Os MNSRM que não são expostos no exterior da farmácia e outros produtos como champôs, cosméticos, etc., e ainda produtos de maior rotatividade são armazenados em prateleiras horizontais.
- Produtos reservados são armazenados em gavetas horizontais, junto à zona de receção de encomendas, separados dos produtos de stock e devidamente identificados com talão de reserva, que indica o nome e contacto do utente ao qual se destinam.

3.1.7. Serviços prestados

O farmacêutico tem formação para que consiga fazer a análise, interpretação e avaliação de alguns parâmetros bioquímicos e laboratoriais.

Na Farmácia Saúde o utente pode realizar diversos testes bioquímicos que permitem uma facilidade no seguimento de algumas patologias. Muitos utentes, optam por fazer este acompanhamento na farmácia, por se tratar de um local em que, muitas vezes, como já conhecem os profissionais de saúde que ali trabalham, têm confiança e à vontade com os mesmos.

As medições e testes realizados na farmácia são:

- **Medição da pressão arterial**

Esta é uma medição bastante simples em que, recorrendo a um tensiómetro eletrónico, se conseguem obter os valores da pressão arterial sistólica e diastólica do utente. Este é, talvez, o teste mais realizado e procurado pelos utentes da farmácia, dada a elevada prevalência de doentes hipertensos que, assim, fazem um acompanhamento e controlo dos seus valores de pressão arterial.

- **Medição da Glicémia**

Este é um teste simples em que são medidos e avaliados os valores de glicémia no sangue, recorrendo a uma picada e recolha de uma pequena gota de sangue capilar e medição no glicosímetro.

- **Accutrend® Plus**

Este é um aparelho que permite, através da recolha e análise de uma gota de sangue capilar, avaliar o valor de Colesterol Total (CT) do utente.

- **CoaguCheck XS®**

Este aparelho permite, mediante recolha de uma porção de sangue capilar, avaliar o *International Normalized Ratio* (INR) do utente. O valor de INR reflete o tempo que o sangue demora a coagular e, por esse motivo, este é um teste essencialmente procurado por utentes que fazem terapêutica anticoagulante oral.

- **Cobas b101®**

Este aparelho permite, mediante recolha de uma porção de sangue capilar, determinar, consoante as tiras de teste usadas, o perfil lipídico completo do utente, obtendo-se os valores de CT, Triglicéridos (TG), Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), e a Hemoglobina Glicada (HbA1c).

- **Urisys 1100®**

Este equipamento permite fazer uma análise quantitativa aos parâmetros da urina avaliados no *Combur-test®*, como Gravidade específica (SG), pH, Leucócitos (LEU), Nitritos (NIT), Proteína (PRO), Glucose (GLU), Cetonas (KET), Urobilinogénio (UBG), Bilirrubina (BIL) e Eritrócitos (BLD). A avaliação quantitativa dos parâmetros permite que os resultados e conclusões tiradas sejam muito mais rigorosas, comparativamente com uma simples observação qualitativa pelas variações de cor da tira.

Este teste é bastante procurado por mulheres que, quando sentem qualquer tipo de irritação a nível urinário, pretendem saber se estão com infeção urinária e assim perceberem se terão de procurar ajuda médica.

3.1.8. Aconselhamento farmacêutico diferenciador

Na Farmácia Saúde há, sempre, um cuidado no aconselhamento e dispensa de medicamentos, suplementos ou produtos de saúde aos utentes. Este cuidado é um fator diferenciador e que

os utentes reconhecem e muitos deles esperam e, inclusivamente, procuram exatamente isso ao dirigirem-se a esta farmácia em específico.

Considero que esta componente formativa foi um ponto extremamente positivo para que pudesse, efetivamente, num futuro próximo, desempenhar a profissão farmacêutica, da melhor forma possível.

3.1.9. Sifarma®

O *Sifarma®* é um *software* de gestão e atendimento desenvolvido pela *Glintt* e que é utilizado em 90% das Farmácias em Portugal. (4)

Ao longo do MICF, já me tinha sido possível contactar com este programa, quer em unidades curriculares, como em formações promovidas pelo Núcleo de Estudantes da Faculdade de Farmácia da Associação Académica de Coimbra (NEF/AAC), assim como no estágio extracurricular que tinha realizado.

O facto de a Farmácia Saúde utilizar este *software* foi um ponto duplamente positivo pois, não só me permitiu ter formação naquele que será o programa mais facilmente encontrado em qualquer farmácia do país, como este não me era totalmente e absolutamente desconhecido.

3.1.10. Histórico na ficha de utente

Na Farmácia Saúde o histórico dos utentes é bastante completo pois qualquer venda que seja feita é, sempre que possível, registada na ficha de utente.

Considero que é bastante importante e pertinente este tipo de registo, por vários motivos. No que toca ao registo de todos os levantamentos de medicação do utente julgo que é de extrema importância pois, não raras vezes, os utentes acabam a medicação primeiro do que obtêm novas receitas e, durante a fase de pandemia, este cenário agravou-se. Assim, por exemplo, ao fazer-se uma venda suspensa tem-se a certeza de qual o medicamento e a dose que o utente efetivamente faz. Esporadicamente durante o estágio ocorreu que este registo serviu também para detetar erros de prescrição, como casos em que a dose ou a forma farmacêutica que vem prescrita na receita nova é, despropositadamente, diferente da última que o utente levantou. Neste caso, a consulta do histórico, permite-nos prevenir erros na medicação do utente.

A informação relativa aos laboratórios é também bastante significativa pois, desta forma, conseguimos dar sempre a medicação igual ao utente. Isto torna-se bastante importante,

especialmente nos utentes mais idosos que confundem facilmente a medicação se as caixas forem alteradas, ou aqueles que não sabem ler.

O registo é também uma ajuda excelente quando o utente refere que comprou na farmácia uns comprimidos, uma pomada, etc. com que se deu muito bem, e que, por exemplo, não se recorda do nome. Aí a consulta do histórico agiliza e facilita a dispensa e o atendimento.

Este registo rigoroso e criterioso permitiu-me ter outra segurança ao balcão, pois considero que é uma ferramenta essencial para minorar os possíveis erros no atendimento.

3.1.1.1. Medicamentos Manipulados

A Farmácia e a Medicina estiveram desde sempre intimamente ligadas com a farmácia de manipulação. Ainda antes do aparecimento das primeiras indústrias farmacêuticas os medicamentos eram, cuidadosamente, preparados nas farmácias pelos boticários.

Com o passar dos anos e a evolução do Mundo, da Medicina e da Farmácia, os medicamentos passaram a ser produzidos em grandes quantidades, em doses pré-estabelecidas, a preços bastantes mais apetecíveis, com distribuição a nível mundial. O acesso aos medicamentos passou a ser mais generalizado e facilitado. No entanto, por vezes, existem lacunas e a Indústria Farmacêutica não consegue acomodar a produção de medicamentos raramente necessários ou demasiado específicos.

Tal como descrito no Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de Abril, um “Medicamento manipulado” é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. (5) O farmacêutico é o especialista do medicamento e tem, portanto, o conhecimento e a habilitação legal para colmatar as falhas existentes e assim ter um papel preponderante para o bem-estar e saúde da população.

Derivado das obrigações legais intrínsecas a um laboratório com as condições adequadas para a preparação de medicamentos manipulados, o custo elevado de um medicamento deste tipo, o elevado número de referências já disponíveis no mercado e ainda algum desconhecimento médico de que há a hipótese de prescrever além das referências industriais, a manipulação encontra-se, hoje, um pouco “apagada” na grande maioria das farmácias em Portugal. Na Farmácia Saúde há, no entanto, uma grande aposta nesta área, por se valorizar a necessidade de colmatar as falhas existentes, além da personalização, consoante as necessidades específicas de cada indivíduo.

A Farmácia Saúde tem, assim, hoje, um largo portfólio de medicamentos manipulados produzidos no seu laboratório. Diariamente são vários os utentes para os quais se faz a preparação de medicamentos essenciais para os seus tratamentos. São ainda preparados no laboratório um conjunto de outros produtos de saúde como, por exemplo, suplementos alimentares, tratamentos tópicos não medicamentosos ou cuidados dentários, como pasta de dentes.

Tive a oportunidade de preparar, neste laboratório, Solução de aplicação tópica de minoxidil 5% em Trichosol[®], creme de rosto hidratante para eczema atópico para uma utente não controlada com nenhum creme comercial, cápsulas de minoxidil, entre outros. Uma vez entrados em fase de pandemia e com a ausência de álcool 70% v/v e álcool gel no mercado, desde uma fase muito precoce, que se começaram a manipular estes dois produtos no laboratório da farmácia, produção em que tive a oportunidade de estar diretamente envolvida. Acompanhei igualmente o preenchimento da ficha de preparação dos produtos manipulados, o controlo de qualidade e elaboração dos rótulos dos mesmos.

Considero que esta componente de manipulação da Farmácia Saúde me permitiu ter um conhecimento mais profundo sobre os princípios ativos (API's), os excipientes, possíveis interações, a importância da fórmula farmacêutica ou mesmo do embalamento dos medicamentos.

3.1.12. Investigação e Desenvolvimento de formulações galénicas

Agregado à componente de manipulação no laboratório da Farmácia Saúde, foi-me dada a oportunidade de explorar uma grande paixão minha. A ecologia está presente na minha vida em várias vertentes e, desde cedo, percebi que a luta por um planeta melhor era um valor partilhado com a Farmácia Saúde e com a diretora técnica, Dra. Anabela Mascarenhas.

Estima-se que, anualmente, 4,8 a 12,7 milhões de toneladas de plástico são deitados ao mar. (6) Movidos pelo pensamento de que se todos fizermos uma pequena coisa a mudança acontece, foram-me abertas as portas do laboratório para que desenvolvesse uma formulação sólida que substituísse o champô convencional e assim, as embalagens plásticas dos mesmos.

Já utilizava champô sólido há 4 anos e abracei este desafio com muito carinho, contando com a ajuda e experiência imprescindíveis da Farmacêutica Aline Soares. Conseguimos uma formulação bastante apreciada pelos utentes, um “Sabonete corpo e cabelo”, com pH adequado para ser utilizado tanto no cabelo como no corpo, formulado unicamente com

ingredientes naturais e aromatizado com o cheiro característico de Tavadrede, localidade onde está inserida a Farmácia Saúde, o limonete. Associado ao champô sólido e na linha da sustentabilidade foi também desenvolvido um bálsamo labial, tal-qualmente somente com ingredientes naturais e biológicos, acondicionado em lata de alumínio, um material reutilizável e eternamente reciclável.

Desde a investigação por detrás dos ingredientes, aos fornecedores, aos testes, e até chegar à formulação certa, um verdadeiro trabalho de investigação e desenvolvimento foi feito. Desta forma, todo este processo permitiu-me explorar e adquirir conhecimentos e competências que anteriormente me eram totalmente desconhecidos. Considero que esta foi uma das etapas mais importantes e gratificantes do meu estágio, pois permitiu-me aliar duas paixões, a ecologia, e o ser farmacêutica, ao desenvolver uma linha de produtos que passaram a constar das referências vendidas na farmácia.

3.1.13. Realização de trabalhos

Durante o meu estágio foi também incentivada a realização de trabalhos que permitissem uma melhor aprendizagem e consolidação de conhecimentos. Eu, em conjunto com outra estagiária que estava a realizar o estágio ao mesmo tempo, elaborei uma Tabela com todos os antibióticos comercializados em Farmácia Comunitária em Portugal, em todas as suas formas farmacêuticas, indicando se deveriam ser tomados em jejum ou com alimentos. A tabela, apresentada como Anexo I do presente documento, foi posteriormente disponibilizada na Farmácia Saúde para consulta da equipa.

A realização deste trabalho foi logo no início do estágio e permitiu-me um conhecimento maior e mais aprofundado dos antibióticos, um tema intimamente ligado com a minha monografia. Consegui assim ter uma noção mais abrangente do que aconselhar ao balcão, perante uma prescrição médica de antibióticos, com maior facilidade, além de explorar mais profundamente as plataformas de informação sobre medicamentos, como o *Infomed* e o *Prontuário Terapêutico*, assim como o *Sifarma*[®].

Considero que esta iniciativa da Farmácia Saúde é uma forma de aprendizagem bastante interessante, pois há um envolvimento direto do estagiário num trabalho relevante e com aplicabilidade posterior no dia-a-dia, para ele e para a farmácia.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Lacunas no plano curricular do MICF

Quando iniciamos o estágio deparamo-nos com imensa informação e produtos, cuja grande maioria nunca tínhamos contactado. Conforme já referido acima, o estágio, sendo parte integrante do MICF, é uma grande mais-valia e um ponto bastante positivo na nossa formação, por colmatar essas falhas. No entanto, não posso deixar de considerar que certas unidades curriculares deveriam ser melhor exploradas e haver uma rentabilização do tempo dedicado a determinados conhecimentos.

Há que notar que há matérias que são abordadas repetidamente em várias unidades curriculares e outras, bastante importantes, apenas são abordadas em unidades curriculares opcionais, que nem todos os alunos têm.

No que toca à parte farmacológica do curso julgo que somos profissionais de excelência e a nossa formação é formidável. Há, no entanto, que notar que os nossos conhecimentos em áreas como outros produtos de saúde, vejamos, dermocosmética, veterinária, puericultura, ortopedia ou suplementação alimentar são escassos.

Considero também que seria importante uma abordagem mais real e prática do que efetivamente acontece numa farmácia quando as matérias são lecionadas. O único momento em que temos esse tipo de perspetivação é na unidade curricular de Indicação Farmacêutica e faz falta mais tempo dedicado a esse tipo de conteúdo. Por exemplo, seria excepcional abordar mais nomes comerciais, qual o aconselhamento quanto a MNSRM, qual a abordagem perante um utente polimedicado e associações a suplementos alimentares ou outros produtos de saúde, etc. Desta forma, no fim de cada matéria ou tema lecionado era-nos possível perspetivar alguns dos casos clínicos que nos poderiam vir a surgir e qual o tipo de intervenção farmacêutica a ser feita.

3.2.2. Insegurança e medo de errar

A insegurança nos conhecimentos que temos e nos que sabemos que não temos leva, indubitavelmente, a um medo de errar. O objetivo e ambição de ser uma boa profissional de saúde e de não comprometer a segurança e bem-estar dos utentes gerou em mim, algumas vezes, certa ansiedade, principalmente nos primeiros tempos de atendimento ao balcão.

3.2.3. Estágio em tempo de pandemia

A pandemia por que passamos mudou, incontestavelmente, a vida de todos, no mundo inteiro. Todas as perspetivas, planos, metas e estratégias tiveram de sofrer transformações e reestruturações. E assim foi, também, com o nosso estágio.

Estava há semanas a estagiar quando se começou a falar do SARS-CoV-2 e da COVID-19. Inclusivamente tive oportunidade de participar na formação “Coronavírus 2019-nCoV - Ameaça sem Fronteiras. O essencial para saber aconselhar!”, em Coimbra, a 13 de fevereiro, quando a informação acerca do tema era, ainda, consideravelmente escassa.

A velocidade galopante, a situação foi evoluindo e rapidamente se verificou a procura descomedida por máscaras, álcool, álcool gel, que não estavam disponíveis no mercado, ou quando estavam, o preço era absolutamente exorbitante. Então, o pânico começou a verificar-se na população. Numa fase inicial, esta ansiedade, desconhecimento e insegurança acabava por ser transmitida para nós e o medo passou igualmente a fazer parte do nosso dia-a-dia enquanto estagiários e futuros profissionais de saúde.

A certa altura os estágios foram suspensos e quando, no fim do estado de emergência, regressámos, a perspetiva e a generalidade da situação estava diferente. Ainda que o número de casos fosse superior a quando o início da pandemia, a farmácia estava, a par da população, provida de todos os meios de proteção. Já era possível adquirir máscaras e material desinfetante, haviam sido instalados acrílicos de proteção e postigos extra e a população estava informada e não absolutamente aterrorizada.

O facto de haver necessidade de reorganizar o funcionamento da farmácia, de trabalhar em turnos, de desencontrar os funcionários e de zelar pela segurança, funcionamento e rentabilidade da farmácia fez com que também os nossos horários sofressem alterações e consequentemente, o estágio em si. Toda a ansiedade de podermos estar expostos na fase inicial e toda a insegurança foi um processo complicado e psicologicamente desgastante. Aliado a uma posterior incerteza do presente e do futuro, todo este cenário fez com que, pelo menos para mim, o estágio em tempo de pandemia fosse uma realidade diferente da esperada e mais complicada de enfrentar.

3.2.4. Desconhecimento dos nomes de marca

As prescrições por DCI ajudam-nos por ser a forma como abordarmos os medicamentos na faculdade e por ser o que nos leva a saber qual é o problema de saúde adjacente, mas a verdade

é que são muitos os utentes que apenas reconhecem os medicamentos pela caixa e, muitas vezes, unicamente pelo nome de marca.

O total e completo desconhecimento dos nomes de marca fez com que, muitas vezes, principalmente numa fase inicial, se o utente me perguntasse, perante uma prescrição médica por DCI, se essa linha era o medicamento “x”, houvesse alguma demora na resposta ao mesmo. Essa demora era, algumas vezes, interpretada pelo utente como uma falta de conhecimentos gerais, traduzindo-se numa desconfiança do mesmo no meu aconselhamento.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Formações e contínua aprendizagem

São vários os laboratórios que promovem a formação relativamente aos seus produtos nas farmácias. Entendo que as formações são uma oportunidade ótima para que o estagiário vá conhecendo, por categorias, e gradualmente, os produtos que vai trabalhar na farmácia e que pode apresentar e aconselhar ao utente.

Conforme já referido, quando chegamos ao estágio há vários temas nos quais estamos um pouco parcos em conhecimento e estas formações ajudam-nos bastante a ir adquirindo e integrando esses mesmos conhecimentos. Visto que as formações que vão ocorrendo muito se relacionam com a sazonalidade e produtos vendidos nessa época do ano ou estação, também há tempo para sedimentar e aplicar os conhecimentos adquiridos. Vejamos, consoante o que será mais vendido na época do ano, por exemplo, no Verão, protetores solares e pós-solares, e no Inverno, suplementos vitamínicos e antigripais, existem formações mais vocacionadas para esses mesmos produtos.

Uma vez que nos encontrávamos em situação de pandemia, a maioria das formações a que assisti foram *on-line*, o que até considerei um ponto positivo, pois a deslocação a outras localidades não era necessária.

3.3.2. Educação da população em tempo de pandemia

Vivenciar uma pandemia é um cenário que, certamente, quase nenhum de nós predisse passar. A falta de preparo para lidar com uma questão de saúde pública deste calibre foi patente e, assim, inevitavelmente, gerou-se medo, insegurança e até algum pânico na população. O desconhecimento e a falta de informação sobre o que era, como evoluía, e como nos podíamos proteger colocou o mundo apreensivo.

Ainda que a informação que se ia obtendo fosse variando ao longo dos dias e semanas, as recomendações feitas na farmácia, à luz do conhecimento que tínhamos no momento, eram acatadas e bastante respeitadas pelos utentes. Desde a importância de desinfetar as mãos, à correta utilização da máscara, ao despiste de sintomas que pudessem ser indicativos de infeção por SARS-CoV-2, aquando a simples procura um MNSRM para a febre, os farmacêuticos por este país e mundo todo mostraram ser uma peça imprescindível naquele que é um dos momentos mais atípico da história.

A prestabilidade, cuidado e zelo dos farmacêuticos para com a população foram pontos muito valorizados pelos utentes. Assim, considero que, apesar de tudo, este foi também um momento em que se compreendeu que os farmacêuticos são dos profissionais de saúde com maior proximidade à população e que, desta forma, estamos inteiramente e intimamente ligados à proteção e promoção da saúde pública.

A pandemia trouxe, portanto, a oportunidade da profissão farmacêutica se afirmar, ao prestarmos mais um serviço público essencial, a informação. Enquanto estagiária pude, igualmente, fazer parte dessa educação da população, o que se tornou gratificante, pois uma população informada é, certamente, uma população mais preocupada e consciente, o que é essencial no momento que vivemos.

3.3.3. Cedência de medicamentos hospitalares

A situação de pandemia oportunizou que a cedência de medicamentos hospitalares fosse efetuada numa farmácia à escolha do utente. Na Farmácia Saúde foram dezenas os medicamentos recebidos e dispensados no contexto da designada “Operação Luz Verde”.

Estima-se que esta ação tenha poupado o percurso de 99,5 km a cada utente. A nível nacional, isto representa menos 1.713.185 km percorridos, o equivalente a menos 43 voltas à Terra. Foram também, em média, poupados 114 minutos no que toca a tempo de deslocação e o absentismo teve também uma redução bastante significativa. Aquando a avaliação de satisfação, 91,4% dos utentes referiram que este tipo de serviço é “Muito Importante” e 90,9% referiu preferir ter o acesso à sua medicação, mesmo depois da pandemia, em Farmácia Comunitária.

(7)

Sempre que se recebia um medicamento hospitalar na farmácia, havia um farmacêutico responsável por fazer o contacto com o utente a confirmar que poderia levantar a medicação e a dispensa era sempre feita, igualmente, por um Farmacêutico.

Pude, desta forma, observar o rececionamento, bem como a dispensa, dos medicamentos hospitalares num contexto novo. Contactei também de perto com os utentes a receber essa mesma medicação e pude perceber o impacto que esta medida teve na vida dos mesmos. Os impactos foram bastante positivos e foram muito além da comodidade, sendo também relevantes as questões económicas envolvidas na deslocação à Farmácia Hospitalar.

Considero então que observar a concretização desta iniciativa, que há muito se lutava para que ocorresse, aquando da realização do meu estágio, foi uma oportunidade incrível.

3.3.4. Modelos de Prescrição Médica

Durante o meu período de estágio tive oportunidade de contactar com os 3 modelos de prescrição médica atualmente existentes: a prescrição eletrónica desmaterializada, a prescrição eletrónica materializada e a prescrição manual.

Apesar das evidentes diferenças entre cada um dos tipos de prescrição, a obrigatoriedade, salvo raras exceções, de prescrição por DCI, foi uma mais-valia para a minha aprendizagem pois, principalmente numa fase inicial, é difícil associar o nome de marca ao DCI, dado que os mesmos raramente são abordados ao longo do plano curricular do MICF.

Perante determinadas situações específicas e excepcionais, a prescrição poderá não ser por DCI. Existem então três exceções em que a prescrição pode ser efetuada recorrendo ao nome comercial ou de marca, mediante a respetiva justificação técnica do prescriptor. São então: (8)

Exceção a) – Medicamentos com margem ou índice terapêutico estreito. Estes medicamentos têm de constar na lista do Infarmed.

Exceção b) – Reação adversa prévia. Para casos de prévia, fundada e reportada ao Infarmed, suspeita de intolerância ou reação adversa a um medicamento com a mesma substância ativa, mas com outra denominação comercial.

Exceção c) – Continuidade de tratamento superior a 28 dias. Para um medicamento que vai ser administrado como tratamento durante um período superior a 28 dias.

A prescrição eletrónica desmaterializada, por ser a mais comum atualmente, foi sem dúvida a com que mais contactei ao longo do meu estágio. Neste tipo de receita, através do recurso a 3 códigos (Número da receita, Código de Acesso e Dispensa e Código do Direito de Opção) é possível, através do *software* de atendimento, proceder à abertura da receita e dispensa do(s) medicamento(s). Esta receita permite um levantamento gradual da medicação e é, muitas

vezes, enviada para os telemóveis ou *e-mail* dos utentes. Este tipo de prescrição representa uma grande mais-valia em termos de segurança no atendimento e de redução nos erros, sejam eles de dispensa ou comparticipação.

Os outros dois tipos de prescrição médica servem, hoje, para situações de impossibilidade de utilização do modelo de prescrição desmaterializada.

As prescrições manuais ou receitas manuais são aceites perante um motivo de exceção, que deverá estar assinalado no canto superior direito como uma das quatro situações admitidas como justificativo (8):

- a) Falência informática;
- b) Inadaptação fundamentada do prescritor;
- c) Prescrição no domicílio;
- d) Até 40 receitas por mês.

Neste tipo de receitas há que ter especial atenção a vários parâmetros para que a mesma seja considerada válida, como por exemplo, a assinatura do médico e data de validade (30 dias após a data de emissão da mesma). Todos estes passos de verificação, aliados à interpretação da caligrafia, tornam a utilização deste tipo de prescrição mais complexa e demorada. No entanto, considero que poder ter aprendido como se processam este tipo de prescrições foi bastante positivo. Na Farmácia Saúde, a dispensa de medicamentos através de receitas manuais é sempre confirmada por outro colega, por forma a minimizar erros de dispensa.

Tal como anteriormente referido, por haver uma forte componente de preparação de medicamentos manipulados nesta farmácia, a maior parte das prescrições eletrónicas materializadas com que contactei foram, exatamente, nesse âmbito.

Tendo em conta o elevado número de utentes da Farmácia Saúde e a heterogeneidade dos mesmos, foi-me ainda possível contactar com diversos regimes excecionais de comparticipação e planos de comparticipação complementares. O regime excecional com que mais contactei foi o da Psoríase, abrangido pelo disposto na Lei n.º 6/2010, de 07/05.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Locais de venda de MNSRM e outros produtos de saúde

Promulgado pelo Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de Agosto, desde 2005 que, à semelhança do que ocorre noutros países, é permitida a venda de MNSRM em locais destinados para esse

efeito. (9) Podemos então hoje encontrar MNSRM e outros produtos de saúde em parafarmácias e espaços de bem-estar de alguns supermercados.

O acesso facilitado e disseminado de medicamentos pela população levou, na minha opinião, a uma descredibilização do trabalho e aconselhamento do farmacêutico e de outros profissionais de saúde, sendo que considero que esta descredibilização tenha sido particularmente potenciada pela venda de MNSRM em supermercados.

Na Farmácia Saúde há, sempre, conforme já referido anteriormente, um cuidado na dispensa e aconselhamento, seja de que produto for, por ser prioridade a segurança do utente. Não raras vezes somos confrontados com interrogações por parte dos utentes sobre o porquê de estarmos a fazer tantas perguntas porque se quiserem vão a “outro sítio onde ninguém pergunta nada”. Acontece também a procura de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), sem receita, porque se quisessem algo “fraco” não iam à Farmácia.

A fugacidade dos dias hoje vividos leva a que se deseje rapidez e imparcialidade em praticamente tudo. Na saúde é alarmante que aconteça o mesmo. Promover um acesso generalizado e conveniente da população aos medicamentos é essencial, mas não o deve ser sem nenhuma pergunta nem nenhum profissional de saúde presente aquando a dispensa. Tem, também, que haver mais educação para a saúde da população, para que saibam que os medicamentos podem ter tanto de bom como de prejudicial, quando mal administrados. A sensação com que fico é que as pessoas olham para os MNSRM, e mesmo para alguns suplementos, como algo inócuo porque não necessitam de supervisão médica. Isto está absolutamente errado. E é perigoso, para a nossa profissão e para a saúde da população.

Há ainda um outro problema no que toca a esta liberalização e falta de informação da população, o fator preço praticado por grande parte destes locais. Recentemente uma notícia (10) indicava que os preços dos MNSRM tinham descido cerca de 6% desde 2005, ano em que foi permitida a sua venda fora das farmácias. Os utentes confrontam a farmácia com o facto de comprarem os produtos mais baratos noutros locais, por vezes em tom de acusação, referindo que as farmácias querem “roubar”. Infelizmente, o que a população em geral não sabe, é que esses locais, por comprarem em grandes quantidades, conseguem preços significativamente abaixo dos conseguidos por farmácias, chegando a valores 20% abaixo nos supermercados. (10) Vivemos numa sociedade que, dadas as condições socioeconómicas vividas, mais facilmente vai antes olhar ao preço e preferirá deslocar-se a um desses locais, sem qualquer aconselhamento, em vez de ir à farmácia, onde tem os profissionais de saúde habilitados para garantir a sua segurança.

Considero que estas situações foram potenciais ameaças para o meu estágio e também para a minha futura profissão, por sentir que alguns utentes não queriam ouvir o que lhes tinha a dizer, desvalorizando aquele que é o nosso trabalho, aconselhar e garantir o uso racional do medicamento, para segurança do utente. É, portanto, imperativa uma mudança neste cenário, na minha opinião, um tanto ou quanto catastrófico, quer para a saúde pública, quer para os farmacêuticos e profissionais de saúde deste país.

3.4.2. Inadvertida cedência de MSRM, sem receita, noutras farmácias

Os medicamentos são considerados sujeitos a receita médica quando preenchem, pelo menos, uma das seguintes condições (11):

- a) Possam constituir um risco quando utilizados sem vigilância médica, ainda que administrados corretamente;
- b) Sendo, frequentemente, utilizados para outro fim que não aquele a que se destinam, podem constituir um risco para a saúde;
- c) Conttenham substâncias, ou preparações à base dessas substâncias, cuja atividade e/ou efeitos secundários seja indispensável aprofundar;
- d) Sejam medicamentos de administração parentérica.

Apenas em alguns casos, excepcionais, e por motivos de força maior, a lei permite a dispensa de MSRM sem a respetiva receita, nas farmácias. Situações de emergência ou urgência em que não há possibilidade de deslocação a um local para obter prescrição médica e situações em que a vida do utente pode ser comprometida perante a não cedência do medicamento são cenários em que, mediante cuidadosa apreciação farmacêutica, com avaliação do risco/benefício, prévias dispensas, circunstâncias da solicitação da dispensa e características do medicamento (forma farmacêutica, via de administração, efeitos secundários, etc.), se poderá fazer a cedência de MSRM, sem receita.

Ao longo do meu estágio foram várias as negações a cedências de MSRM sem receita por, na Farmácia Saúde, se cumprir escrupulosamente a lei. No entanto, o facto de outras farmácias fazerem estas dispensas sem nenhum cuidado, nem avaliação, leva a população a crer que não há absolutamente problema nenhum em fazer as mesmas. Várias vezes se geraram situações desagradáveis ao balcão por não se fazer a cedência do medicamento solicitado.

Considero que este ponto representa uma ameaça à classe farmacêutica e aos farmacêuticos deste país. E assim, julgo ter sido também uma ameaça ao meu estágio, enquanto futura farmacêutica. Muitas vezes as pessoas nem queriam escutar a nossa justificação, referindo que

não entendiam a nossa atitude, alegando que se tratavam de situações de “má vontade” pois sabiam que se fossem a outra farmácia lhes cediam os medicamentos sem colocar qualquer entrave e mais, que nem perguntariam nada. Isto gera desconfiança do utente no profissional que está à frente dele e que está, somente, a cumprir a lei. Isto é sério, e preocupante.

Conforme descrito acima, os medicamentos são considerados MSRM por algum motivo e a segurança de um utente pode estar comprometida por uma cedência negligente. Algumas vezes, por perguntas simples, percebi que certos pedidos por MSRM eram simplesmente porque um conhecido tinha recomendado, ou um dos familiares também fazia, etc. Isto significa que as pessoas que solicitam estes medicamentos, muitas vezes, não estão a ser devidamente acompanhadas. Há perguntas que têm, obrigatoriamente, de ser feitas. A saúde pública está posta em causa quando se facilita a cedência de MSRM, sem a devida receita, e sem haver extrema necessidade. Há alternativas de MNSRM ou Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF) que muitas vezes são o suficiente para a situação em que o utente veio procurar o MSRM.

Considero, então, que a classe farmacêutica tem de se unir e trabalhar de igual modo, em conformidade, e lutar por um bem comum, a saúde pública e a confiança da população no nosso trabalho.

3.4.3. Medicamentos Genéricos: dúvidas e (não) aceitação dos utentes

Um medicamento genérico (MG) é um medicamento formulado com a mesma substância ativa e que se apresenta na mesma forma farmacêutica, com igual dosagem e igual indicação terapêutica que o medicamento original, ou de marca, que serviu de referência. (12)

Os genéricos surgiram há mais de duas décadas e, por serem medicamentos seguros e eficazes, mas com um preço bastante mais reduzido que os de marca, apresentam-se como uma mais-valia económica, quer a nível individual, para o próprio utente, quer a nível coletivo, para o Estado. Tem, portanto, sido objetivo e prioridade da política nacional a promoção da utilização destes medicamentos. Diversas campanhas informativas e de sensibilização têm sido desenvolvidas nesse sentido, por forma a incentivar essa escolha, desmistificando as crenças da população, muitas vezes erradas, que associa o baixo preço a uma falta de qualidade, eficácia e segurança. (13,14)

Apesar de já serem bastantes os utentes que levantam a sua medicação optando por genéricos, ainda há uns tantos que não confiam nestes medicamentos, chegando a referir que são

“contrafeitos” ou que “de certeza que não são a mesma coisa”. Sempre que fui confrontada com utentes cétricos e desconfiados quanto à eficácia e segurança deste tipo de medicamentos fazia, permanentemente, questão de explicar que a questão do preço em nada se relaciona com a composição, mas sim com as questões inerentes à Investigação e Desenvolvimento (I&D) dos medicamentos originais ou de marca. Muitas vezes os utentes acabavam por assumir que não tinham noção desse facto e que assim já fazia algum sentido. Considero que, aliada a tantos outros papéis importantes socialmente, esta é uma missão muito relevante do farmacêutico, a promoção da informação da população quanto ao medicamento, por forma a desmistificar crenças erradas que se vão criando e perpetuando na população.

No entanto, tantas outras vezes, por muito que explicasse essa diferença, alguns utentes não queriam ouvir e continuavam a afirmar que sabiam o que estavam a falar e que era “impossível ser a mesma coisa”, duvidando da minha palavra e dos outros colegas, criando um clima de desconfiança e incredibilidade.

Apesar de já terem sido realizadas bastantes campanhas no sentido da sensibilização da população para a aceitação dos genéricos, julgo que tem que se ir mais a fundo e explorar o porquê das diferenças de preço, mostrar de forma clara e simples o que implica a I&D de um medicamento e como são feitos os testes de bioequivalência, provando que um medicamento genérico é igual a um de marca.

3.4.4. Constante aparecimento de novas referências

O Mundo está em constante mudança e assim surgem sempre novas necessidades e oportunidades de mercado.

Durante o estágio foram aparecendo, sempre, novas referências e produtos no mercado, desde a dermocosmética, à puericultura ou aos suplementos alimentares. Esta constante impermanência é bastante favorável no prisma das oportunidades e alternativas oferecidas ao utente. No entanto, com tantas referências e informação, por vezes, torna-se difícil fazer um correto aconselhamento dos produtos porque há sempre informação que ainda não está 100% apreendida.

Durante um estágio, e principalmente numa fase inicial, o constante aparecimento de novos produtos, torna-se um pouco assustador, podendo ser considerado como uma ameaça à nossa aprendizagem e correto aconselhamento ao utente. Um domínio não absoluto de todos os produtos gera alguma insegurança ao balcão que poderá transparecer para o utente, gerando

falta de confiança do mesmo no nosso aconselhamento. No entanto, considero que com o tempo e os anos de experiência, se vão dominando o grosso das referências, diminuindo estes medos aliados ao constante aparecimento de novidades.

3.4.5. A internet como fonte de (des)informação

A Internet revolucionou o Mundo e a sua presença no nosso dia-a-dia é já imprescindível. Hoje, o acesso a esta plataforma de informação global permite-nos pesquisar e obter conhecimento sobre todos os temas que imaginamos, com uma rapidez incrível. Mas como em tudo, terá sempre de haver um balanço entre os aspetos positivos e negativos e um rastreio da informação. Na Internet encontramos de tudo, o certo e o errado, informação fidedigna e informação falsa, verdades e mitos. E, no que toca à saúde, é igual. A verdade e a mentira partilham o mesmo espaço, sendo por vezes difícil para a população em geral, perceber em que informação deve acreditar.

Ao longo destes meses pude perceber que a Internet pode ser uma significativa fonte de desinformação para a população, na área da saúde. Muitas pessoas chegam mesmo a preferir acreditar no que leem na Internet do que num profissional de saúde pois, inclusivamente, há artigos a denegrir a profissão médica, as indústrias farmacêuticas e os medicamentos. Aos olhos destes indivíduos perdemos então toda a credibilidade. Desde utentes que referem que vão deixar de tomar a medicação porque leram x ou y, ou utentes polimedicados a tomar suplementos milagrosos que encomendaram em lojas *online* e que são contraindicados na sua situação clínica, a utentes a administrar posologias diferentes das prescritas porque na “Internet dizia que assim é melhor”. Acontece um pouco de tudo.

Este cenário foi também evidenciado com a pandemia de COVID-19. Principalmente numa fase inicial, o descontrolo da informação foi colossal. O conhecimento que se tinha era escasso, e ainda hoje o é; é tudo muito recente e cada dia que passa se descobrem novas verdades, não absolutas. Vivemos numa época diferente da alguma vez imaginada, mas as mentiras tomadas como certas escritas na Internet são, por vezes, por determinados grupos populacionais, levadas demasiado a sério.

Considero, portanto, que esta desinformação é um fator de preocupação em termos de saúde pública e é uma ameaça à profissão farmacêutica, por muitas vezes se traduzir numa desvalorização e desacreditação no nosso conhecimento e valor.

3.4.6. Estágio em tempo de pandemia

Conforme já referido como ponto fraco, julgo que a pandemia de COVID-19, que nos levou obrigatoriamente a reorganizar as nossas vidas, constituiu também uma ameaça à realização e conclusão em pleno do estágio.

Considero que, principalmente a pausa, constituiu a ameaça central pois o conhecimento vai-se dando em etapas e a consolidação é essencial. Uma vez que grande parte do conhecimento que obtemos na farmácia é totalmente novo, é imprescindível aprender e praticar, se não acabamos por não reter toda essa informação. O meu estágio estava ainda numa fase bastante inicial, em que a consolidação de conceitos ainda não estava feita, quando toda esta situação se despoletou. Quando, após mais de um mês fora do ambiente de estágio, voltei, valeu-me o incrível apoio de todos os funcionários da farmácia, que entenderam as dificuldades sentidas e me apoiaram, sempre e incondicionalmente, no processo de aprendizagem. Assim, aquilo que de uma ameaça se poderia ter tornado um ponto negativo, numa deficiente aprendizagem, não o foi, de todo.

3.4.7. Temas tabu e dificuldade no correto aconselhamento

Existem alguns temas que são, ainda, tabus sociais. Na farmácia, temas relacionados com a sexualidade são aqueles onde se sente mais vergonha e dificuldade na abordagem por parte dos utentes. Ainda que os profissionais de saúde saibam como lidar com os problemas e dúvidas do utente, nunca os julgando, há sempre algum receio por parte da maioria deles na procura de conselhos ou ajuda neste ramo.

Esta vergonha e o querer que o atendimento seja o mais rápido possível, para que ninguém saiba ou se aperceba, compromete, muitas vezes, o correto aconselhamento ao utente. Várias vezes ao longo do meu estágio, principalmente nas cedências de pílulas do dia seguinte, sentia que o pânico, pudor e o constrangimento colocavam uma barreira ao diálogo. Isto para não falar de que, dada a envolvimento em vergonha, muitas vezes nem são as próprias utentes que precisam da contraceção oral de emergência (COE) a ir à farmácia. Bastantes vezes vai o companheiro, ou alguma amiga, que não sabem se a própria utente tem alguma patologia, se está a fazer a sua contraceção normal e sem falhas e que nem se justifique a toma da COE, comprometendo um diálogo aberto e adaptado aquela situação específica.

Estes tabus são, na minha opinião, ameaças a uma sociedade saudável e equilibrada. No meu estágio senti, várias vezes, dado o constrangimento, que não estava a conseguir desempenhar com plenitude o meu papel e que essa falha poderia comprometer a segurança do utente. Fica

o meu desejo de que, num futuro próximo, a vergonha, seja de que tema for, passe a ser coisa do passado e se possam discutir, abertamente, todos e quaisquer temas, principalmente aqueles que podem comprometer a saúde do indivíduo.

4. Intervenção Farmacêutica – Casos Práticos

A proximidade e facilidade de acesso às Farmácias permitem que estas sejam o primeiro local onde os utentes se deslocam quando têm algum problema de saúde.

Ao longo do estágio foram várias as situações em que tive oportunidade de consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos no aconselhamento ao utente.

Por ser impossível representar todos os casos e situações com que contactei, selecionei alguns que, de forma geral, representam um pouco da experiência do aconselhamento farmacêutico ao longo do meu estágio.

Caso Prático I

Uma utente, sexo feminino, com 22 anos, dirige-se à Farmácia referindo que no domingo passado se tinha deslocado às urgências do Hospital Distrital da Figueira da Foz pois se encontrava com sintomas bastante incómodos e indicativos de infeção urinária. Após algumas perguntas foi possível perceber que era uma situação que já se arrastava há cerca de duas semanas, mas que a mesma tentou ir ingerindo bastantes líquidos e controlando a situação, até que nesse Domingo começou a sentir muita dor e, tendo em conta que o Centro de Saúde se encontrava encerrado, decidiu recorrer ao serviço de urgência. Após avaliação médica, através de Sumária de Urina, ter-se-á verificado quadro de infeção urinária pelo que a utente fez Fosfomicina 3 g, duas saquetas, com o devido intervalo de 24h, domingo e segunda-feira. A utente relatou que se tinha sentido melhor, mas que na quinta-feira, dia em que se dirigiu à Farmácia, quando acordou, voltou a sentir ardor e dor quando urinava. Imediatamente nos dirigimos ao gabinete do utente, onde procedemos à urianálise através do equipamento *Urisys*[®].

O resultado deu positivo para Leucócitos e Eritrócitos a 250 Ery/ μ L. Avaliando o teste percebi que a utente tinha, ainda, infeção ativa e que provavelmente seria por *Escherichia coli*, tendo em conta a presença de sangue na urina. Imediatamente expliquei à utente que, provavelmente, a infeção que tinha não teria sido combatida pelo antibiótico, pelo que deveria entrar em contacto com o médico de família para que se pudesse fazer nova avaliação e prescrição. Foi também aconselhado que procurasse fazer um antibiograma pois a prescrição em cadeia de antibióticos, potencialmente inefetivos, é um erro perigoso. A utente seguiu as nossas recomendações e regressou passados alguns dias com nova prescrição médica: Norfloxacin, 400 mg, 12h/12h.

Tratando-se de uma utente regular da farmácia, soube, posteriormente, que a infeção ficou resolvida após segundo tratamento.

Caso Prático 2

Um utente, do sexo masculino, dirige-se à farmácia e pede *Migrétil*[®] (Paracetamol 400 mg; Cafeína 100 mg; Tartarato de ergotamina 1 mg; Alcaloides da beladona 0,1 mg) para a mãe, com 55 anos. Diz que não tem receita e que a mãe é que lhe pediu para que fosse comprar esse medicamento para as enxaquecas que sentia. Uma vez que não havia nenhum tipo de histórico de cedências desse medicamento, que é um MSRM, nem nenhuma receita médica a indicar que estava a fazer esse medicamento por indicação médica, informei que não poderia fazer a dispensa, mas que lhe poderia indicar uma alternativa de venda livre.

O utente referiu que queria então optar por uma alternativa. Uma vez que a senhora não sofria de nenhum tipo de problema de coração, nem de pressão arterial elevada, aconselhei o *Ben-u-ron Caff*[®] (Paracetamol 500 mg; Cafeína 65 mg), tomando 1 a 2 comprimidos de 8h em 8h.

Caso Prático 3

Utente, do sexo feminino, com cerca de 60 anos, dirige-se à farmácia com prescrição de *Zithromax*[®] (Azitromicina 500 mg), 3 comprimidos, e *Brisovent Diskus*[®] (Fluticasona 250 µg/dose).

Aquando a dispensa questioneei se já era habitual utilizar a bomba ao que a utente me respondeu que não, que se tratava de uma utilização nova e pontual, uma vez que estava com um problema ao nível pulmonar. Perguntei, por conseguinte, se o médico tinha explicado como fazer a bomba ao que me respondeu que sim, mas que tinha ficado confusa e não tinha percebido muito bem.

A utilização de bombas é muitas vezes complexa e os utentes não percebem bem como as usar, daí a importância de explicar e, essencialmente, demonstrar como fazer corretamente as mesmas, uma vez que uma má utilização compromete a eficácia da terapêutica. Assim, recorri às bombas modelo que temos para demonstração e expliquei todo o procedimento de utilização e cuidados a ter, por forma a que a terapêutica fosse, efetivamente, bem-sucedida. Adicionalmente alertei a utente da necessidade de bochechar e deitar a água fora, por forma a evitar o desenvolvimento de candidíases orais.

Caso Prático 4

Utente do sexo feminino, com cerca de 25 anos, dirige-se à farmácia referindo que tem sentido dores na unha do dedo polegar do pé, principalmente quando anda com sapatos fechados. Refere também que quando lhe mexeu que a mesma lhe pareceu ligeiramente levantada. Perguntei à utente se a unha estava esbranquiçada, ao que ela respondeu que estava ligeiramente branca na zona que lhe pareceu descolada.

Uma vez que a mesma se apresentava de sandálias pedi-lhe para observar a unha. Ao proceder à observação verifiquei que se tratava efetivamente de uma onicomicose. Indiquei então a utilização de Amorolfina 50 mg/ml, uma vez por semana, limando e limpando a unha afetada e procedendo posteriormente à aplicação do verniz medicamentoso.

Foi também recomendada a utilização de sapatos abertos sempre que possível e aplicação de um pó antifúngico – *Canesten*[®] pó cutâneo (Clotrimazol 10 mg/g) - nos sapatos fechados, por forma a eliminar o fungo que pudesse também estar nesse tipo de calçado.

Caso Prático 5

Utente do sexo feminino, com cerca de 35 anos, dirige-se à farmácia solicitando a cedência da pílula *Yaz*[®]. Imediatamente questionei se tinha prescrição médica ao que a mesma me respondeu que não e que estava na Figueira da Foz de férias. Perguntei então se já era a sua pílula habitual e se tem cumprido as consultas anuais de ginecologia para verificar se está tudo bem, ao que a mesma rapidamente me respondeu que não porque não era habitual fazer a pílula e que só tomava a mesma por iniciativa própria, sem indicação médica, nos meses de verão, por forma a evitar a menstruação, pois não a queria ter enquanto estava de férias.

Imediatamente indiquei à utente que não lhe poderia fazer a cedência da pílula. Informei também que a toma da mesma nunca deve ser da forma que ela o estava a fazer. Expliquei todos os riscos associados à toma de um contraceutivo oral, que se trata de um MSRM, hormonal, e que deve ser tomado de forma regular, referindo também o Risco de Tromboembolismo Venoso (TEV) associado. Referi de que deveria consultar um médico e que a toma errada do medicamento em questão representava riscos elevados para a mesma.

A utente ficou muito chocada pois sempre tinha comprado a pílula na farmácia do seu local de residência e que nunca lhe tinham colocado nenhum tipo de entrave à cedência. Este foi um daqueles casos em que não podemos controlar o que é feito pelos colegas, e noutras farmácias, mas em que certamente fizemos a nossa parte e protegemos a segurança da utente.

Caso Prático 6

Utente do sexo masculino, com cerca de 40 anos, dirige-se à farmácia e solicita *Clonix*[®] (Clonixina 300 mg). Imediatamente questionei o utente sobre a causa que o levava a procurar essa medicação. O mesmo respondeu que tinha sofrido uma lesão bucal na qual a gengiva tinha descido e a raiz do dente estava agora ligeiramente exposta e tinha imensa dor. Questionei há quanto tempo estava assim e se já tinha consultado o médico. O mesmo respondeu-me que estava assim há um dia e que só teria consulta daí a 4 dias e que já estava a fazer Paracetamol 500 mg intercalado com Ibuprofeno 400 mg, mas que continuava a ter muitas dores e incómodo com essa terapêutica.

Informei então o utente que o *Clonix*[®] é um MSRM e que por esse motivo teria de lhe ceder uma alternativa de venda livre, sugestão que ele prontamente aceitou. Indiquei então a substituição do Ibuprofeno 400 mg por *Kettesse*[®] (Dexcetoprofeno 25 mg), 1 comprimido de 8h em 8h, mantendo a terapêutica intercalada com Paracetamol. Aliada à terapêutica oral indiquei também a aplicação de *Dentispray*[®] (Benzocaína 50 mg/ml), 1 pulverização, no máximo 3 a 4 vezes ao dia, no local afetado, por forma a ajudar a suportar a dor até consulta do dentista.

Caso Prático 7

Utente do sexo feminino, com cerca de 70 anos, dirige-se à farmácia, acompanhada pelo filho, com uma prescrição eletrónica desmaterializada no seu telemóvel, referindo que nessa receita devia constar a medicação que a mesma fazia de forma crónica e que estava a precisar.

Ao abrir a receita verifiquei que apenas estavam prescritas 3 embalagens de Alopurinol 100 mg. Questionei a utente se era essa a sua medicação habitual, ao que a mesma me respondeu que não e que não tinha sido informada de prescrição de medicação nova. Referiu ainda que não tinha tido qualquer consulta e que, a única coisa que tinha feito recentemente, tinha sido deixar o resultado das análises prescritas no seu centro de saúde, para avaliação da médica de família. Referiu, no entanto, que a mesma não a tinha contactado a notificar de nenhuma alteração nas análises, nem da necessidade de iniciar nova medicação.

Tentei, assim, ligar para a médica de família, por forma a confirmar se haveriam sido detetados valores elevados de ácido úrico, por exemplo, que justificassem a prescrição de Alopurinol, ou se o envio daquela prescrição tinha sido um equívoco. Não foi, no entanto, possível

estabelecer contacto com a mesma. A utente decidiu, então, que ia tentar, ela mesma, falar com a médica, antes de iniciar a medicação.

Caso Prático 8

Utente do sexo feminino, com cerca de 50 anos, dirige-se à farmácia com uma caixa de Paroxetina 20 mg referindo que, após comentar com a cunhada que recentemente se andava a sentir muito ansiosa, lhe tinha indicado que aqueles comprimidos eram “muito bons” para essa situação, pois era os que tomava. No entanto, a utente afirmou que não gostava de se automedicar e que, por esse motivo, tinha vindo à farmácia para consultar a opinião de um profissional de saúde em relação ao assunto.

Imediatamente a informei que aquele medicamento se tratava de um MSRM, um antidepressivo, e que nunca deveria ser tomado esporadicamente e, muito menos, sem o devido acompanhamento médico. A mesma ficou espantada por se tratar de um antidepressivo pois, da forma que a cunhada lhe tinha falado, achou que fosse algo que ela pudesse tomar simplesmente quando se sentisse mais agitada.

Tentei então perceber qual o tipo de ansiedade que sentia, se ao adormecer, se devido à situação de pandemia vivida, algum episódio na sua vida recente, e ainda se já tinha consultado algum médico sobre essa ansiedade. A mesma respondeu que sentia ansiedade durante praticamente todo o dia e que sentia algumas palpitações e suores, mas que esta era uma situação recente, que associava à pandemia, daí que ainda não tivesse consultado a sua médica. Questionei então se fazia alguma medicação habitual, ao que me respondeu que dado um tumor na tiroide há 5 anos, e total ablação da mesma, tinha necessidade de fazer *Eutirox*[®] 0,1 mg (Levotiroxina sódica), diariamente, como terapêutica de substituição.

Desde o início do ano que as fórmulas do *Eutirox*[®] estão em fase de transição, para a “Fórmula modificada”, dada a alteração de excipientes. Uma vez que se trata de um medicamento de margem terapêutica estreita, foram emitidas orientações para os médicos e farmacêuticos acerca desta alteração, evidenciando a necessidade de particular atenção no que toca a doentes pertencentes a grupos mais vulneráveis, como os doentes com cancro da tiroide. (15) Imediatamente questionei a utente se ela já estava a fazer a “Fórmula modificada”, mostrando-lhe a caixa, e explicando-lhe em que consistia essa modificação da fórmula. A mesma respondeu que sim, que as últimas caixas que tinha comprado já eram “diferentes”, mas que tinha achado que era só mesmo a caixa, pois não tinha sido alertada para essa alteração da fórmula. Depois, começou a pensar, e concluiu que realmente só se tinha começado a sentir

mais ansiosa, com palpitações e suores, depois do início das novas caixas de *Eutirox*[®], há cerca de um mês e meio. Imediatamente indiquei que tentasse contactar a sua médica o quanto antes para proceder a análises e avaliação da situação, uma vez que poderia estar com uma desregulação hormonal e necessidade de ajuste da medicação.

A utente agradeceu imenso a atenção e disse que ia entrar imediatamente em contacto com a médica para esclarecer a situação.

Por fim, solicitou, na mesma, um medicamento que a ajudasse em momentos de mais ansiedade, uma vez que toda a situação de pandemia também a deixava bastante agitada. Aconselhei nesse caso a toma de *Valdispert*[®] 125 mg (Valeriana), 1 a 2 comprimidos, quando se sentisse mais ansiosa, ou 3 vezes ao dia.

Caso Prático 9

Utente do sexo masculino, com cerca de 60 anos, dirige-se à farmácia solicitando um desparasitante para os seus três gatos, uma vez que reparou na presença de parasitas nas fezes de dois deles. Questionei o peso dos animais, ao que me disse que dois deles tinham cerca de 7,5 kg e o outro 3 kg. Indiquei então a toma de *Drontal*[®] gatos (Embonato de pirantel 230,0 mg; Praziquantel 20,0 mg), 1 comprimido para cada 4 kg de peso corporal, logo 2 comprimidos para os gatos de 7,5 kg e 1 comprimido para o de 3 kg. Indiquei a repetição do tratamento passado 15 dias.

Aconselhei que, além da desparasitação, deveriam ser limpos e desinfetados todos os locais onde os gatos estivessem, nomeadamente mantas, sofás e a caixa de areia, por forma a haver uma correta eliminação de todos os parasitas e ovos do ambiente e sucesso da terapêutica.

Informei ainda o utente que as pessoas que morassem com os gatos deveriam igualmente proceder à desparasitação pois, muitas vezes, os parasitas que infetam os animais também infetam humanos. O utente referiu que então queria levar já o desparasitante para ele e para a esposa, por forma a fazer o tratamento devidamente. Procedi nesse caso à cedência do *Pantelmin*[®] comprimidos (Mebendazol 100 mg), com indicação para fazer um comprimido de manhã e à noite, durante três dias.

5. Considerações Finais

Findo o período de estágio e última etapa formativa do meu percurso acadêmico, concluo que esta foi uma experiência bastante profícua e de balanço extremamente positivo.

Considero que esta é uma etapa indispensável para uma formação completa e com o mínimo de falhas possível. É-nos permitindo, durante o estágio, sedimentar e aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do percurso do MICF, e ainda adquirir outros que não poderiam ser, de todo, abordados em contexto teórico, dado o caráter volátil inerente ao atendimento ao público.

Ao longo do estágio pude perceber, em concreto, a realidade do que é a profissão farmacêutica em contexto de Farmácia Comunitária e assim, apaixonar-me ainda mais por esta profissão tão nobre.

A necessidade de aprendizagem e persistente busca por novos conhecimentos será uma constante no futuro, mas, hoje, sinto que tenho as bases necessárias para poder exercer e honrar a profissão farmacêutica da melhor forma possível. Nisso, em muito tenho de agradecer à equipa da Farmácia Saúde, por me terem permitido explorar todas as valências de ser farmacêutico comunitário e por todo o conhecimento transmitido e experiências proporcionadas.

Sendo uma peça fundamental para a Saúde Pública, as farmácias e os farmacêuticos, não têm, ainda, na minha opinião, e segundo a experiência destes meses, o devido reconhecimento. Julgo que será também necessário que a profissão farmacêutica se una e que trabalhem todos por um bem comum, pelo uso racional e seguro do medicamento. Fica, assim, o meu desejo de que, num futuro próximo, este cenário seja diferente do atual.

Referências Bibliográficas

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Valor social e económico das intervenções em saúde pública dos farmacêuticos nas farmácias em Portugal**, atual. (2015). [Acedido a 11 set. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/publicacoes/estudos/valor-social-e-economico-das-intervencoes-em-saude-publica-dos-farmaceuticos-nas-farmacias-em-portugal/>
2. JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA - **Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2013**. [Acedido a 11 set. 2020]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0055&from=PT>
3. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA - **Decreto-Lei 330/90** [Acedido a 16 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/home/-/dre/565417/details/maximized>
4. GLINTT - **Sifarma** [Acedido a 8 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
5. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA - **Decreto-Lei 95/2004** [Acedido a 10 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/223251/details/maximized>
6. PARLAMENTO EUROPEU - **Plástico nos oceanos: os factos, os efeitos e as novas regras da UE** [Acedido a 10 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.europarl.europa.eu/news/pt/headlines/society/20181005STO15110/plastico-nos-oceanos-os-factos-os-efeitos-e-as-novas-regras-da-ue>
7. Operação Luz Verde. Escolha Livre - Inquérito aos utentes. - Revista Farmácia Portuguesa, n.º 238. (2020) 32–33
8. INFARMED, I. P. - **Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde** [Acedido a 22 ago. 2020]. Disponível na Internet: https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%FF%FF%FF%FFo/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872?version=1.3&previewFileIndex=
9. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA - **Decreto-Lei 134/2005** [Acedido a 24 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/dir/pdfs/2005/08/156A00/47634765.pdf>
10. RENASCENÇA - **Medicamentos sem receita. Liberalização no mercado provoca**

redução de 6%, atual. 2020. [Acedido a 25 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://rr.sapo.pt/2020/08/24/pais/medicamentos-sem-receita-liberalizacao-no-mercado-provoca-reducao-de-6/noticia/204489/>

11. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA - **Decreto-Lei n.º 209/94** [Acedido a 25 ago. 2020]. Disponível na Internet: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068535/044_DL_209_94_VF.pdf

12. INFARMED - **Medicamentos genéricos** [Acedido a 28 ago. 2020]. Disponível na Internet: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano/genericos

13. CORREIA, A. - **Realidade dos medicamentos genéricos em Portugal** [Acedido a 28 ago. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2219894/A+realidade+dos+Medicamentos+Genéricos+em+Portugal/2409f6d5-152e-492d-aa72-55f7ad19a690>

14. INFARMED, I. P. - **Medicamento Genérico - Cronologia** [Acedido a 28 ago. 2020]. Disponível na Internet: https://app10.infarmed.pt/25_anos/cronologia/genericos.html

15. INFARMED, I. P.; MERCK, S. A. - **EUTIROX ® (levotiroxina) comprimidos: monitorização dos doentes durante a transição para a nova fórmula**, atual. 2019. [Acedido a 1 set. 2020]. Disponível na Internet: https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/download-ficheiro.xhtml?tipo_doc=MMR&filename=Eutirox/DHPC_Eutirox_versao-final-02-08-2019.pdf

Anexo - TABELA ANTIBIÓTICOS

Tabela 2- Tabela de Antibióticos comercializados em Farmácia Comunitária em Portugal.

Classes Antibióticas	Antibiótico Princípio Ativo	Formulação	Administração		Observações
			Alimentos Jejum	Com	
Aminopenicilinas	Amoxicilina	Pó para suspensão oral			
		Cápsulas	X	X	
		Comprimidos			
Isoxazolipenicilinas	Flucloxacilina	Comprimidos dispersíveis			
		Pó para suspensão/solução oral	X		
Amidinoenicilinas	Pivmecillinam	Comprimidos (R)		X	
	Cefatrizina	Cápsulas	X	X	
1ª geração	Cefradina	Pó para suspensão oral			
		Cápsulas	X	X	
		Comprimidos (R)			
2ª geração	Cefaclor	Pó/Granulado para suspensão oral	X	X	"O Cefaclor é bem absorvido após administração oral, em indivíduos em jejum. A absorção total não se altera na presença de alimentos; no entanto os níveis de pico no plasma ficam reduzidos em cerca de metade e o pico é atrasado." (17 RCM)
		Cápsulas			
	Comprimidos de L.M.	X		"O CECLOR RETARD é administrado por via oral, sendo bem absorvido quer tomado durante ou fora das refeições. Contudo, a absorção é aumentada quando administrado com alimentos. Os comprimidos de CECLOR RETARD não devem ser partidos, esmagados ou mastigados." (17 RCM)	
	Cefeprozil	Pó para suspensão oral	X	X	
	Comprimidos				
3ª geração	Cefuroxima	Granulado para suspensão oral		X	A absorção aumenta com alimentos.
		Comprimidos (R)			
	Cefixima	Pó para suspensão oral	X	X	
		Comprimidos (R)			

Associações de penicilinas com inibidores das lactamases beta	Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Pó para suspensão oral	x	Sempre que possível no início da refeição.
		Comprimidos dispersíveis		
		Comprimidos (R)		
Tetracilinas	Doxiciclina	Comprimidos dispersíveis	x	
		Cápsulas de L.M.		
		Cápsulas Comprimidos (R)		
Aminoglicosídeos	Bacitracina + Neomicina	Comprimidos	x	"A absorção das formulações orais de Minociclina é afetada pelos alimentos, leite e outros produtos alimentares." (in RCM)
Macrólidos	Azitromicina	Pó para suspensão oral	x	
		Comprimidos (R)		
		Granulado para suspensão oral		
	Clarithromicina	Comprimidos (R)	x	
	Eritromicina	Comprimidos L.M. ou L.P.	x	
		Granulado para suspensão oral Comprimidos (R)		
Sulfonamidas e suas associações	Espiramicina	Comprimidos (R)	x	"A absorção da espiramicina é rápida (tempo de semiabsorção = 20 minutos) mas incompleta. Não é alterada pela ingestão de alimentos." (in RCM)
		Comprimidos		
	Sulfadiazina	Xarope	x	"Tomar Labozina com alimentos e bebidas. Não são conhecidas quaisquer interações da sulfadiazina com alimentos ou bebidas." (in FI)
		Comprimidos		
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	Comprimidos	x	Preferencialmente após as refeições.
Quinolonas	Ciprofloxacina	Comprimido (R)	x	"Podem ser tomados independentemente da hora das refeições. Se forem tomados com o estômago vazio, a substância ativa é absorvida mais rapidamente." (in RCM) "O cálcio dietético, como parte integrante de uma refeição normal, não afeta significativamente a absorção. No entanto, a administração concomitante de apenas produtos lácteos ou bebidas suplementadas com minerais (ex. leite, iogurte, sumo de laranja suplementado com cálcio) com
		Cápsulas		

						ciprofloxacina deve ser evitada, uma vez que a absorção da ciprofloxacina pode ser reduzida." (in RCM)
Levofloxacina	Comprimidos (R)	X	X	X	"Os comprimidos de Levofloxacina devem ser tomados pelo menos 2 horas antes ou após a administração de sais de ferro, sais de zinco, antiácidos com magnésio ou alumínio, didanosina (apenas formulações de didanosina com alumínio ou magnésio e com um tampão) e sucralfato, dado que pode ocorrer uma redução da absorção."	
Moxifloxacina	Comprimidos (R)	X	X	X		
Norfloxacina	Comprimidos (R)	X	X	X	Atenção! Antiácidos, sucralfato, multivitâmicos ou suplementos contendo ferro, zinco, magnésio ou alumínio devem ser tomados 2 horas antes ou depois da administração de Norfloxacina. Não administrar junto! (in Drugs.com)	
Ofloxacina	Comprimidos (R)	X	X	X	"O cálcio dietético, como parte integrante de uma refeição normal, não afeta significativamente a absorção. No entanto, a administração concomitante de apenas produtos lácteos ou bebidas suplementadas com minerais (ex. leite, iogurte, sumo de laranja suplementado com cálcio) com ciprofloxacina deve ser evitada, uma vez que a absorção da ciprofloxacina pode ser reduzida." (in RCM)	
Prulifloxacina	Comprimidos (R)	X	X	X		
Ácido Fusídico	Comprimidos (R)	X	X	X		
Clindamicina	Cápsulas	X	X	X		
Fosfomicina	Granulado para solução oral	X	X	X	Recomenda-se a administração depois de ter esvaziado a bexiga.	
Metronidazol	Comprimidos (R)	X	X	X	"Os doentes devem ser advertidos no sentido de não ingerirem álcool durante o tratamento com metronidazol e durante pelo menos um dia após o concluírem, devido à possibilidade de uma reação tipo dissulfiram (efeito antiabus: rubor, cólicas abdominais, vômitos e taquicardia)." (in RCM)	
Rifaximina	Comprimidos (R)	X	X	X	Ver Metronidazol.	
Subcitrate de bismuto potássico + Metronidazol + Tetraciclina	Cápsulas	X	X	X		
Etambutol	Comprimidos	X	X	X	"Tende-se em regra a dar a dose diária de uma só vez, depois do pequeno-almoço." (in RCM)	
Rifampicina	Suspensão oral	X	X	X	"A absorção da rifampicina é reduzida quando o fármaco é ingerido com alimentos."	
	Cápsula	X	X	X		

Andreia Cardoso & Marta Matias – Fevereiro 2020

(R) – Comprimidos revestidos ou revestidos por película; L.M. – Libertação Modificada; L.P. – Libertação Prolongada

Parte II

Monografia

**Avaliação da emergência de resistência à colistina mediada
por plasmídeos em *Escherichia coli***

LISTA DE ABREVIATURAS

AWaRe – *Access, Watch e Reserve*

BGN – Bactérias Gram-negativas

CAPs – Polipéptidos Catiônicos Antimicrobianos

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

CLSI – Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial

CMI – Concentração Mínima Inibitória

ddNTPs – Didesoxirribonucleosídeos Trifosfatados

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleótidos Fosfatados

EUA – Estados Unidos da América

EUCAST – Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

L-Ara4N – 4-amino-4-deoxi-L-arabinose

LPS – Lipopolissacarídeos

mcr – *Plasmid-mediated Colistin Resistance*

MDR – *Multidrug-resistant*

MPM – Marcador de Peso Molecular

NDH-2 – NADH:quinona oxirredutase do tipo II

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

PDR – *Pandrug-resistant*

pEtN – Fosfoetanolamina

TCSs – Sistemas Reguladores

UV – Ultravioleta

WGS – Sequenciação Completa do Genoma

XDR – *Extensively drug-resistant*

Resumo

Os antibióticos revolucionaram totalmente a medicina e a visão acerca das doenças infecciosas. Agora, menos de um século depois da sua descoberta, a resistência aos antimicrobianos dita uma nova realidade. Os antibióticos outrora eficazes já não o são, havendo ainda ausência de desenvolvimento de novos antibióticos.

Os antibióticos foram ampla e inadequadamente empregues durante décadas. Aplicações excessivas em várias áreas, nomeadamente na indústria pecuária, levaram ao desenvolvimento de resistências bacterianas aos mesmos. A colistina, antibiótico atualmente considerado de última linha para uso humano, é apenas um exemplo dentro de tantos.

Com o objetivo de avaliar o impacto do uso da colistina na suinicultura, foi realizado um estudo longitudinal onde se recolheram amostras de fezes das mães porcas aquando do nascimento dos leitões e dos respetivos leitões ao longo da sua vida. A prevalência e disseminação de genes *mcr* em isolados bacterianos de *Escherichia coli* foi avaliada por Reação de Polimerase em Cadeia, tendo sido detetados genes *mcr-1* e *mcr-4*, respetivamente, em 49,79% e 6,28% das amostras analisadas. A prevalência destes genes foi diminuindo com o crescimento dos leitões.

Tendo em conta os resultados obtidos e os padrões de resistência atuais, é necessário avaliar cautelosamente quando e sob que regras utilizar os antibióticos. O risco de dentro de poucos anos vivermos uma era pós-antibiótica é elevado.

Palavras-chave: Colistina; *Escherichia coli*; Genes *mcr*; Resistência aos antimicrobianos.

Abstract

Antibiotics led to a medicine revolution and permanently changed our vision over infectious diseases. But now, less than a century after its discovery, antimicrobial resistance poses a new reality. Previously effective antibiotics are no longer effective, and the development of new antibiotics is not undergoing.

Antibiotics have been widely and inadequately used for decades. Excessive applications in several areas, namely in the livestock industry, led to antibiotic resistance development. Colistin, an antibiotic currently classified as a last-resort antibiotic for human use, is just an example among so many.

To evaluate the impact of colistin usage in the livestock industry, a longitudinal study was conducted where sows and piglets' fecal samples were collected at birth time and during piglets' lifetime. The prevalence and dissemination of *mcr* genes in *Escherichia coli* bacterial isolates were evaluated by Polymerase Chain Reaction, where *mcr-1* and *mcr-4* genes were detected, respectively, in 49.79% and 6.28% of the studied samples. The prevalence of these genes decreased with piglets' growth.

Considering the obtained results and the actual resistance patterns, correct needs evaluation and carefully assess to antibiotics usage is most necessary. The risk that we all live in a post-antibiotic era in a close future is high.

Keywords: Colistin; *Escherichia coli*; *mcr* genes; Antimicrobial resistance.

I. “One Health”

O conceito “One Health” define que a saúde humana está intrinsecamente ligada e relacionada com a saúde animal e com os ecossistemas onde os seres vivos estão inseridos. (1,2)

Atualmente, revela-se essencial a aplicação do conceito de “One Health” em áreas como o combate da resistência aos antibióticos, a segurança alimentar e o controlo de zoonoses. (3) Seis em cada dez doenças infecciosas verificadas em humanos são transmitidas por animais. (4)

Em pleno século XXI, vivemos numa sociedade global, cujo elevado crescimento demográfico verificado, aliado à frenética e constante movimentação de mercadorias e animais a nível mundial, assim como as migrações populacionais, são fatores que permitem a rápida transmissão e disseminação de doenças. (1,5) As alterações climáticas verificadas nos últimos anos e as que se prevêem acontecer têm também um grande impacto na saúde global (1). Por todos estes motivos, o conceito de “One Health” é imprescindível e institui-se com base na coordenação de esforços por parte de várias entidades competentes, como sejam os governos, associações e organizações. (2)

Os objetivos principais deste conceito passam por possibilitar a deteção, prevenção e o tratamento de surtos de zoonoses, bem como problemas relacionados com a segurança alimentar e as ameaças à saúde pública que possam surgir, para que se viva numa realidade onde as doenças possam ser tratadas e as mortes evitadas. (3)

2. Antibióticos, a revolução terapêutica do século XX

As doenças infecciosas têm marcado, desde sempre, e por vezes de forma trágica, a história da humanidade. É um exemplo disso a Peste Negra, a pandemia de peste bubónica ocorrida na Idade Média, em que se estima que, só na Europa, um terço da população não tenha resistido à infeção por *Yersinia pestis*, acabando por morrer. (6)

A descoberta dos antibióticos e o início da vacinação, assim como a melhoria das condições higiénico-sanitárias, permitiram que as mortes por doenças infecciosas diminuíssem, e no final do século XX, eram as doenças cardíacas e o cancro as principais causas de morte nos países desenvolvidos, afastando do topo da lista as infeções. (7,8)

É assim inevitável falar-se da importância dos antibióticos. Os antibióticos representaram uma revolução na forma como se abordam as infeções e o seu tratamento. Teve para isso um papel importantíssimo Sir Alexander Fleming quando, em 1928, observou a inibição do crescimento de estafilococos, aquando a contaminação acidental com *Penicilium notatum* das placas de crescimento das culturas bacterianas. Os estudos realizados por Fleming, impulsionados pelas suas observações, conduziram à descoberta de um produto produzido pelo fungo que ali tinha crescido, a Penicilina. (6)

Com o avançar dos anos, e à medida que novos antibióticos foram descobertos e os processos de produção simplificados, a medicina evoluiu e o acesso a este tipo de medicamento acabou por se tornar fácil e altamente difundido. (9) A utilização deste tipo de terapêutica deixou de ser restrita a humanos e passou a ser utilizada também em plantas e animais. (10)

Foi durante a 2ª guerra mundial, época em que a necessidade de antibióticos se mostrou evidente, que várias Indústrias Farmacêuticas dos Estados Unidos da América (EUA) investiram na investigação e desenvolvimento de novos antibióticos, bem como nos testes para averiguar a viabilidade da medicação em massa de animais. (6,10)

Rapidamente se percebeu que a administração de ração e água adicionadas de medicação, nomeadamente antibióticos, iriam, não só controlar as doenças, como aumentar rendimentos e diminuir os riscos de perdas para os produtores. Algum tempo depois descobriu-se também que o uso animal de antibióticos em doses sub-terapêuticas tinha a capacidade de promover o rápido crescimento e ganho de peso dos animais, o que tornava o processo de produção ainda mais rentável. Depressa as fronteiras do que era o uso antibiótico a nível terapêutico, profilático ou como promotor de crescimento se tornaram turvas e estes passaram a ser usados em praticamente todas as indústrias agropecuárias. Desde a indústria de produção de

porcos, galinhas, perus, vacas, passando pelo peixe e pelo mel, praticamente todas passaram a integrar a utilização de antibióticos. Uma aplicação antibiótica, de início praticamente isenta de regulação, contribuiu de forma indiscutível para um dos mais graves problemas do século XXI, as resistências aos antibióticos. (10)

2.1. As resistências aos antibióticos

A adaptação é um processo natural dos seres vivos que conduz à sobrevivência e continuação das espécies. Como tal, a resistência das bactérias aos antibióticos resulta da sua adaptação perante o contacto com algo potencialmente nocivo e letal para as mesmas. Fala-se então de uma “Pressão Seletiva”, em que somente as bactérias com capacidade de sobreviver perante um antibiótico serão selecionadas para a continuação da espécie. (9)

Embora o aparecimento de resistência seja um processo evolutivo normal, este tem sido acelerado pela pressão seletiva exercida pelos antibióticos. São vários os fatores que contribuem para este desenvolvimento acelerado de resistências antibacterianas a que assistimos nos dias que correm. As elevadas taxas de prescrição antibiótica, as prescrições de antibióticos de largo espectro em detrimento de espectro reduzido, a realização de automedicação antibiótica, a não finalização do período de tratamento e ainda a utilização de antibióticos como promotores de crescimento animal, são exemplos de fatores de risco para o desenvolvimento de resistência antibiótica. (6,9) De um modo geral, é o uso generalizado e muitas vezes inapropriado dos antibióticos que contribui para o aparecimento de resistências.

Foi desde cedo que Sir Alexander Fleming alertou para o facto de que o uso indevido da Penicilina poderia levar ao aparecimento de “formas mutantes” de *Staphylococcus aureus*. (9) As declarações foram prestadas numa entrevista ao jornal *The New York Times*, em 1945, e foi no final dos anos 40 que se demonstrou que as previsões eram certas. (9,11)

Hoje em dia, as resistências antibióticas representam um problema de saúde global. Segundo o relatório apresentado pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), só nos EUA, por ano, ocorrem mais de 2,8 milhões de infeções por bactérias resistentes a antibióticos e mais de 35 mil pessoas morrem em consequência disso. (12)

A situação piora quando uma bactéria se torna resistente a mais do que um antibiótico, pois nessa situação, as alternativas terapêuticas começam a escassear. (13) Assim, surgem definições importantes para que se consiga fazer uma correta classificação da situação de resistência bacteriana, como apresentado na Tabela I.

Tabela 1 - Designações internacionais para resistências adquiridas a antimicrobianos (13)

Designação Inglês	SIGLA	DEFINIÇÃO
Designação Português		
<i>Multidrug-resistant</i>	MDR	Resistência a um ou mais agentes em três ou mais classes de antimicrobianos.
Multirresistentes		
<i>Extensively drug-resistant</i>	XDR	Resistência a pelo menos um agente em todas as classes, exceto em duas ou menos classes de antimicrobianos.
Extensivamente resistentes		
<i>Pandrug-resistant</i>	PDR	Resistência a todos os agentes de todas as classes de antimicrobianos.
Pan-resistentes		

As consequências do desenvolvimento de resistências antimicrobianas têm impacto tanto no doente como no sistema de saúde e ao nível da sociedade em geral. Para o doente, uma infeção por uma bactéria resistente está associada a uma maior taxa de morbilidade e mortalidade. Ao nível do sistema de saúde, uma bactéria resistente a um ou mais antibióticos implica a utilização de alternativas terapêuticas, com aumento da utilização de recursos (exemplo: quartos de isolamento, luvas, etc.), e consequente aumento dos custos associados ao tratamento. Ao nível da sociedade, a necessidade de alterações de *guidelines* implica muitas vezes a utilização de alternativas terapêuticas mais tóxicas ou menos eficazes. (14)

Tendo em conta o escasso desenvolvimento de novos antibióticos na atualidade e o rápido aparecimento de resistências antibióticas, hoje, mais do que nunca desde o início da era antibiótica, é necessário um olhar crítico sobre a forma como se usa esta terapêutica. (9)

3. Antibióticos de última linha: a colistina

Os antibióticos integram a “Lista de Medicamentos Essenciais” da Organização Mundial de Saúde (OMS). A necessidade de um uso cuidado e ponderado dos antibióticos, por forma a controlar o desenvolvimento de resistências antibacterianas, levou à criação da classificação *Access*, *Watch* e *Reserve* (AWaRe). Desta forma, é feita a divisão dos antibióticos em três classes distintas, conforme podemos ver na Tabela 2. (15,16)

Tabela 2 - Classificação AWaRe da OMS. (15,16)

Grupos	Exemplos
Access group <ul style="list-style-type: none">• Antibióticos efetivos contra um grande grupo de agentes patogénicos.• Recomendados como primeira ou segunda linha de tratamento para patologias infecciosas definidas.• Apresentam um potencial de desenvolvimento de resistência inferior ao dos antibióticos dos outros grupos.• Devem ser acessíveis e a sua qualidade deve ser garantida.	Amoxicilina Ampicilina Cloranfenicol Metronidazol
Watch group <ul style="list-style-type: none">• Classes antibióticas consideradas primeira ou segunda linha terapêutica para tratamento de um número restrito e específico de patologias infecciosas.• Apresentam um potencial de desenvolvimento de resistência mais elevado que os do <i>Access Group</i>.• Devem ser incluídos em programas de monitorização terapêutica.	Macrólidos (ex.: Azitromicina) Glicopeptídeos (ex.: Vancomicina) Carbapenemos (ex.: Meropenem) Quinolonas e Fluoroquinolonas (ex.: Ciprofloxacina)
Reserve group <ul style="list-style-type: none">• Antibióticos e classes antibióticas que devem ser reservadas para o tratamento de infeções, suspeitas ou confirmadas, por organismos multirresistentes.• Devem ser consideradas como últimas opções terapêuticas, sendo única e exclusivamente usadas quando todas as outras alternativas terapêuticas falharam ou não se adequam.• Devem ser incluídos em programas de monitorização terapêutica para que a sua efetividade seja preservada.	Fosfomicina Meropenem + Vaborbactam Polimixinas (ex.: Colistina) Oxazolidinonas (ex.: Linezolida)

Obtida pela primeira vez no final da década de 40, por isolamento do lipopéptido produzido pela bactéria *Paenibacillus polymyxa*, a colistina, também chamada de polimixina E, pertence à classe antibiótica das polimixinas. (6,17)

Apesar da sua eficácia, durante vários anos, a utilização da colistina foi afastada da prática clínica. As neuro- e nefrotoxicidades causadas pelo antibiótico, assim como o aparecimento de alternativas terapêuticas, com menos efeitos secundários, faziam com que não fosse o antibiótico preferencialmente escolhido. (18)

O desenvolvimento de resistências antibióticas a outras classes terapêuticas, outrora efetivas, fez com que a utilização da colistina fosse necessária e assim, hoje, este antibiótico é uma opção terapêutica bastante válida e necessária para casos de infeções por bactérias multirresistentes em humanos. (17,18)

3.1. Mecanismo de ação da colistina

O mecanismo de ação da colistina ainda não foi totalmente esclarecido mas, do que se sabe, a atividade antibacteriana direta relaciona-se fundamentalmente com a desorganização da membrana externa presente nas bactérias Gram-negativas (BGN). (9,17,19)

A colistina é um polipéptido catiónico (carga positiva) e os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das BGN são aniónicos (carga negativa). Ao haver o contacto entre a colistina e a membrana externa, ocorre uma interação electrostática desencadeada pela diferença de cargas que, conseqüentemente, evolui para a desorganização da membrana externa bacteriana. Adicionalmente, a colistina atua deslocando os iões cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), responsáveis pela estabilização das moléculas de LPS da membrana, levando a um estado de desestruturação da membrana. A sinergia dos dois processos resulta numa intensificação da desorganização da membrana externa, com conseqüente aumento da permeabilidade celular e posterior morte celular da bactéria. (19)

Além do mecanismo antibacteriano direto referido, que é atualmente o mais bem descrito e documentado, outras hipóteses têm sido investigadas. Por exemplo, a colistina reduz a capacidade de indução de choque pois, ao neutralizar as moléculas de LPS, neutraliza a endotoxina das BGN, o lípido A, parte constitutiva desses LPS. (19) Demonstrou-se também que as polimixinas, onde se enquadra a colistina, têm a capacidade de inibir a NADH:quinona oxirredutase do tipo II (NDH-2), uma das enzimas envolvidas na cadeia respiratória bacteriana. (20)

3.1.1. Espectro de ação da colistina

A colistina apresenta uma excelente atividade antibacteriana contra a maioria dos bacilos Gram-negativos aeróbios, salvo algumas exceções, conforme apresentado na Tabela 3. A

colistina não é efetiva contra cocos Gram-positivos e Gram-negativos aeróbios, bacilos Gram-positivos aeróbios, todos os anaeróbios, fungos e parasitas. (17,19)

Tabela 3 - Suscetibilidade natural de bacilos Gram-negativos aeróbios à colistina (17)

BACILOS GRAM-NEGATIVOS AERÓBIOS	
Naturalmente suscetíveis à colistina	Naturalmente resistentes à colistina
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Burkholderia mallei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Providencia spp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Serratia spp.</i>
<i>Shigella spp.</i>	<i>Edwardsiella spp.</i>
<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Brucella spp.</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	

3.2. Resistência adquirida à colistina

A colistina é um antibiótico de uso humano e veterinário. Apesar de em humanos se tratar de uma terapêutica de última linha, nos animais o cenário é diferente.

Na medicina veterinária a colistina é utilizada em animais terrestres e aquáticos nas respectivas indústrias pecuária e de aquicultura. É aplicada de forma preventiva e para tratamento de infecções provocadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e de outras BGN, além de usada como promotor de crescimento animal. Apesar de, atualmente, a regulamentação e preocupação com este antibiótico terem mudado, durante décadas, a colistina foi, um pouco por todo o mundo, aplicada de forma imprudente. (17,21)

Hoje, considera-se que o uso generalizado e disseminado desta polimixina na agropecuária teve um impacto muito significativo no desenvolvimento de resistências adquiridas a este que é um antibiótico de última linha para o tratamento de infecções por bactérias MDR, XDR e PDR em humanos. (17)

Do que se sabe atualmente, a resistência à colistina é consequência ou de mutações cromossomais no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) bacteriano ou da obtenção de DNA externo, através de plasmídeos. (22)

Conhecem-se, até ao momento, quatro mecanismos que levam à proteção das BGN da ação da colistina, tendo como consequência a resistência a este antibiótico. São eles: (23,24)

- Alteração do lípido A do LPS da membrana externa;
- Perda do LPS da membrana externa;
- Bombas de efluxo;
- Formação de uma cápsula de polissacáridos.

Dentro dos mecanismos decifrados, sabe-se que o mais comum passa pela alteração do lípido A do LPS da membrana externa. (23,24) Essencialmente, esta modificação é feita pela adição enzimática de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N), fosfoetanolamina (pEtN) ou galactosamina aos grupos fosfato do lípido A, parte constitutiva do LPS. (22) Note-se que a adição de galactosamina ao lípido A é mais rara e verifica-se em *Acinetobacter baumannii*, uma bactéria que não possui os genes cromossomais para a síntese e transporte de L-Ara4N. (22)

A alteração pós-tradução do LPS manifesta-se numa redução da carga negativa da membrana externa, afetando a interação que iria ocorrer com a colistina. É assim impedida a ação antibiótica do fármaco. (22)

São vários os sistemas, genes e operões envolvidos na modificação do LPS, estando alguns deles representados na Figura 1. Destacam-se: (22,23,24)

- a) Genes e operões responsáveis pela síntese de enzimas que atuam na modificação do lípido A do LPS, como o gene *pmrC* e o operão *arnBCADTEF* (ou também designado operão *pmrHFIJKLM*).
- b) Sistemas Reguladores (TCSs) como o PhoP-PhoQ (PhoPQ), PmrA-PmrB (PmrAB) ou CrrA-CrrB (CrrAB).
- c) Gene *mgrB*, cuja proteína codificada inibe o TCS PhoPQ.
- d) Genes *mcr*, que codificam transferases para adição de pEtN ao lípido A.

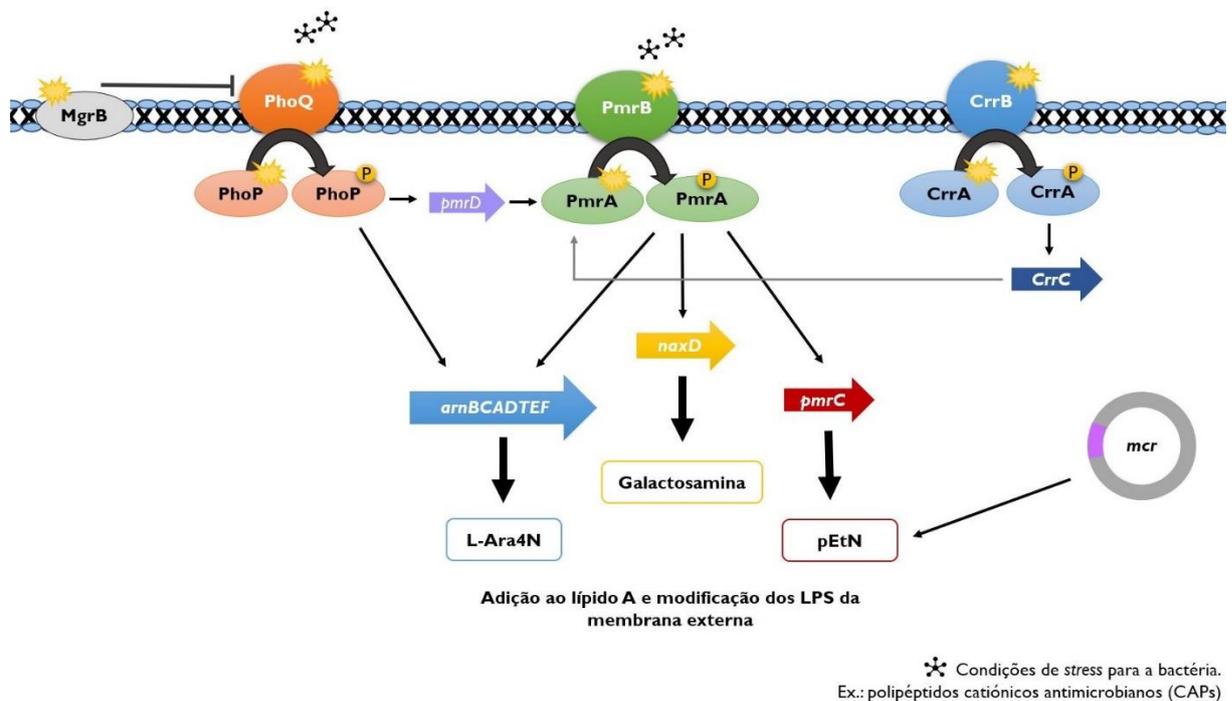


Figura 1 - Representação esquemática de alguns dos processos envolvidos na modificação do LPS. (22,23,24)

3.2.1. Resistência cromossomal à colistina

A maioria dos mecanismos de resistência à colistina estão codificados no cromossoma.

Os TCSs são sistemas que controlam a maioria dos genes envolvidos na modificação do LPS da membrana externa. Estes sistemas reguladores são constituídos por uma cinase transmembranar, que sofre fosforilação perante determinados fatores de stress, e por um regulador citoplasmático, que é fosforilado em consequência da prévia fosforilação da cinase transmembranar. (22)

PhoPQ e PmrAB, dois TCSs presentes em várias bactérias, são sistemas compostos pelas cinases transmembranares PhoQ e PmrB, e pelos reguladores citoplasmáticos, PhoP e PmrA, respetivamente. Perante um fator de stress, como por exemplo, a presença de polipéptidos cationicos antimicrobianos (CAPs), onde se insere a colistina, a PhoQ ou PmrB sofrem fosforilação. Por sua vez, as PhoP ou PmrA sofrem fosforilação e vão ativar os genes que conduzem à produção e adição de L-Ara4N, pEtN ou galactosamina ao lípido A da membrana externa. (22)

Dentro dos vários genes, operações e vias envolvidas no processo de alteração dos LPS, é de salientar que: (22,23,24)

- A ativação do operon *arnBCADTEF* leva à produção e adição de L-Ara4N ao lípido A;

- A ativação do gene *pmrC* leva à produção e adição de pEtN ao lípido A;
- O produto do gene *pmrD*, derivado do TCS PhoPQ, ativa o TCS PmrAB;
- A ativação do gene *naxD* leva à produção e adição de galactosamina;
- O TCS CrrAB ativa, através do CrrC, o TCS PmrAB.

É importante mencionar que diferentes bactérias apresentam diferentes TCSs, mecanismos e genes envolvidos para sua proteção e desenvolvimento da resistência à colistina. (22,23)

Por exemplo, em *Klebsiella pneumoniae* existe o gene *mgrB*, que codifica uma proteína transmembranar, MgrB, que vai inibir o sistema PhoPQ. Ao haver uma alteração nesse gene, por inativação ou mutação, a inibição do sistema PhoPQ é travada e este é ativado. A mesma bactéria possui a cinase CrrB, cujas mutações se traduzem na ativação do TCS PmrAB. Como resultado ocorrem as modificações aos LPS da membrana, pelo mecanismo já descrito. (22)

As resistências cromossomais à colistina são resultado da ocorrência de mutações nos genes ou operões envolvidos nos mecanismos de alteração dos LPS da membrana externa. Há assim uma *upregulation* destes sistemas e a ação antibacteriana da colistina é impedida. (22,23)

3.2.2. Resistência plasmídica à colistina

Até ao final do ano de 2015 somente os mecanismos cromossomais de resistência à colistina eram conhecidos. Foi na China, durante um estudo que tinha como objetivo a monitorização de resistências antimicrobianas em isolados de *Escherichia coli* provenientes de animais de indústrias pecuárias, que se observou um elevado aumento de resistências à colistina nos últimos anos. Verificou-se que a rápida disseminação de resistência estava relacionada com a transmissão horizontal de genes. Foi assim descoberto e sequenciado o primeiro gene plasmídico que conferia resistência à colistina, *plasmid-mediated colistin resistance (mcr)*, *mcr-1*. (25)

Desde então já foram descritas variantes do gene *mcr-1* e foram descobertos mais nove genes *mcr* (*mcr-1* a *-10*). (17,26)

A presença de mais do que um gene *mcr* foi verificada em isolados de *E. coli* e *Salmonella spp.*, de amostras humanas e animais da Europa e da China. Por exemplo, foi já relatada a presença conjunta de *mcr-1* com *mcr-3* e *mcr-1* com *mcr-4*. (17)

A obtenção de um gene *mcr* confere à bactéria a capacidade de codificar uma transferase de pEtN, a MCR. Assim a bactéria terá capacidade de adicionar pEtN ao lípido A, com a consequente modificação do LPS da membrana externa. (22,23) Esta alteração, da mesma

forma que foi descrita para os mecanismos cromossomais de resistência, resulta numa perda da eficácia antibiótica da colistina.

Os genes plasmídicos *mcr*, conferentes de resistência, por poderem ser transmitidos horizontalmente, permitem uma rápida e acelerada disseminação da resistência à colistina. Note-se que as mutações cromossomais conferentes de resistência à colistina em *E. coli* são difíceis de ocorrer e a transmissão é essencialmente vertical. (17,25)

3.3. Custo biológico da resistência à colistina

A aquisição de resistências antimicrobianas por parte das bactérias tem um impacto significativo e por isso, hoje, surge lado a lado com a mesma importância de outros fatores de virulência. (27)

Independentemente do modo de obtenção da resistência, através de mutações cromossomais ou por plasmídeos com genes conferentes de resistência, esta poderá implicar um custo biológico para a bactéria, refletindo-se no *fitness* da própria célula bacteriana. Este custo biológico poderá traduzir-se numa diminuição da sua taxa de crescimento e, conseqüentemente, capacidade de transmissão. (28) Deste modo, seria expectável que, diminuindo a exposição aos antibióticos, as bactérias sensíveis, isto é, sem resistência e alegadamente mais “*fit*”, acabassem por prosperar e que houvesse uma eliminação das bactérias mutantes resistentes ou a perda desses genes conferentes de resistência. (27,28)

Aquando a aquisição da resistência, o custo biológico para a bactéria dessa nova característica pode, efetivamente, tornar-se prejudicial no caso desta não lhe vir a ser útil, como por exemplo, em caso de ausência de exposição ao antibiótico. (28) No entanto, perante uma contínua exposição ao antibiótico, e conseqüentemente, uma contínua pressão seletiva, o custo biológico deixará de ser prejudicial pois assim permite a sobrevivência da espécie. Sabe-se hoje também que as próprias bactérias podem compensar esse custo biológico com as designadas mutações compensatórias, que lhes permitem manter a resistência mesmo sem exposição ao antibiótico e, ainda assim, serem epidemiologicamente viáveis. (27,28)

Ao longo dos últimos anos e perante a crescente, acelerada e preocupante subida do número de resistências antimicrobianas, vários estudos têm sido feitos para investigar de que forma se podem tentar reverter as resistências adquiridas. Investigações têm sido conduzidas para que se conheçam desde os mecanismos associados ao custo biológico causado pelas resistências até às técnicas para que as consigamos reverter clinicamente.

Hoje já se conseguiu perceber que a probabilidade de desenvolvimento de uma mutação compensatória tende a ser muito superior à probabilidade de eliminação de mutações conferentes de resistência e assim, é expectável que estas se mantenham durante várias gerações e longos períodos de tempo. (27) As mutações compensatórias são, portanto, uma grande vantagem para a sobrevivência de estirpes resistentes e traduzem-se numa dificuldade acrescida na hipótese de reversão de resistências.

Têm sido estudadas várias técnicas para reversão de resistências nos últimos anos, passando por banir, reduzir ou ciclizar a utilização de antibióticos. (28,29) O sucesso deste tipo de técnica seria essencial para combater a urgência de antibióticos efetivos numa atualidade onde o desenvolvimento de novos antibióticos é reduzido. Perante a ideia de que rapidamente os antibióticos podem deixar de ser eficazes ou com o facto de que para evitar isso sejam considerados de última linha terapêutica, condicionando as vendas e recuperação do investimento em investigação e desenvolvimento, este processo torna-se economicamente pouco apelativo para a Indústria Farmacêutica. (6)

Apesar de todo o conhecimento que hoje existe sobre as resistências antimicrobianas, há ainda muitas perguntas sem resposta. É por isso, e tendo em conta o panorama atual nesta área, que é necessária uma regrada e cuidadosa utilização destes fármacos para que, sob o risco da regressão de resistências não vir a ser uma realidade, não vivamos brevemente uma era pós-antibiótica.

4. Detecção de resistência à colistina

Casos de resistência à colistina têm sido verificados em isolados bacterianos um pouco por todo o mundo. Existem hoje métodos fenotípicos que permitem detetar a resistência à colistina e métodos genotípicos que permitem detetar os mecanismos específicos inerentes a essa resistência. Pretende-se, portanto, que através do rastreio se possa controlar e conter a disseminação da resistência a esta que é uma terapêutica essencial de última linha. (17)

4.1. Métodos fenotípicos

A concentração mínima inibitória (CMI) é a concentração mais baixa de antimicrobiano necessária para inibir o crescimento do organismo. As CMIs dos antimicrobianos permitem-nos inferir, quantitativamente, acerca da suscetibilidade bacteriana a determinado antibiótico. Consegue-se, portanto, saber se existe resistência ao antibiótico e, se sim, qual o nível de resistência. (30)

Para avaliação da suscetibilidade bacteriana existem diversos métodos fenotípicos possíveis de ser usados, essencialmente sendo divididos em testes fenotípicos pelo método de difusão e testes fenotípicos pelo método de diluição em caldo. (17,30,31)

Os testes fenotípicos usando métodos de difusão incluem, por exemplo, a difusão em gel com discos ou os testes de difusão em gel com *E-test*. (17,30) Nestes testes, suportes com antibiótico, são colocados sobre placas previamente inoculadas com a bactéria em análise. As placas são seguidamente incubadas nas condições descritas em *guidelines* do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI) ou do Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST). Durante a incubação o agente antimicrobiano é difundido para a placa e assim inibe o crescimento bacteriano, criando uma zona designada por “zona de inibição”. O diâmetro desta zona, no caso do método de difusão em disco, é, após a incubação, medido e, com recurso às tabelas de referência, classificam-se as bactérias relativamente à sua suscetibilidade. Através das curvas de conversão de referência, ou através da realização de *E-test*, conseguem obter-se valores aproximados de CMI. É assim determinada a suscetibilidade bacteriana e o grau de resistência antibiótica. (30,31)

O teste fenotípico pelo método de diluição em caldo usualmente utilizado para determinação de CMI é o da microdiluição em caldo. (17,30) Consiste em diluições sucessivas da concentração de antibiótico em microplacas cujos poços são posteriormente inoculados com suspensões bacterianas. Após incubação, em condições descritas em *guidelines*, averigua-se o

crescimento bacteriano. A CMI é determinada como a concentração de antibiótico do poço imediatamente anterior aquele onde se observa crescimento bacteriano. (30)

O CLSI e o EUCAST, definiram, em 2016, que a determinação da suscetibilidade à colistina deve ocorrer segundo o método da microdiluição em caldo. A norma ISO 20776-1 presta as orientações necessárias para essa determinação em *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* (17)

4.2. Métodos genotípicos

O genótipo bacteriano é definido como toda a informação genética contida na célula bacteriana. (32) Os métodos genotípicos permitem-nos investigar a presença de genes ou mutações cromossômicas que possam conferir resistência aos antimicrobianos nas estirpes bacterianas. (17)

A pesquisa de alterações genotípicas conferentes de resistência à colistina é feita essencialmente de duas formas (17):

- Mediante realização de reação de polimerase em cadeia (PCR) e posterior eletroforese, para pesquisa da presença de genes plasmídicos conferentes de resistências, os genes *mcr*;
- Através de sequenciação, que permite a deteção tanto de genes *mcr*, como de mutações cromossomais. A sequenciação pode ser feita para regiões específicas, para pesquisa de uma mutação ou gene particular, ou ser uma sequenciação completa do genoma (WGS), que permite detetar vários genes e mutações cromossomais em simultâneo. A sequenciação é realizada após amplificação do material genético por PCR.

A reação de PCR baseia-se na amplificação do material genético em quantidades suficientes para que possam, posteriormente, ser detetadas através de uma eletroforese e analisado por sequenciação. O PCR *multiplex* permite que nessa reação de PCR sejam amplificados vários genes em simultâneo. (33)

A pesquisa dos genes *mcr* faz-se, habitualmente, através de um PCR seguido de eletroforese. Atualmente encontram-se descritos dois *multiplex*s para a pesquisa de genes *mcr-1* até *mcr-9*, um para *mcr-1* a *mcr-5* (34) e outro para *mcr-6* a *mcr-9* (35). O processo inicia-se com a extração do DNA e posteriormente adiciona-se esse DNA a um conjunto de reagentes, como a *Taq* polimerase, *primers* e desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTP). Perante determinados ciclos de temperatura é promovida, no termociclador, a replicação do DNA. Após o PCR, as

amostras são colocadas num gel de agarose e realiza-se uma corrida de eletroforese. O DNA migra através do gel, mediante o seu peso molecular, e o uso de controlos positivos e negativos é essencial, assim como um marcador de peso molecular (MPM). A avaliação do resultado é feita com recurso a uma lâmpada ultravioleta (UV) em que, por comparação com os controlos e o MPM, se conclui acerca da presença/ausência dos genes *mcr*. (33,34)

Os *multiplex*s já otimizados e publicados para a deteção dos genes *mcr* não incluem a deteção do gene *mcr-10*. Neste caso existe a necessidade de realizar um PCR próprio para sua deteção, avaliação e estudo. A sequenciação não é obrigatória, no entanto é frequentemente realizada por forma a confirmar a identidade do gene.

A amplificação dos genes associados a mutações cromossomais implica sempre a sequenciação do produto amplificado. A WGS permite a sequenciação de todo o genoma bacteriano, levando à obtenção de imensa informação num único ensaio. A WGS consiste em três fases, com isolamento bacteriano, obtenção e quantificação do DNA extraído; preparação das bibliotecas genómicas e sequenciação; e por fim a análise bioinformática. (36)

Os resultados das avaliações genotípicas devem ser reportados como presença/ausência de genes ou mutações que levam a resistência à colistina. Principalmente por ainda não se conhecerem todos os mecanismos que conferem resistência à colistina, um resultado genotípico negativo não é sinónimo de suscetibilidade bacteriana ao antibiótico e um teste genotípico positivo é um indicador provável de resistência, mas não garantido. (17)

5. Trabalho experimental

A colistina é um antibiótico de última linha utilizado para tratamento de infeções por BGN multirresistentes em humanos e, por isso, o desenvolvimento de resistências representa um problema de saúde pública a nível mundial. A utilização do antibiótico na indústria pecuária e a transmissão horizontal dos genes *mcr* possibilitam a rápida disseminação desta resistência.

Tendo em conta a atualidade do tema, foi realizado um estudo longitudinal cujo objetivo era relacionar o impacto da utilização da colistina na indústria de produção de porcos, seguindo as mães porcas e os respetivos leitões, na prevalência e disseminação de genes *mcr-1* a *-5* em isolados de *Escherichia coli*.

O trabalho de investigação contou com a colaboração de vários colegas e professores da área e foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, entre maio e novembro de 2019.

5.1. Origem das amostras

As amostras utilizadas no estudo foram recolhidas numa exploração portuguesa de produção de porcos, entre novembro de 2011 e abril de 2012. Foram escolhidas, aleatoriamente, 10 porcas e 7 leitões de cada uma das porcas. Fizeram-se recolhas das fezes em 5 fases da vida dos suínos. Aquando do nascimento dos leitões foram recolhidas amostras fecais das mães porcas e dos respetivos leitões. Posteriormente, recolheram-se amostras dos leitões após o desmame, na unidade de berçário, na unidade de fim e antes do abandono da unidade de fim.

5.2. Material biológico

O material biológico utilizado para a pesquisa foi DNA, extraído dos isolados bacterianos de *Escherichia coli* provenientes das amostras fecais das mães porcas e respetivos leitões.

5.3. Pesquisa de genes *mcr*

Partindo do DNA, que já tinha sido previamente extraído, procedeu-se à pesquisa de genes plasmídicos conferentes de resistência à colistina, *mcr-1* a *-5*, através de PCR *multiplex* e posterior deteção de resultados em gel de agarose por eletroforese.

O protocolo seguido para a pesquisa baseou-se no protocolo mais completo à data do trabalho (34). No nosso laboratório, o protocolo original necessitou de ser otimizado e, a pesquisa foi dividida em 2 partes, com a pesquisa de *mcr-1* juntamente com *mcr-3* e *mcr-2* com

mcr-4 e *mcr-5*. As quantidades de reagentes sofreram igualmente modificações. Assinala-se que foi realizada a verificação necessária de que estas alterações ao protocolo não iriam alterar a veracidade dos resultados obtidos, recorrendo ao uso de controlos positivos (34,37-40).

5.3.1. Amplificação do DNA – PCR *multiplex*.

As quantidades e reagentes usados para preparar a mistura para PCR, para cada tubo, foram as seguintes:

Tabela 4 - Reagentes e respetivas quantidades utilizadas para realização do PCR *multiplex*.

<i>DreamTaq Green PCR Master MIX 2x</i> (Thermo Fisher)	10 µl
Primers 10 µM	0,5 µl (cada)
DNA	2 µl
Água (<i>Water nuclease-free</i> – Thermo Fisher)	Até um volume de 20 µl

Durante o procedimento, todos os reagentes foram colocados em gelo, por forma a controlar a temperatura.

Inicialmente foi preparada a mistura do *DreamTaq Green PCR Master MIX*, com os *primers* e a água num tubo *ependorf* na quantidade necessária para o total de amostras, um controlo positivo e um controlo negativo, mais um, conforme recomendado no protocolo de referência. A pipetagem de reagentes era sempre feita recorrendo às micropipetas com o nível de sensibilidade mais adequado às medições e trocando de pontas quando necessário.

Após a realização da mistura, esta foi dividida por tubos de microcentrifuga individuais, colocando um volume de 18 µl em cada um deles.

Posteriormente, procedeu-se à adição dos 2 µl de DNA das amostras em cada um dos tubos. Por forma a se preparar o controlo negativo, num dos tubos eram adicionados 2 µl de água. Noutro dos tubos, por forma a preparar o controlo positivo, os 2 µl de DNA eram de misturas iguais dos genes *mcr* de controlo. Conforme referido, a pesquisa dos genes foi feita em dois grupos, pelo que num ensaio eram colocados 1 µl do controlo positivo *mcr-1* e 1 µl do controlo positivo *mcr-3*. Na outra pesquisa, eram colocados, aproximadamente, 0,7 µl de controlo positivo *mcr-3*, 0,7 µl de controlo positivo *mcr-4* e 0,7 µl de controlo positivo *mcr-5*.

Os tubos com a mistura foram colocados no termociclador (Biometra), segundo a sequência: 94°C 15 min. + 25 ciclos (94°C 30 seg. + 58°C 90 seg. + 72°C 60 seg.) + 72°C 10 minutos.

Após a finalização do PCR procedeu-se à eletroforese em gel de agarose para deteção dos produtos amplificados.

5.3.2. Deteção de resultados – Eletroforese

Para deteção dos resultados, as amostras, depois de sujeitas a PCR para amplificação genética, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Primeiramente procedeu-se à preparação do gel de agarose. Pesando-se 0,6 g de agarose e misturando com 40 ml de tampão TAE (previamente preparado em solução de 1,0% m/v), após aquecimento obteve-se uma solução de agarose a 1,5%. Posteriormente adicionaram-se 4 µl de Brometo de Etídio (10 mg/mL), um agente intercalante de DNA que floresce quando exposto à luz UV. Depois de devidamente homogeneizada, esta solução foi colocada no suporte de eletroforese, previamente preparado com o pente. Após arrefecimento e solidificação do gel, durante cerca de 15 a 30 minutos, o pente era retirado e o gel colocado na tina de eletroforese.

A tina de eletroforese continha tampão TAE na concentração de 0,5%. Após imersão do gel na solução tampão procedeu-se à pipetagem de 8 µl de cada uma das amostras para cada poço. No primeiro poço era sempre colocado o MPM, numa solução de 1 kb, da Thermo Fisher. No poço seguinte o controlo positivo, depois controlo negativo e só depois as amostras.

Procedeu-se então à corrida eletroforética, com tempos de corrida que rondavam os 20 a 30 minutos, com um valor de 80 Volts.

No final o gel era retirado da tina de eletroforese e colocado sob lâmpada UV, procedendo-se à observação dos resultados.

5.4. Sequenciação

Tendo em conta a deteção de algumas amostras *mcr-4* positivas após realização de PCR *multiplex* e eletroforese, procedeu-se à confirmação deste resultado através de sequenciação.

A sequenciação foi efetuada pelo laboratório *STAB VIDA*, localizado na Caparica. As sequências foram analisadas no Sequencher[®] e comparadas com as sequências conhecidas no BLAST[®].

5.4.1. Purificação das amostras

Previamente ao envio para sequenciação fez-se a purificação das amostras.

A purificação do produto amplificado em PCR das amostras permite a eliminação do excesso de *primers* e nucleótidos, possibilitando que os resultados obtidos em sequenciação não sofram influência desses mesmos reagentes. (41)

O produto utilizado para proceder à purificação foi o *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent*, da Thermo Fisher, segundo o protocolo cedido pela própria marca (42), que está abaixo enunciado.

Por cada 5 µl do produto de PCR eram adicionados 2 µl do *ExoSAP-IT™*. A mistura era colocada no termociclador para incubação a 37°C por 15 minutos, para proceder à degradação dos *primers* e nucleótidos, seguida de novo aquecimento, desta vez à temperatura de 80°C durante 15 minutos por forma a degradar o reagente *ExoSAP-IT™*. O produto obtido foi enviado para o laboratório para sequenciar.

5.4.2. Sequenciação pelo Método de Sanger

A sequenciação dos produtos de PCR foi efetuada através do método de Sanger.

O método de Sanger baseia-se na utilização de didesoxirribonucleosídeos trifosfatados (ddNTPs), análogos dos dNTPs, mas que não possuem o grupo hidroxilo em 3' (3'-OH), numa reação de extensão de DNA. Para a reação são necessários primers, DNA polimerase, dNTPs e ddNTPs. Em quatro tubos ocorrem reações diferentes, cada tubo para cada ddNTP, Adenina, Timina, Citosina e Guanina. O processo inicia-se com a desnaturação do fragmento de DNA e assim são obtidas as cadeias molde. Durante as reações de extensão, os ddNTPs são incorporados aleatoriamente e, uma vez que são desprovidos do 3'-OH, é impossível formar a ligação fosfodiéster com o grupo fosfato em 5' do dNTP que se seguiria. Assim, durante o processo, a extensão de cadeia vai parar em pontos distintos, originando cadeias de tamanhos diferentes e com finalizações diferentes, consoante o ddNTP final. Por fim, é feita uma eletroforese e a migração das cadeias no gel de poliacrilamida, e a consequente separação por tamanhos, permite inferir acerca da sequência de nucleótidos do fragmento molde de DNA. Com o avançar dos anos a técnica original já sofreu modificações e já é possível, hoje, que os ddNTPs sejam marcados com marcadores fluorescentes e a deteção seja feita em eletroforese capilar. (43)

5.5. Resultados e conclusões

Foram considerados 80 suínos no estudo. O gene *mcr-1* apenas foi detetado numa mãe porca, mas não nos seus leitões à nascença. Assim podemos concluir que a transmissão vertical, ou seja, das mães porcas para os respetivos leitões, de *Escherichia coli* não parece acontecer.

Os resultados obtidos das amostras recolhidas nos leitões encontram-se representados na Tabela 5. Note-se que não se verificou a presença de genes *mcr-4* isoladamente, pelo que o resultado é referente à presença simultânea do gene *mcr-1* e *mcr-4*. A coluna total reflete o número e valor percentual de amostras que testaram positivo para os genes de resistência avaliados, no respetivo momento da vida dos leitões. Este valor pode também ser interpretado como o total de amostras com presença do gene *mcr-1*, uma vez que é a soma da presença individual de *mcr-1* com a presença de *mcr-1* em simultâneo com *mcr-4*. A linha horizontal total representa o número e percentagem de vezes que os genes *mcr-1* e *mcr-4* foram detetados face ao número total de amostras estudadas, em todo o tempo de vida dos leitões.

Tabela 5 - Resultados obtidos nos leitões.

Momento da recolha da amostra	Apenas <i>mcr-1</i>		<i>mcr-1</i> e <i>mcr-4</i>		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Nascimento (<i>n</i> =65)	2	3,08%	-	-	2	3,08%
Depois do desmame (<i>n</i> =61)	40	65,57%	2	3,28%	42	68,85%
Unidade de berçário (<i>n</i> =36)	26	72,22%	10	27,78%	36	100%
Unidade de fim (<i>n</i> =40)	33	82,5%	3	7,5%	36	90%
Antes do abandono da unidade de fim (<i>n</i> =37)	3	8,1%	-	-	3	8,1%
Total (<i>n</i> TOTAL AMOSTRAS = 239)	104	43,51%	15	6,28%	119	49,79%

“-” significa “ausente”.

A sequenciação do gene *mcr-4* amplificado permitiu identificar um novo alelo *mcr-4*, com a diferença de um nucleótido.

A colistina foi usada na exploração de produção de porcos para controlo das doenças gastrointestinais nos suínos, por forma a diminuir a mortalidade por infeções bacterianas nos

leitões. Assim, a presença de amostras com genes de resistência *mcr* poderá dever-se a uma pressão seletiva exercida pela colistina e consequente adaptação bacteriana.

É possível perceber-se que, com o avançar do tempo e crescimento dos leitões, houve uma diminuição do número de amostras com genes de resistência. Sabe-se também que, a certa altura durante o crescimento dos leitões, foi retirada a administração da colistina. Após o aparecimento de resistências devido à administração de antibióticos, e consequente adaptação bacteriana, é possível que as mesmas desapareçam perante a eliminação da necessidade de proteção. Ou seja, uma vez que a manutenção dos genes *mcr*/plasmídeos conferentes de resistência pode implicar um custo biológico para a bactéria, perante a eliminação da necessidade de proteção, quando o antibiótico é retirado, as bactérias parecem sofrer nova adaptação, perdendo esses mesmos genes/plasmídeos. Podemos supor que terá sido essa a situação nesta exploração pecuária.

A produção em massa de animais para consumo é um dos fatores que mais potencia a necessidade de utilização dos antibióticos de forma profilática na indústria pecuária. As condições sanitárias verificadas nestes estabelecimentos e o elevado número de animais vivos num pequeno espaço não permite um controlo eficaz de doenças e, para isso, recorre-se frequentemente à administração profilática de terapêuticas antibióticas. O intuito é evitar mortes ou adoecimento de vários ou todos os animais. No entanto, já percebemos que a exposição bacteriana aos antibióticos nestes termos tem como consequência o aparecimento de resistências aos antibióticos.

É, portanto, essencial perceber de que modo as condições de produção animal podem ser alteradas para que a utilização de antibióticos na indústria agropecuária seja mais restrita, regrada e legislada, para que os antibióticos continuem a ser uma terapêutica eficaz quando verdadeiramente necessária.

6. Conclusão

A adaptação no sentido da sobrevivência é um mecanismo que está presente em todos os seres vivos. As resistências antimicrobianas são apenas mais um exemplo disso. A exposição de uma bactéria a um antibiótico estimula a sua capacidade adaptativa, sendo que esta desenvolve os mecanismos necessários para sobreviver, os designados mecanismos de resistência antimicrobiana. Para os humanos, este é um problema quando as bactérias resistentes, infetando e provocando doença na espécie humana, não conseguem ser eliminadas do organismo, mesmo com antibioterapia. Anualmente já se contabilizam milhares de mortes a nível mundial tendo como causa infeções por bactérias resistentes e prevê-se um agravamento do cenário nos próximos anos. Podemos estar a escassos passos de uma era pós-antibiótica e é, agora, mais que nunca, urgente repensar-se a forma como se faz a aplicação desta terapêutica. O uso profilático, desmedido ou sem qualquer avaliação de suscetibilidade aos antimicrobianos são práticas a eliminar.

A pandemia de COVID-19 que vivemos demonstrou-nos que as zoonoses são um problema grave, real e que a facilidade de expansão e disseminação destas doenças muito se relaciona com o nosso estilo de vida atual. Perante condições propícias a tal, uma transposição de espécie pode dar-se, podendo implicar consequências devastadoras. É, portanto, imprescindível que o controlo da utilização de antibióticos seja transversal a todas as áreas, desde o setor agrícola, à produção animal e aos cuidados de saúde.

Pudemos também nos últimos meses perceber o que é um ser vivo invisível provocar uma doença para a qual não há tratamento, nem vacina, colocando-nos a todos em risco. Extrapolando este cenário do domínio viral para o mundo bacteriano, podemos calcular quão assustadora e ameaçadora poderá vir a ser a realidade numa era pós-antibiótica.

Um exemplo claro de um antibiótico que é de última linha para uso humano, mas para o qual já existem resistências bacterianas, derivadas da sua má aplicação durante anos, principalmente na indústria pecuária, é a colistina. Este é o caso de uma terapêutica que conseguiria ser extremamente eficaz e salvar vidas mas que, tendo em conta as resistências antimicrobianas à mesma, poderá não o ser.

Todo este problema é agravado pelo facto de quer alguns dos mecanismos de ação dos antibióticos, quer os mecanismos de resistência aos mesmos, não serem totalmente conhecidos. Não conhecendo cada processo ao pormenor torna-se ainda mais difícil perceber o que é preciso fazer, trabalhar e investigar para termos antibióticos efetivos.

As resistências antimicrobianas representam um problema grave para a saúde humana sendo cada vez mais urgente a consciencialização e atuação para a regrada utilização dos antibióticos. O Farmacêutico tem também um papel preponderante no controlo e combate à disseminação das resistências antimicrobianas: desde a investigação de novos antibióticos, ao auxílio médico na prescrição antibiótica, à realização de antibiogramas, à indicação aos doentes em contexto de dispensa para seguirem os tratamentos antibióticos de maneira adequada, entre outros. Só assim será possível que os antibióticos continuem a ser um medicamento disponível de forma eficaz.

Referências Bibliográficas

1. CDC - **One Health Basics** [Acedido a 30 dez. 2019]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
2. ONE HEALTH GLOBAL NETWORK - **What is One Health?** [Acedido a 30 dez. 2019]. Disponível na Internet: <http://www.onehealthglobal.net/what-is-one-health/>
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **One Health** [Acedido a 30 dez. 2019]. Disponível na Internet: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/one-health>
4. CDC - **One Health** [Acedido a 30 dez. 2019]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/onehealth/>
5. UC DAVIS - **One Health Facts** [Acedido a 30 dez. 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ucdavis.edu/one-health/facts/>
6. CUNHA, B. R. DA; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. - **Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go?**. *Antibiotics*. ISSN 20796382. 8:2 (2019) 45. doi: 10.3390/antibiotics8020045
7. CDC - **Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of Infectious Diseases**. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. ISSN 0022-1899 (Print). 48:29 (1999) 621–629
8. **The global burden of disease. A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020**. Geneva : The Harvard School of Public Health on Behalf of The World Health Organization and The World Bank, (1996). ISBN 0-9655466-0-8
9. ALANIS, A. J. - **Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era?**. *Archives of Medical Research*. ISSN 01884409. 36:6 (2005) 697–705. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009
10. KIRCHHELLE, C. - **Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017)**. Palgrave Communications. ISSN 20551045. 4:96 (2018). doi: 10.1057/s41599-018-0152-2
11. PODOLSKY, S. H. - **The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018)**. Palgrave Communications. ISSN 20551045. 4:124 (2018). doi: 10.1057/s41599-018-0181-x
12. CDC - **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. Atlanta : [s.n.]

[Acedido a 9 jan. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>

13. MAGIORAKOS, A. P. *et al.* - **Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.** *Clinical Microbiology and Infection*. ISSN 14690691. 18:3 (2012) 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

14. FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. - **The negative impact of antibiotic resistance.** *Clinical Microbiology and Infection*. ISSN 14690691. 22:5 (2016) 416–422. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002

15. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, 2019** [Acedido a 13 jan. 2020]. Disponível na Internet: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf>

16. SHARLAND, M. *et al.* - **Classifying antibiotics in the WHO Essential Medicines List for optimal use - be AWaRe.** *The Lancet Infectious Diseases*. ISSN 14733099. 18:1 (2018) 18–20. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30724-7

17. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **The detection and reporting of colistin resistance,** atual. 2018. [Acedido a 13 jan. 2020]. Disponível na Internet: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf>

18. OZKAN, G. *et al.* - **How does colistin-induced nephropathy develop and can it be treated?.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. ISSN 00664804. 57:8 (2013) 3463–3469. doi: 10.1128/AAC.00343-13

19. FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. - **Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections.** *Clinical Infectious Diseases*. ISSN 0891-3668. 24:9 (2005) 945. doi: 10.1097/01.inf.0000174577.97635.7b

20. DERIS, Z. Z. *et al.* - **A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity.** *Journal of Antibiotics*. ISSN 00218820. 67:2 (2014) 147–151. doi: 10.1038/ja.2013.111

21. KEMPF, I.; JOUY, E.; CHAUVIN, C. - **Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals.** *International Journal of Antimicrobial Agents*. ISSN 18727913. 48:6 (2016)

598–606. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016

22. JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. - **Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms**. International Journal of Antimicrobial Agents. ISSN 18727913. 49:5 (2017) 526–535. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029

23. BARON, S. *et al.* - **Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns**. International Journal of Antimicrobial Agents. ISSN 09248579. 48:6 (2016) 583–591. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

24. AGHAPOUR, Z. *et al.* - **Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae**. Infection and Drug Resistance. ISSN 1178-6973. 12:2019 (2019) 965–975. doi: 10.2147/IDR.S199844

25. LIU, Y.-Y. *et al.* - **Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study**. The Lancet Infectious Diseases. ISSN 14733099. 16:2 (2016) 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7

26. WANG, C. *et al.* - **Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10**. Emerging Microbes & Infections. ISSN 2222-1751. 9:1 (2020) 508–516. doi: 10.1080/22221751.2020.1732231

27. MOURA DE SOUSA, J. *et al.* - **Potential for adaptation overrides cost of resistance**. Future Microbiology. ISSN 1746-0913. 10:9 (2015) 1415–1431. doi: 10.2217/fmb.15.61

28. SUNDQVIST, M. - **Reversibility of antibiotic resistance**. Upsala Journal of Medical Sciences. ISSN 0300-9734. 119:2 (2014) 142–148. doi: 10.3109/03009734.2014.903323

29. YOSHIDA, M. *et al.* - **Time-programmable drug dosing allows the manipulation, suppression and reversal of antibiotic drug resistance in vitro**. Nature Communications. ISSN 2041-1723. 8:15589 (2017). doi: 10.1038/ncomms15589

30. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **Global Salm-Surv. Laboratory Protocol - MIC determination by broth dilution using Sensititre.**, atual. (2010). [Acedido a 22 jan. 2020]. Disponível na Internet: http://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/55_16-03-mic-broth-dilution-sensititre-010405-modified-10-2010.pdf

31. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **Laboratory Protocol:**

- «**Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion**», atual. (2010). [Acedido a 22 jan. 2020]. Disponível na Internet: http://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/57_sop-dd-2010gfnlab002-v2.pdf
32. DICIONÁRIO PRIBERAM DA LÍNGUA PORTUGUESA - **genótipo** [Acedido a 23 jan. 2020]. Disponível na Internet: <https://dicionario.priberam.org/genótipo>
33. ROCHE LIFE SCIENCE - **Compare and Contrast: Multiplex vs. Singleplex PCR**, atual. (2015). [Acedido a 24 jan. 2020]. Disponível na Internet: https://www.lifescience.roche.com/en_pt/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html
34. REBELO, A. R. *et al.* - **Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes.** *Eurosurveillance*. ISSN 1560-7917. 23:6 (2018). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672
35. BOROWIAK, M. *et al.* - **Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant Salmonella enterica Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany.** *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1664-302X. 11:80 (2020). doi: 10.3389/fmicb.2020.00080
36. EURL-AR - **Protocol for whole genome sequencing and bioinformatic analysis of bacterial isolates related to the EU monitoring of antimicrobial resistance**, atual. (2020). [Acedido a 24 jan. 2020]. Disponível na Internet: https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/527_eurl-protocol-for-wgs-v1.pdf
37. FIGUEIREDO, R. *et al.* - **Detection of an mcr-1 -encoding plasmid mediating colistin resistance in Salmonella enterica from retail meat in Portugal: Table I.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. ISSN 0305-7453. 71:8 (2016) 2338–2340. doi: 10.1093/jac/dkw240
38. XAVIER, B. B. *et al.* - **Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2 , in Escherichia coli , Belgium, June 2016.** *Eurosurveillance*. ISSN 1025-496X. 21:27 (2016). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280
39. BOROWIAK, M. *et al.* - **Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B.**

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. ISSN 0305-7453. 72:12 (2017) 3317–3324. doi: 10.1093/jac/dkx327

40. CARATTOLI, A. *et al.* - **Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016.** Eurosurveillance. ISSN 1025-496X. 22:31 (2017). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589

41. THERMO FISHER SCIENTIFIC - **ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent**, atual. (2017). [Acedido a 27 jan. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78200.200.UL#/78200.200.UL>

42. THERMO FISHER SCIENTIFIC - **ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup - Brief Protocol**, atual. (2017). [Acedido a 27 jan. 2020]. Disponível na Internet: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F78200b.pdf&title=QnJpZWYgUHJvdG9jb2w6IEV4bINBUCIJVCBQQIlgUHJvZHVjdCBDbGVhbnVwIEJyaWVmlFBYb3RvY29s>

43. HEATHER, J. M.; CHAIN, B. - **The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA.** Genomics. ISSN 08887543. 107:1 (2016) 1–8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003