Barbara Riquena Pimentel

**Erradicação da *Pseudomonas aeruginosa* na colonização inicial
em pacientes com fibrose cística: avaliação do protocolo de um
centro de referência**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Fabíola Villac Adde

**São Paulo
2018**

Barbara Riquena Pimentel

**Erradicação da *Pseudomonas aeruginosa* na colonização inicial
em pacientes com fibrose cística: avaliação do protocolo de um
centro de referência**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Fabíola Villac Adde

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pimentel, Barbara Riquena
Erradicação da *Pseudomonas aeruginosa* na
colonização inicial em pacientes com fibrose cística
: avaliação do protocolo de um centro de referência
/ Barbara Riquena Pimentel. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Fabíola Villac Adde.

Descritores: 1.Fibrose cística 2.*Pseudomonas*
aeruginosa 3.Erradicação de doenças 4.Protocolos
5.Colistina 6.Ciprofloxacino

USP/FM/DBD-433/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha amada família, meu propósito e meu alicerce.

Agradecimentos

À minha querida mãe e incentivadora, Sandra, cujo amor e dedicação incondicionais foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Dra. Fabíola Adde, cuja maestria me inspira. Muito obrigada pela disponibilidade, carinho e generosidade em me orientar nessa jornada.

Ao meu marido, Márcio Júnior, pela parceria constante. Seu amor e apoio foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho.

À minha amada filha, Beatriz, por dar sentido às nossas vidas e às nossas conquistas.

À Deus pela minha vida, minha família, e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Ao Prof. Dr. Claudio Leone pela extrema contribuição na avaliação estatística e nos resultados do estudo.

À Dra. Luísa Nunes e ao Dr. Luiz Vicente R. F. Silva Filho por gentilmente compartilharem os dados de genética dos pacientes incluídos nesse trabalho.

À equipe da pneumologia pediátrica do ICr HC FMUSP pela amizade, e por serem exemplos de excelência na assistência aos pequenos pacientes e às suas famílias.

À Mônica Souza, secretária da pediatria, pela usual agilidade e boa vontade em me ajudar a trilhar o caminho da pós-graduação.

A todos os funcionários do serviço de arquivo médico do ICr HC FMUSP cuja ajuda foi essencial para que esse estudo pudesse ser feito.

“Pobre criança cuja testa ao beijo é salgada. Está enfeitiçada e logo morrerá”.

Alemanha, século XVIII

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1	Introdução	2
2	A Fibrose Cística	6
2.1	Fisiopatologia	7
2.2	Diagnóstico e apresentação clínica	10
2.3	Colonização das vias aéreas.....	14
3	A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.1	Adaptação da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à via aérea na fibrose cística	19
3.2	Diagnóstico da colonização das vias aéreas	23
3.3	Impacto clínico da colonização por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
4	Erradicação da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
4.1	Impacto clínico da erradicação da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
4.2	Protocolos de erradicação	29
4.3	Avaliação de Sucesso	37
5	Hipótese.....	42
6	Objetivos e Desfechos relacionados	44
6.1	Objetivo Primário	44
6.2	Objetivos Secundários.....	44
6.3	Desfechos e variáveis	44
7	Materiais e métodos	47
7.1	Desenho do estudo	47
7.2	População do estudo.....	47
7.2.1	Critérios de inclusão:	47
7.2.2	Critérios de exclusão:	48

7.3	Protocolo de erradicação da Pa	48
7.4	Monitoramento microbiológico das vias aéreas	51
8	Amostra e análise estatística.....	53
8.1	Justificativa da Amostra.....	53
8.2	Análise Estatística	53
9	Resultados	55
9.1	População do Estudo	55
9.2	Características clínicas e demográficas dos pacientes.....	56
9.3	Efetividade do protocolo de erradicação.....	57
10	Discussão.....	61
11	Conclusão	67
12	Referências	69

Lista de figuras

Figura 1: Incidência da fibrose cística (3)	2
Figura 2: Distribuição dos pacientes com FC quanto à origem (5)	3
Figura 3: Comparação do canal de cloro (CFTR) normal e alterado (14)	8
Figura 4: Classes de mutações do gene CFTR (16).....	9
Figura 5: Algoritmo para diagnóstico de fibrose cística (21)	11
Figura 6: Prevalência de patógenos por faixa etária (5)	15
Figura 7: Porcentagem dos pacientes com FC com Pa - 2009 a 2016 (5).....	18
Figura 8: Diagrama esquemático da evolução da colonização da via aérea pela Pa em pacientes com FC (28).....	19
Figura 9: Protocolo de erradicação da Pa em fases utilizado no centro de referência de FC do ICr HC FMUSP – 2004 a 2012.....	50
Figura 10: Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo	55
Figura 11: Distribuição da idade dos pacientes incluídos no estudo na colonização inicial por Pa	56
Figura 12: Descrição da efetividade do protocolo de erradicação da Pa	59

Lista de tabelas

Tabela 1: Escore de Shwachman-Kulczychi (23).....	13
Tabela 2: Resumo das classificações de colonização por Pa (31).....	22
Tabela 3: Recomendações internacionais para realização de cultura de via aérea em pacientes com FC de baixa idade (27)	24
Tabela 4: Protocolo dinamarquês de erradicação da Pa (33)	32
Tabela 5: Resumo de diferentes protocolos de erradicação da Pa estudados.....	35
Tabela 6: Características clínico-epidemiológicas dos pacientes no início de cada fase do protocolo de erradicação da Pa	57

Lista de abreviaturas

Ac	Anticorpo
Anti-Pa	<i>Anti-Pseudomonas aeruginosa</i>
ATB	Antibiótico
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CIS	Colistimetato sódico inalatório
CVF	Capacidade Vital Forçada
ENaC	Canal epitelial de sódio
EUA	Estados Unidos da América
EV	Endovenosa
FC	Fibrose Cística
FEF 25-75%	Fluxo expiratório forçado entre 25-75% da CVF
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
ICr	Instituto da Criança
IN	Inalatório
IRT	Tripsinogênio imunorreativo
LBA	Lavado bronco-alveolar
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
REBRAFC	Registro Brasileiro de Fibrose Cística
RNA	Ácido Ribonucleico
TIS	Tobramicina inalatória em solução
UI	Unidades Internacionais
VAI	Via aérea inferior
VEF1	Volume Expiratório Forçado no 1º segundo
VO	Via oral

Resumo

Pimentel BR. *Erradicação da Pseudomonas aeruginosa na colonização inicial em pacientes com fibrose cística: avaliação do protocolo de um centro de referência* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Objetivo: Diversas estratégias de erradicação da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) em pacientes com fibrose cística (FC) têm sido propostas, mas poucas realizaram o tratamento em fases e incluíram crianças na primeira colonização por Pa na vida. O objetivo desse estudo é descrever a efetividade do protocolo de erradicação em fases, em crianças brasileiras com FC no primeiro aparecimento de Pa. **Métodos:** Estudo de vida real, retrospectivo, que avaliou os prontuários dos pacientes pediátricos submetidos ao protocolo de erradicação em um período de 8,5 anos. O protocolo de 3 fases era guiado pela cultura de via aérea, e utilizou colistimetato nebulizado e ciprofloxacino oral. Foram avaliadas as taxas de sucesso após cada fase e a acumulada. **Resultados:** 47 episódios de colonização por Pa foram elegíveis à erradicação. A fase 1 do protocolo foi aplicada em 29 pacientes (mediana 2,7 anos, 59% masculino, 65% com no mínimo um alelo F508del), a fase 2 em 12 e a fase 3 em 6 pacientes. A taxa de sucesso foi de 58,6% (IC 95%: 40,7 a 74,5), 50,0% (IC 95%: 25,4 a 74,6) e 66,7% (IC 95%: 30,0 a 90,3), após as fases 1, 2 e 3 respectivamente. A taxa de sucesso acumulado foi de 93,1% (IC: 78,0 a 98,1). Apenas 2 pacientes tiveram falha do tratamento de erradicação. **Conclusão:** O primeiro aparecimento da Pa ocorreu em crianças de baixa idade. O protocolo de erradicação em fases foi efetivo com alta taxa de sucesso.

Descritores: fibrose cística; *Pseudomonas aeruginosa*; erradicação de doenças; protocolos; colistina; ciprofloxacino.

Abstract

Pimentel BR. *Eradication of new onset of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients: evaluation of a reference center protocol* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Background: Although several *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) eradication strategies have been proposed for Cystic Fibrosis (CF) patients, only a few have used a stepwise treatment and enrolled children in their first-onset Pa colonization. The purpose of this study is to describe the effectiveness of a multistep eradication protocol in CF Brazilian children in their first-onset Pa. **Methods:** This was a real life retrospective study that evaluated medical records of pediatric patients who underwent the eradication protocol in a timeframe of 8.5 years. The 3-step protocol was guided by airway culture, using inhaled colistimethate and oral ciprofloxacin. The success rate after each step, and also the cumulative success rate were evaluated. **Results:** During the study period, 47 Pa colonization episodes were eligible to eradication. All the 29 patients underwent protocol's step 1 (median 2.7 years old, 59% male, 65% with at least one F508del allele), twelve patients step 2, and six patients step 3. Success rate was 58.6% (CI 95%: 40.7 to 74.5), 50.0% (CI 95%: 25.4 to 74.6) and 66.7% (CI 95%:30.0 to 90.3), after step 1, 2 and 3 respectively. Cumulative success rate was 93.1% (CI: 78.0 to 98.1). Failure of the eradication protocol occurred in only 2 patients. **Conclusion:** First-onset Pa colonization occurred in very young children. The stepwise eradication protocol was effective with a high success rate.

Descriptors: cystic fibrosis; *Pseudomonas aeruginosa*; disease eradication; protocols; colistin; ciprofloxacin.

1 INTRODUÇÃO

1 Introdução

A fibrose cística (FC) é a doença genética autossômica recessiva, hereditária, fatal, mais frequente em populações de origem caucasiana, afetando cerca de 70.000 pessoas em todo o mundo (Figura 1) (1, 2). Na União Europeia, 1 em cada 2.000 a 3.000 recém-nascidos são afetados pela FC; nos EUA, esta frequência é de 1 em cada 3.500 recém-nascidos. Na América Latina, a composição étnica da população é bastante heterogênea, com uma incidência da FC variando de 1:3.900 a 1:8.500 nascidos vivos em Cuba e no México, respectivamente (2) .

FONTE: WHO, 2002

Figura 1: Incidência da fibrose cística (3)

Um estudo brasileiro realizado em 2001 estimou a incidência local de FC de 1:7.358 nascidos vivos. Tal análise incluiu cinco estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais) e detectou uma grande variação da incidência entre eles, que foi atribuída ao grau de miscigenação das regiões. O Rio Grande do Sul apresentou a maior estimativa com 1:1.587 nascidos vivos, enquanto a menor foi a de São Paulo com 1:32.258 nascidos vivos (4). Pode-se verificar a atual distribuição irregular dos pacientes com FC entre os estados brasileiros no último relatório do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) (Figura 2) (5).

Estado	nº pacientes	%
São Paulo	1185	25,5
Minas Gerais	527	11,3
Rio Grande do Sul	463	9,9
Bahia	451	9,7
Rio de Janeiro	389	8,4
Paraná	295	6,3
Santa Catarina	234	5,0
Espírito Santo	158	3,4
Pará	158	3,4
Ceará	115	2,5
Goiás	94	2,0
Distrito Federal	80	1,7
Pernambuco	76	1,6
Mato Grosso do Sul	54	1,2
Mato Grosso	51	1,1
Sergipe	45	1,0
Rio Grande do Norte	32	0,7
Alagoas	31	0,7
Maranhão	21	0,5
Paraíba	19	0,4
Amazonas	11	0,2
Tocantins	11	0,2
Piauí	10	0,2
Rondônia	9	0,2
Amapá	5	0,1
Acre	3	0,1
Roraima	3	0,1
Não informado	124	2,7
TOTAL	4654	100

FONTE: REBRAFC, 2016

Figura 2: Distribuição dos pacientes com FC quanto à origem (5)

Apesar de ser classicamente conhecida como uma doença letal, a qual muitas vezes impediu que os pacientes chegassem à vida adulta, muitos avanços ocorridos nas últimas décadas vêm mudando esta realidade para melhor. (2) . A mediana de idade estimada de sobrevida para pessoas com FC aumentou drasticamente nas últimas duas décadas. Dados do Registro da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) mostram que a mediana de sobrevida nos EUA em 1985 era de 27 anos e em 2011 era de 36,8 anos (6). Atualmente mais da metade dos pacientes está acima dos 18 anos de idade (28,3% no Brasil) (5) e a mediana prevista de sobrevida é de 47,7 anos para quem nasceu a partir de 2016 nos EUA (7), mas ainda a maioria dos pacientes encontra-se na faixa pediátrica com uma mediana de idade de 12 anos (5, 19).

2 A Fibrose Cística

A fibrose cística (FC), popularmente conhecida como “doença do beijo salgado”, teve sua primeira descrição anatomopatológica em 1905 por Landsteiner. Apenas 40 anos depois, em 1944, Farber introduziu o termo mucoviscidose como sinônimo da FC após formular a hipótese de que o muco espesso era responsável pelas lesões pulmonares e pancreáticas (8). Em 1951, Di Sant’Agnese et al. observaram que durante o verão muitos pacientes com FC foram internados com prostração térmica devido à perda de sal no suor. Tal achado direcionou os estudos para as glândulas exócrinas, o que levou à padronização do teste por Gibson e Cooke em 1959, com a coleta do suor estimulada pela iontoforese com pilocarpina (8, 9).

No Brasil, a primeira publicação tratando da FC foi uma revisão bibliográfica sobre a doença em 1949 escrita por Gesteira et al. Em 1981, Knowles et al. documentaram que indivíduos com FC, durante estresse, apresentavam absorção excessiva de sódio do lúmen das vias aéreas para as células epiteliais e vasos sanguíneos adjacentes, acarretando em desidratação pulmonar (10). No ano seguinte, Quinton et al. descobriram o defeito do transporte do íon cloro nas células epiteliais dos ductos das glândulas sudoríparas e aventaram a possibilidade de que um defeito generalizado na permeabilidade do íon cloro estava associado ao defeito principal da doença, causando as alterações características do pâncreas, intestino e pulmões (8). Em 1989, o gene da FC foi isolado no cromossomo 7 (11).

2.1 Fisiopatologia

Trata-se de uma doença monogênica autossômica recessiva, cuja alteração está localizada no braço longo do cromossomo 7. O gene da FC engloba aproximadamente 189.000 pares de bases de DNA. A parte codificada do gene é dividida em 27 éxons que transcrevem aproximadamente 6.500 pares de bases de RNA mensageiro (12).

O gene defeituoso acarreta a disfunção de uma proteína que se situa na membrana apical das células epiteliais (Figura 3). Recebem o nome de CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) tanto o gene quanto a proteína (13). A proteína CFTR é composta de uma cadeia linear de 1.480 aminoácidos formando um canal de cloro cAMP-regulado cuja principal função é ser um canal de transporte de cloro. Além disso, a CFTR também funciona como *down-regulator* do canal epitelial de sódio (ENaC) nas células em que ambos estão presentes (12).

FONTE: Luiz Vaca, 2015

Figura 3: Comparação do canal de cloro (CFTR) normal e alterado (14)

Atualmente há mais de 2.000 mutações do gene CFTR descritas (15), sendo a mais frequente e a mais estudada a F508del (deleção da fenilalanina na posição 508 do gene CFTR), considerada uma mutação "grave" por resultar em importante déficit funcional com manifestações clínicas clássicas da FC (13). As consequências funcionais das mutações podem ser agrupadas em 7 classes. De maneira resumida, as mutações de classe I afetam a síntese da proteína CFTR, as de classe II afetam o tráfego da proteína CFTR, as de classe III prejudicam o controle do canal CFTR, as de classe IV causam uma diminuição no fluxo de íons cloreto e bicarbonato, as

de classe V resultam em importante redução dos níveis de proteína CFTR normal, as de classe VI desestabilizam a CFTR na superfície celular, e as de classe VII são chamadas de mutações irreversíveis, porque não podem ser resgatadas farmacologicamente (exemplo: grandes deleções) (Figura 4) (16) .

FONTE: De Boeck & Amaral, 2016

Figura 4: Classes de mutações do gene CFTR (16)

Nos pulmões, a CFTR está na superfície apical das células epiteliais, incluindo a superfície das vias aéreas, as células serosas das glândulas submucosas e nos alvéolos. Quando há anormalidade na proteína, há diminuição da água da superfície líquida da via aérea, causando redução na espessura do fluido periciliar, disfunção do transporte ciliar, e redução na hidratação do muco. Todas essas condições combinadas levam à obstrução da via aérea (12). Uma vez estabelecida, a doença pulmonar na FC acomete principalmente a via aérea,

evoluindo depois para o parênquima pulmonar. A inflamação persiste por toda a vida danificando a parede brônquica o que culmina com a evolução para bronquiectasias. Com o passar do tempo as vias aéreas poderão ficar alargadas, preenchidas por secreção espessa, pus, e colônias bacterianas (12).

2.2 Diagnóstico e apresentação clínica

Nas últimas décadas, com a evolução dos métodos diagnósticos e as inovações no tratamento da fibrose cística o cenário dessa doença mudou positivamente, com aumento da sobrevida e ganho em qualidade de vida (7, 17, 18).

A maioria dos pacientes com suspeita clínica de FC tem seu diagnóstico confirmado pelo teste do suor, podendo ser complementado pela identificação de duas mutações causadoras de doença no gene CFTR (12). No Brasil, entre os pacientes inseridos no REBRAFC, a maioria foi diagnosticada por teste do suor, e aproximadamente 1/3 foi por triagem neonatal positiva (20).

O Brasil dispõe de um programa robusto de triagem neonatal e centros de referência presentes na maior parte dos estados (17), o que favorece um diagnóstico cada vez mais precoce em nosso país. Dados do REBRAFC do ano de 2016 mostram que a mediana de idade ao diagnóstico foi de 1,1 anos, em 4.646 pacientes registrados. Naqueles com diagnóstico baseado em aspectos clínicos a mediana foi de 4,4 anos, enquanto que nos triados a mediana foi cerca de 2 meses (5).

Nos últimos anos, a identificação das mutações no gene *CFTR* tem sido utilizada como método diagnóstico complementar. A diretriz brasileira de fibrose cística recomenda que todos os pacientes com FC devam ser submetidos ao exame genético. Baseado na mutação presente pode-se presumir as implicações prognósticas, além de ser fundamental para indicação de algumas medicações que visam melhorar a expressão da *CFTR* na membrana e o seu funcionamento (17) .

Recentemente, a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF), fundação americana para estudos em FC, desenvolveu um algoritmo com o objetivo de orientar o diagnóstico de FC nos pacientes com suspeita diagnóstica (Figura 5) (21) .

FONTE: CFF, 2017

Figura 5: Algoritmo para diagnóstico de fibrose cística (21)

Em relação à apresentação clínica, a disfunção da proteína CFTR resulta em uma doença sistêmica com grande variabilidade de sinais e sintomas, acometendo, preferencialmente, o sistema respiratório e gastrointestinal. Classicamente manifesta-se como doença sinopulmonar progressiva e supurativa, disfunção pancreática resultando em má absorção intestinal, alta concentração de eletrólitos no suor, e infertilidade masculina (12). Até 20% das crianças afetadas podem nascer com obstrução intestinal e apresentam íleo meconial. Embora a doença pulmonar progressiva seja a causa mais comum de mortalidade na FC, existe uma grande variabilidade na idade de início e na gravidade da doença pulmonar (3), que pode estar diretamente relacionada à mutação presente (12).

Com o objetivo de classificar os pacientes clinicamente, em 1958, Shwachman e Kulczycki publicaram um sistema de avaliação que contemplava quatro categorias relacionadas ao estado do paciente (Tabela 1), cada uma variando de 5 a 25 pontos, sendo a pontuação máxima de 100 pontos, refletindo excelente estado clínico (22). Lee et al. relataram que a mudança do escore de Shwachman-Kulczycki foi altamente significativa ($p < 0,0001$), com pontuações baixas relacionadas à Pa crônica (23).

Tabela 1: Escore de Shwachman-Kulczycki (23)

Graduação	Ponto	Atividade geral	Exame físico	Nutrição	Achados radiológicos
Excelente (86-100)	25	Atividade íntegra. Brinca, joga bola, vai à escola regularmente.	Normal. Não tosse. FC e FR normais. Pulmões livres. Boa postura.	Mantém o peso e estatura acima do percentil 25. Fezes bem formadas. Boa musculatura e tônus.	Campos pulmonares limpos.
Bom (71-85)	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência na escola.	FC e FR normais em repouso. Tosse rara. Pulmões livres. Pouco enfisema.	Peso e altura entre percentis 15 e 20. Fezes discretamente alteradas.	Pequena acentuação da trama vasobrônquica. Enfisema discreto.
Médio (56-70)	15	Necessita repousar durante o dia. Cansaço fácil após exercícios. Diminui a frequência à escola.	Tosse ocasional, às vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baqueteamento de dedos.	Peso e altura acima do percentil 3. Fezes anormais, pouco formadas. Distensão abdominal. Hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade. Aumento da trama vasobrônquica.
Moderado (41-55)	10	Dispneia após pequenas caminhadas. Repouso em grande parte.	Tosse frequente produtiva. Retração torácica. Enfisema moderado. Pode haver deformidade do tórax. Baqueteamento 2/3+.	Peso e altura abaixo do percentil 3. Fezes anormais. Volumosa diminuição da massa muscular.	Moderado enfisema. Áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta. Bronquiectasia.
Grave (40 ou menos)	5	Ortopneia. Confinado ao leite.	Tosse intensa. Períodos de taquipneia e taquicardia e extensas alterações pulmonares. Pode mostrar sinais de falência cardíaca direita. Baqueteamento 3/4+.	Desnutrição intensa. Distensão abdominal. Prolapso retal.	Extensas alterações. Fenômenos obstrutivos. Infecção, atelectasia, bronquiectasia.

FONTE: Adaptado de Shwachman H e Kulczycki LL, 1958.

2.3 Colonização das vias aéreas

A maior causa de morbidade e mortalidade dos pacientes com FC é a doença pulmonar decorrente da infecção bacteriana endobrônquica, inflamação e alteração estrutural das vias aéreas (24).

A diminuição da secreção do cloro e o aumento da reabsorção do sódio no epitélio respiratório leva ao aumento da absorção de água da camada de líquido periciliar prejudicando o transporte mucociliar e favorecendo a proliferação de patógenos específicos. Tais agentes podem causar infecções pulmonares e exacerbações frequentes com consequentes danos às vias aéreas, e perda da função pulmonar (25). Soma-se a isso o estresse do “ambiente” pulmonar levando à ocorrência de cepas bacterianas hipermutáveis, com ampla variedade genotípica e fenotípica, incluindo resistência antimicrobiana (18).

As bactérias mais comumente encontradas nas vias aéreas dos pacientes com FC são: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, fungos e micobactérias atípicas (Figura 6) (20).

FONTE: REBRAFC, 2016

Figura 6: Prevalência de patógenos por faixa etária (5)

3 A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

3 A *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), particularmente o fenótipo mucóide, foi reconhecida como um patógeno em 1970 (18). A Pa é um bacilo gram-negativo ubíquo ambiental, sendo o mais significativo agente na doença pulmonar da FC, sendo críticos a detecção e a prevenção precoces dessa bactéria (26). Os recém-nascidos com FC têm pulmões não colonizados, mas a colonização por Pa pode ocorrer muito precocemente e a sua prevalência aumentar com a idade (1, 26, 27).

A Pa é o patógeno oportunista mais prevalente nos pacientes com FC (25). Alguns registros internacionais mostram uma prevalência de colonização por Pa em crianças pré-escolares variando entre 9% e 30%, chegando a 70% nos adultos, mas a prevalência na população geral e a idade de aquisição da bactéria são ainda incertos (24, 28).

Lebecque et al., num estudo retrospectivo, mostraram que num período de 6 anos, a prevalência de Pa foi de 15 a 28% (29). Li et al., num estudo randomizado de 16 anos, onde foram acompanhados 56 neonatos com FC diagnosticados por triagem neonatal, mostraram que nos primeiros 6 meses de vida, 71% dos pacientes não tinham Pa e 29% adquiriram Pa não-mucóide. Entretanto, aos 13 anos de idade todos os pacientes já haviam adquirido Pa e 92% deles já tinham Pa mucóide. Como resultado o estudo mostrou que Pa não-mucóide foi adquirida na média de idade de 1 ano (95% CI, 0,6– 1,5) e Pa mucóide desenvolveu-se numa média de idade de 13 anos (95% CI, 10,0 – 14,9), e que o período de transição de Pa não-mucóide para mucóide ocorreu num média de 10,9 anos (95% CI, 9,6 – 14) (26).

Observa-se no Brasil um aumento progressivo da identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a bactéria mais frequentemente encontrada entre os adultos com FC (Figura 7) (5)

FONTE: REBRAFC, 2016

Figura 7: Porcentagem dos pacientes com FC com Pa - 2009 a 2016 (5)

Rosenfeld et al., num estudo de revisão, encontraram que os fatores de risco mais relacionados a colonização precoce por Pa incluem colonização pulmonar prévia por *Staphylococcus aureus*, tratamento antibiótico crônico anti-estafilocócico, sexo feminino, genótipo homozigoto F508del e infecção cruzada entre pacientes com FC (27).

3.1 Adaptação da *Pseudomonas aeruginosa* à via aérea na fibrose cística

Pacientes com FC que são inicialmente colonizados pela Pa, independentemente do tratamento, passam por um período de colonização intermitente antes da crônica (Figura 8). O microambiente particular das vias aéreas da FC permite uma seleção singular das pseudomonas adaptadas à colonização crônica. Esses microrganismos têm fenótipo mucóide, o que se traduz na formação de biofilmes de alginato extracelular, mantendo as colônias da bactéria em alta densidade, favorecendo a resistência aos antibióticos, sendo quase impossível a erradicação (1, 24).

FONTE: Rosenfeld, 2003

Figura 8: Diagrama esquemático da evolução da colonização da via aérea pela Pa em pacientes com FC (28)

Ao contrário da colonização crônica, as características da colonização precoce pela Pa incluem susceptibilidade aos antibióticos, fenótipo não-mucoide e baixa densidade bacteriana, o que configura uma “janela de oportunidade” durante a qual a terapia anti-Pa pode ser efetiva na erradicação da bactéria (1, 24).

Na maioria dos pacientes, um período médio de 12 meses de colonização intermitente precede a crônica e, aproximadamente, 10% dos indivíduos continuarão cronicamente colonizados a partir da sua primeira aquisição da Pa (30). Lee et al. em uma análise prospectiva, envolvendo 232 pacientes com FC, concluíram que o risco de novo crescimento de Pa nos pacientes livres de Pa ou nunca infectados foi de 4,1% e 2,2% por mês, respectivamente ($p < 0,02$). Entre os pacientes definidos como crônicos, 88% deles mantinham-se crônicos 5 anos depois, enquanto apenas 29% dos intermitentes progrediram para crônicos no mesmo período (23).

Acreditava-se que a colonização crônica por Pa não-mucoide precedia a colonização por Pa mucoide. Em 2018 foi publicada uma análise retrospectiva baseada nos dados de 5.592 pacientes registrados no *CFF Patient Registry* para avaliar essa relação longitudinal. Os resultados mostraram que entre os pacientes que desenvolveram Pa mucoide, 87% foi precedido de Pa crônica, mas 36% tiveram Pa mucoide na primeira colonização de Pa da vida, mostrando que tal premissa não é verdadeira (24).

Atualmente não há uma definição universal de colonização crônica (31), nem de colonização ou infecção, havendo uma grande diversidade de classificações na literatura (Tabela 2). Vale ressaltar que a acurácia de qualquer definição depende

da frequência das amostras de culturas de secreção de vias aéreas realizadas. O critério de Leeds (Tabela 2), um dos mais usados e o adotado no nosso centro de referência, recomenda que as culturas de secreção de via aérea devam ser coletadas trimestralmente num período de 12 meses. A partir dos resultados de tais culturas é possível classificar o paciente com FC quanto à colonização por Pa (23).

Tabela 2: Resumo das classificações de colonização por Pa (31)

Centro de Referência	CrITÉRIOS
Reino Unido (32)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção crônica: cultura de escarro positiva para Pa, em 2 ou mais ocasiões, estendendo-se além de 6 meses ou um período menor se acompanhado por aumento sustentado de anticorpo anti-Pa
Copenhague (33)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção intermitente: cultura positiva para Pa pelo menos uma vez e a presença de níveis normais de precipitina anti-Pa. • Infecção crônica: presença persistente da Pa por pelo menos 6 meses consecutivos ou menos combinado com a presença de 2 ou mais precipitinas anti-Pa
Alemanha e América do Norte (34, 35)	<ul style="list-style-type: none"> • Colonização crônica: mais de 50% de <i>swabs</i> orofaríngeos ou amostras de escarro positivas em 12 meses.
Alemanha (36)	<ul style="list-style-type: none"> • Colonização crônica: se na última amostra de escarro de cada ano crescer Pa.
Consenso Europeu (37)	<ul style="list-style-type: none"> • Colonização pulmonar: Presença de Pa na árvore brônquica sem sinais diretos (inflamação, febre etc.) ou indiretos (resposta anticorpo específico) de infecção ou de dano tecidual. • Colonização crônica pulmonar: Presença de Pa na árvore brônquica por pelo menos 6 meses, baseado nas 3 últimas culturas positivas com intervalo mínimo mensal entre elas, sem sinais diretos ou indiretos de infecção ou de dano tecidual. • Infecção pulmonar: Presença de Pa na árvore brônquica com sinais diretos ou indiretos de infecção ou de dano tecidual. OU anticorpos presentes em, no mínimo, dois exames. • Infecção pulmonar crônica: Presença de Pa na árvore brônquica por pelo menos 6 meses, baseado nas 3 últimas culturas positivas com intervalo mínimo mensal entre elas, com sinais diretos ou indiretos de infecção ou de dano tecidual. OU anticorpos positivos em, no mínimo, dois exames.
Leeds (23)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção Crônica: quando mais de 50% dos meses tem culturas positivas para Pa, num período de 12 meses. • Infecção Intermitente: quando menos de 50% dos meses tem culturas positivas para Pa, num período de 12 meses. • Livre de infecção: nenhum crescimento de Pa por 12 meses consecutivos, tendo havido uma cultura positiva previamente. • Nunca: nunca houve cultura positiva para Pa.

FONTE: adaptado de Schelstraete, 2013.

3.2 Diagnóstico da colonização das vias aéreas

O diagnóstico precoce da colonização por Pa nos pacientes com FC representa um desafio nas crianças de baixa idade, uma vez que estas não expectoram. Consequentemente, outros métodos como aspirado nasofaríngeo, *swab* orofaríngeo, escarro induzido, lavado bronco-alveolar e testes sorológicos têm seu papel no diagnóstico microbiológico (Tabela 3) (18).

A cultura de escarro é o método menos invasivo e mais utilizado em crianças maiores e adultos, e sua coleta pode ser espontânea ou por indução com inalação hipertônica. Culturas de orofaringe são largamente utilizadas como substituto à cultura de escarro em pacientes não expectorantes e crianças menores, mas têm sensibilidade pobre e valor preditivo positivo baixo para colonização por Pa em via aérea inferior (VAI). Além disso, isolamentos em orofaringe podem apresentar genótipos diferentes da Pa em um mesmo paciente, podendo representar a colonização das vias aéreas superiores. O lavado bronco-alveolar (LBA) é um método subótimo para avaliar a colonização por Pa na VAI pois é um método invasivo e passível de resultados falso negativos devido à heterogeneidade das lesões pulmonares (27).

Tabela 3: Recomendações internacionais para realização de cultura de via aérea em pacientes com FC de baixa idade (27)

	Estados Unidos	Reino Unido	Dinamarca	Europa
Frequência de cultura	Trimestral	Toda visita clínica (mínimo mensal após 1º Pa)	Mensal	Toda visita clínica (mínimo trimestral)
Local de coleta em pacientes não expectorantes	Swab orofaríngeo	Swab garganta profunda pós- tosse	Sucção hipofaríngea ou endolaríngea	Sucção hipofaríngea ou endolaríngea
Avaliação de Ac anti-Pa	Não avalia rotineiramente	No momento da 1ª Pa e anualmente	Anualmente	Periódico

FONTE: Adaptado de Rosenfeld, 2003

Ac: anticorpo; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

Testes sorológicos de pacientes com FC portadores de Pa crônica demonstraram a presença de anticorpos humorais específicos para as enzimas extracelulares protease alcalina, elastase e exotoxina A, e a outros antígenos, incluindo alginato, produzido pelo patógeno. Em quase todos os pacientes cronicamente infectados, a resposta imune aos antígenos da Pa aumenta por anos. Os títulos de anticorpos atingem um patamar e raramente diminuem depois disso, sugerindo que a produção dos antígenos bacterianos e, portanto, a estimulação do sistema imunológico humoral é contínua (38).

No futuro, testes sorológicos poderão servir como um marcador não invasivo de colonização por Pa, pois anticorpos contra a exotoxina A e proteínas de membrana da célula são detectados antes de a infecção ser evidenciada pela

cultura. Entretanto, existem limitações como a restrição de testes para comercialização e a não especificidade do local da colonização (por exemplo, colonização das vias aéreas superiores). Além disso, a sorologia pode permanecer positiva mesmo após clareamento espontâneo da Pa ou após terapia de erradicação de colonização prévia (27).

Baseado nas evidências apontadas, a rotina do nosso serviço preconiza como método diagnóstico microbiológico rotineiro a coleta de cultura de via aérea, sendo de orofaringe nas crianças de baixa idade ou que não expectoram, e de escarro nas crianças maiores e capazes de expectorar. As culturas são realizadas no mínimo a cada 3 meses e a sorologia anti-Pa não é realizada.

3.3 Impacto clínico da colonização por *Pseudomonas aeruginosa*

Colonização crônica por Pa está associada a desfechos clínicos piores, como perda de função pulmonar, maior dano estrutural na via aérea, estado nutricional ruim (1, 24), além de aumento na morbimortalidade. A colonização por Pa mucoide está relacionada a desfechos clínicos ainda piores (24). Pacientes com FC que adquirem Pa têm 2,6 vezes mais risco de morte e maior risco de morte precoce (26). Nos pacientes em que a Pa se instalou nos primeiros 5 anos de vida o risco de morte durante 8 anos de seguimento foi 2,6 vezes maior do que naqueles em que não houve isolamento da Pa nos primeiros 5 anos de vida (27).

Espirometria é utilizada para avaliar a gravidade da doença, sendo um importante parâmetro utilizado em muitos estudos (27). Lee et al., em uma análise prospectiva com 232 pacientes FC, mostraram que o VEF1 foi significativamente

associado à classificação da infecção por Pa ($p < 0,0043$); pacientes com colonização por Pa crônica e intermitente apresentavam VEF1 muito menor comparado aos livres de Pa e os nunca infectados (23). Li et al., num estudo randomizado de 16 anos, envolvendo 56 neonatos com FC, mostraram que a função pulmonar dos pacientes com Pa não-mucoide teve declínio gradual na relação VEF1/CVF ($p=0,03$) em relação aos pacientes sem Pa, e que os pacientes com Pa mucoide tiveram declínio abrupto da porcentagem do VEF1 ($p=0,02$) e CVF ($p=0,007$) e declínio gradual na porcentagem do predito do VEF1/CVF ($p=0,03$) e FEF25-75% ($p < 0,001$) (26). Rosenfeld et al. relataram que pacientes com aquisição precoce de Pa tiveram uma média de 14% de redução do VEF1 nos 8 anos de seguimento (27).

Em relação ao impacto da Pa na inflamação pulmonar dos pacientes com FC, acredita-se que tal bactéria desencadeie mais obstrução e inflamação do que os outros patógenos relacionados à FC. Na presença da colonização por Pa aumentam-se o influxo de neutrófilos, as proteinases liberadas e o volume de escarro, com importante grau de obstrução da via aérea e destruição pulmonar (18). Douglas et al., num estudo envolvendo 116 crianças menores de 6 anos, submetidas a LBA ao diagnóstico neonatal de FC e repetido anualmente, mostraram que as crianças infectadas por Pa têm atividade inflamatória maior que as não infectadas por Pa, com níveis de IL-6 e IL-1B elevados em 31% dos pacientes não infectados e em 52% dos pacientes infectados por Pa. O estudo mostrou também que houve aumento significativo nos neutrófilos, elastase neutrofílica livre e interleucina-8 (28).

4 ERRADICAÇÃO DA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4 Erradicação da *Pseudomonas aeruginosa*

A Pa presente na colonização inicial geralmente tem fenótipo não-mucoide, e na maioria são susceptíveis aos antibióticos, com baixa produção de muco e pouca formação de rolhas. O tratamento precoce da Pa possibilita a erradicação dessa bactéria, dificultando a sua persistência na via aérea, podendo assim preservar a função pulmonar (18). Diante do impacto negativo da colonização por Pa nos pacientes com FC, o objetivo do diagnóstico precoce é iniciar antibioticoterapia específica com a finalidade de influenciar positivamente nos desfechos clínicos (18).

4.1 Impacto clínico da erradicação da *Pseudomonas aeruginosa*

A colonização crônica por Pa está associada a desfechos clínicos negativos (1) e a grande morbimortalidade dos pacientes com FC (27). Da mesma maneira, a antibioticoterapia anti-pseudomonas tem efeito positivo na condição clínica, na função pulmonar, na diminuição da densidade de colônias no escarro, nos marcadores inflamatórios, na qualidade de vida, no estado nutricional e na sobrevida dos pacientes com FC (18).

O tratamento específico de erradicação da Pa tem a finalidade de melhorar o prognóstico da doença (18). Entretanto, o efeito da terapia de erradicação de Pa na progressão da doença a longo prazo se mantém incerta. Alguns estudos sugerem que aproximadamente um terço das crianças com FC e primeira aquisição de Pa não conseguirão atingir uma erradicação sustentada de Pa, a qual foi definida como

a manutenção de culturas trimestrais negativas para Pa por 12 meses após o tratamento ant-Pa (39).

4.2 Protocolos de erradicação

Durante as últimas décadas, uma variedade de regimes de tratamentos antibióticos anti-Pa têm sido preconizados com impacto positivo no prognóstico da doença (Tabela 5) (18, 40). Antibioticoterapia precoce na colonização inicial por Pa, independente da presença de sintomas, é atualmente considerado tratamento padrão para erradicar o patógeno e postergar a instalação da colonização crônica (39-41).

O primeiro relato sobre a tentativa de prevenir o progresso da colonização da Pa em pacientes FC foi publicado como uma carta ao editor em 1985. O termo erradicação ainda não havia sido usado, mas os autores perceberam que ao tratar 7 pacientes FC no primeiro aparecimento de Pa com colistimetato inalatório (IN) foi possível diminuir o isolamento da bactéria nas culturas de via aérea seguintes à intervenção (42).

Alguns anos depois, em 1991, Valerius et al. realizaram um estudo randomizado de 27 meses, envolvendo 26 pacientes com FC que nunca haviam recebido terapia anti-Pa. Um dos braços do estudo recebeu colistimetato IN associado a ciprofloxacino via oral (VO) por 3 semanas e o outro braço não foi tratado. Os autores observaram que a infecção crônica por Pa foi significativamente menor no grupo tratado (2 [14%] vs. 7 [58%]; $p < 0.05$) e que houve

significativamente menos isolamento de Pa nas culturas de escarro de rotina no grupo tratamento (49/214 [23%] vs. 64/158 [41%], $p = 0,0006$) (43).

Os antibióticos historicamente mais utilizados na terapia de erradicação da Pa são o colistimetato de sódio IN (colistina ou polimixina E) associado a cloridrato de ciprofloxacino VO. Isso se deve ao fato de que a referida associação constituiu o primeiro regime de tratamento de erradicação proposto (44), e de que o colistimetato IN é eficaz na redução da densidade de Pa com raro desenvolvimento de resistência (30). Nos últimos anos, outras terapias de erradicação de Pa foram avaliadas e diversos tratamentos são utilizados atualmente (44). Diferentes protocolos são propostos (45), mas todos empregam antibiótico inalado, associado ou não ao antibiótico sistêmico, com variadas durações de tratamento (Tabela 5) (46).

Vazquez et al., num estudo prospectivo, intervencionista, braço único, controle histórico, envolvendo 8 pacientes FC, nunca infectados por Pa e com precipitinas normais por 9 meses anteriores ao estudo, submeteram os pacientes a um curso de 2 semanas de ciprofloxacino VO + colistimetato IN (10^6 UI) associado a tobramicina (100 mg), ambos 2 vezes ao dia. Como resultado, os autores viram que após o tratamento somente 4 das 87 culturas (4,6%) dos pacientes com FC foram positivas para Pa no grupo tratamento contra 109 das 120 culturas (86%) no grupo controle ($p < 0,001$). Esse estudo foi encorajador para que fosse estudado o tratamento precoce da Pa com ciprofloxacino VO associado ao antibiótico IN (47).

Frederiksen et al., no centro de FC da Dinamarca, realizaram um estudo prospectivo, braço único, com duração de 44 meses, com o objetivo primário de

comparar pacientes tratados de acordo com uma terapia de erradicação intensa a um controle histórico de pacientes nunca tratados. Os investigadores submeteram 48 pacientes com FC na primeira colonização por Pa a um protocolo de erradicação de três fases (Tabela 4). A fase I era administrada apenas uma vez, a fase II poderia ser administrada mais de uma vez se a duração entre as culturas positivas fosse maior que a definição da fase III. Se a cultura para Pa fosse positiva precocemente após a fase III, então o paciente passava a ser definido como cronicamente infectado para Pa. Como resultado, os autores observaram que 16% dos pacientes tratados desenvolveram Pa crônica após 3,5 anos comparado a 72% dos pacientes controle ($p < 0,005$); a eficácia do tratamento foi calculada em 78%. O estudo mostrou que a porcentagem de culturas positivas para Pa até a infecção crônica, ao final do estudo, foi 13,7% no grupo tratamento e 24,4% no grupo controle ($p < 0,00001$); e no grupo tratamento 77% dos pacientes continuaram com precipitinas normais ao final do estudo comparado com 22% do grupo controle ($p < 0,02$). A CVF e o VEF1 foram significativamente maiores nos pacientes tratados comparado aos controles. Diante desses resultados, os autores sugeriram que, apesar do desenvolvimento da Pa crônica, o tratamento ativo diminui a deterioração da função pulmonar relacionada à infecção por Pa crônica, e que os três meses de antibioticoterapia mostraram-se mais efetivos que as três semanas. (33).

Tabela 4: Protocolo dinamarquês de erradicação da Pa (33)

Fase da erradicação	Tratamento aplicado
Fase 1: primeiro isolamento de Pa	colistimetato IN 1.000.000 IU 2 x dia + ciprofloxacino VO 25-50 mg/kg/dia 2 x dia, por 3 semanas
Fase 2: segundo isolamento de Pa	colistimetato IN 2.000.000 IU 3 x dia + ciprofloxacino VO 25-50 mg/kg/dia 2 x dia, por 3 semanas
Fase 3: terceiro isolamento de Pa	colistimetato IN 2.000.000 IU 3 x dia + ciprofloxacino VO 25-50 mg/kg/dia 2 x dia, por 3 meses

FONTE: Adaptado de Frederiksen, 1997

IN: inalatório; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; VO: via oral;

Na busca por encontrar o regime ideal de terapia de erradicação da Pa, Treggiari et al. participaram de um robusto programa nomeado EPIC, que tinha como objetivo avaliar fatores de risco e desfechos associados a aquisição precoce de Pa, e os benefícios e os riscos de 4 regimes de tratamento anti-Pa. O programa EPIC constituiu-se de 2 estudos, sendo um intervencionista, randomizado, multicêntrico, com pacientes FC pediátricos no primeiro isolamento de Pa chamado de EPIC-CT, e o outro uma coorte longitudinal envolvendo pacientes FC pediátricos negativos para Pa denominado EPIC-OBS (1).

O estudo EPIC-OBS foi uma coorte prospectiva observacional, com duração de 5 anos, envolvendo 1.787 pacientes pediátricos (menores de 12 anos) de 59 centros de FC, os quais nunca tiveram Pa ou estavam livres de Pa no mínimo há 2 anos. Teve como objetivo principal a identificação de fatores de risco associados à idade precoce da primeira aquisição da Pa, à emergência precoce da Pa mucoide e à resistência aos antibióticos das cepas de Pa. Nos pacientes também envolvidos no EPIC-CT, o EPIC-OBS forneceu dados pré-estudo, permitindo examinar a

associação entre fatores de risco pré-estudo, principalmente sorologia para Pa e fenótipo da Pa (mucoide contra não-mucoide) e a resposta aos diferentes esquemas terapêuticos (1).

O estudo EPIC-CT foi um estudo multicêntrico, randomizado, com duração de 18 meses, envolvendo 306 pacientes pediátricos (1 a 12 anos), os quais tiveram seu primeiro isolamento de Pa na cultura de escarro. Teve como objetivo principal investigar se uma estratégia trimestral anti-Pa (terapia cíclica) reduz as exacerbações pulmonares e o isolamento de Pa das culturas de escarro comparado a uma estratégia anti-Pa baseada no aparecimento da Pa em culturas de escarro trimestrais. O desfecho clínico foi o tempo para ocorrer a primeira exacerbação pulmonar requerendo antibioticoterapia endovenosa (EV) ou hospitalização durante os 18 meses do estudo, e o desfecho microbiológico foi a proporção de culturas positivas para Pa entre as culturas trimestrais obtidas após a randomização. Ao ser incluído no EPIC-CT, o paciente recebia o primeiro ciclo de tratamento anti-Pa com 28 dias de tobramicina IN (300 mg/dose, 2 x dia, por 28 dias) associada a ciprofloxacino VO (30-40 mg/kg/dia, 2 x dia, por 14 dias) ou placebo. Se após 3 semanas desse ciclo inicial de tratamento, a cultura permanecesse positiva, o paciente podia receber um curso adicional de 28 dias de tobramicina IN. Os pacientes foram randomizados para os grupos de tratamento cíclico (n=153) ou para os grupos de tratamento baseado em cultura (n=153) (1).

Em 2011, os resultados do estudo EPIC-CT foram publicados. Em cada um dos 4 braços de tratamento foram incluídos 76 pacientes, todos com características clínicas muito similares à entrada. Concluiu-se que não houve diferença

estatisticamente significativa na diminuição de exacerbação com necessidade de antibioticoterapia EV ou hospitalização entre os pacientes dos dois grupos assim como no grupo ciprofloxacino contra o grupo placebo. Da mesma maneira, não houve diferença significativa na proporção de culturas positivas para Pa entre o grupo tratamento cíclico e o baseado em cultura. O estudo mostrou também que a emergência de cepas mucoides foi de 5,7% no grupo tratamento cíclico, de 4,2% no grupo baseado em cultura, de 4,2% no grupo ciprofloxacino e 3,6% no grupo placebo. Aproximadamente 70 pacientes em cada grupo foram capazes de realizar espirometria, não havendo diferença estatisticamente significativa no VEF1 entre os quatro grupos. Os autores concluíram que o tratamento cíclico não proveu mais benefícios ao paciente do que o baseado em cultura, além de que a adição de ciprofloxacino VO não conferiu proteção adicional em relação à exacerbação, erradicação microbiológica e outros desfechos clínicos (48).

Corroborando com esses achados, Proesmans et al. avaliaram durante 6 anos 58 pacientes submetidos à erradicação de Pa, sendo um grupo tratado com terapia combinada de ciprofloxacino VO + colistimetato sódico inalatório (CIS) por 3 meses, e o outro com monoterapia de tobramicina inalatória em solução (TIS) por 28 dias. Os autores obtiveram como resultado de eficácia um sucesso de erradicação similar entre os dois grupos (79,3% TIS vs. 89,7% CIS, RR 0,88, CI: 95% 0,71-1,11), além de o tempo livre de Pa ter sido de 9 meses no grupo CIS (95% CI 0,0 – 19) e de 5 meses no grupo TIS (95% CI 1,7 – 8,3) (44).

Tabela 5: Resumo de diferentes protocolos de erradicação da Pa estudados

Estudo	Critério(s) Inclusão	Tratamento de erradicação	Variável desfecho	Resultados principais
Littlewood, 1985 (42) Coorte N: 7	Pa recente na cultura	CIS 0,5x10 ⁶ UI/bid longo prazo	Cultura positiva Pa pré e pós tratamento	Pré: 25/29 (42%) Pós: 8/130 (6%)
Valerius, 1991 (43) RCT N:26	Cultura positiva Pa (não crônico e sem tratamento anti-Pa anterior)	GT: cipro VO 25–50mg/kg/d/3s + CIS 10 ⁶ U/bid/3s GC: nenhum tratamento	Cultura positiva Pa Desenvolvimento Pa crônica	GT: 49/214 (23%) GC:64/158 (41%) (p=0,0006) GT: 2/14 (14%) GC: 7/12 (58%) (p<0,05)
Frederiksen, 1997 (33) Coorte GT: 48 GC: 43	Cultura positiva Pa (primeira ou intermitente)	1ª Pa: cipro VO 25–50mg/kg/d/3s + CIS 10 ⁶ U/bid/3s 2ª Pa: cipro VO 25–50mg/kg/3s+ CIS 2x10 ⁶ U/tid/3s 3ª Pa: cipro VO 25–50mg/kg/3s+ CIS IN 2x10 ⁶ U/tid/3m	Desenvolver Pa crônica	GT: 7/48 (15%) GC: 19/43(44%) Kaplan–Meier: GT:16% GC: 72% após 3,5 anos (p<0,005) Taxa de sucesso: 78%
Ratjen, 2001 (49) Coorte N: 15	Primeira cultura Pa na vida	TIS 80mg/bid/12m	Culturas Pa e títulos de Ac anti-Pa	14/15 livres de Pa aos 12m
Tacetti, 2005 (25) Coorte N: 58	Primeira cultura Pa na vida	Fase 1: cipro VO 30mg/kg/d + CIS 10 ⁶ UI/bid (< 6a) e 2x10 ⁶ UI/bid (> 6a) por 3s Fase 2:se persistência Pa após fase 1 (todas as idades): Cipro VO 30mg/kg/d/ + CIS 2x10 ⁶ UI/bid por 3m	3 culturas consecutivas negativas e Ac negativos por 6 meses	Taxa de sucesso 81%
Schelstrate, 2010 (50) Coorte N: 41	Primeira cultura Pa na vida	Cipro VO 15mg/Kg/d + CIS 2x10 ⁶ UI/bid/3s ou TIS 80mg/kd/d por 3m Repete tratamento na 1ª falha	Cultura positiva Pa	Taxa de sucesso: 83%

continua

Continuação Tabela 5: Resumo de diferentes protocolos de erradicação da Pa Estudados

Estudo	Critério(s)		Variável desfecho	Resultados principais
	Inclusão	Tratamento de erradicação		
Ratjen, 2010 (51) (ELITE trial) RCT N: 65	Cultura Pa positiva (primeira da vida OU nova Pa depois de 4 culturas negativas em 1 ano)	GT1: TIS IN: 300mg/bid/28d GT2: TIS IN: 300mg/bid/56d	Tempo (mediana) para recorrência de Pa Proporção de pacientes livres de Pa 1m após tratamento	GT1: 26.12m GT2: 25.82m (sem diferença estatística) Taxa de sucesso: GT1: 93% GT2: 92% (sem diferença estatística)
Treggiari, 2011 (48) (EPIC Trial) RCT N: 304	Cultura Pa positiva (primeira da vida ou > 2 anos sem Pa)	Cíclica independente cultura OU baseada em cultura: TIS 300mg/bid/28d + cipro VO 15-20mg/kg/bid/14d vs TIS 300mg/bid/28d + placebo VO 14d	Tempo para exacerbação pulmonar exigindo ATB EV e proporção de culturas Pa-positivas.	Sem diferença estatística entre ciclada e baseado em cultura: Exacerbação: OR 0,95, IC95% 0,54-1,66 Cultura positiva Pa: (OR 0,78, IC95% 0,49-1,23) OU entre cipro e placebo Exacerbação: OR 1,45, IC95% 0,49-1,23 Cultura positiva Pa: OR 1,10, IC95% 0,71-1,71.
Tacetti, 2012 (52) RCT GT1: 105 GT2: 118	Cultura Pa positiva (primeira da vida ou após 6m com 3 culturas Pa negativas)	GT1: cipro VO 30mg/kg/d/28d + CIS 2x10 ⁶ UI/bid/28d GT2: cipro VO 30mg/kg/d/28d + TIS 300mg/bid/28d	3 culturas consecutivas negativas em 6m	Taxa de sucesso: GT1: 62,8% GT2: 65,2% (sem diferença estatística)
Proesmans, 2013 (44) RCT GT1: 29 GT2: 29	Cultura Pa positiva (primeira da vida ou após 6m com 3 culturas Pa negativas)	GT1: cipro VO 30mg/kg/d/28d + CIS 2x10 ⁶ UI/bid por 3m GT2: TIS 300mg/bid por 28 dias	Cultura Pa logo após tratamento	Taxa de sucesso: GT1:79,3% GT2:89,7% (sem diferença estatística)

continua

Conclusão da Tabela 5: Resumo de diferentes protocolos de erradicação da Pa Estudados

Estudo	Critério(s)		Variável desfecho	Resultados principais
	Inclusão	Tratamento de erradicação		
Blanchard, 2017 (53) Coorte N: 128	Nova Pa na cultura	Fase 1: TIS 300mg/bid/28d Fase 2: Se Pa após fase 1: TIS 300mg/bid/28d Fase 3: se Pa após fase 2: TIS 300mg/bid/28d + ATB EV (ceftazidima e tobramicina)	Cultura Pa logo após tratamento	Taxa sucesso acumulado: 87,1%

ATB: antibiótico; bid: duas vezes ao dia; Cipro: ciprofloxacino; CIS: colistimetato inalatório em solução; d: dias; EV: endovenoso; IN: inalatório; GT: grupo tratamento; GC: grupo controle; m: meses; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; RCT: estudo randomizado controlado; s: semanas; tid: três vezes ao dia; TIS: tobramicina inalatória em solução; UI: unidades internacionais; v.a.: via aérea; VO: via oral;

Desde 2004, baseado no protocolo da Dinamarca, o centro de FC do ICr HC FMUSP adotou um tratamento de erradicação da Pa com três fases, guiado pelo resultado das culturas de secreção de via aérea coletadas rotineiramente pelos pacientes (Figura 9).

4.3 Avaliação de Sucesso

Uma das maiores dificuldades em avaliar a efetividade da terapia de erradicação é obter uma prova real de que houve a erradicação da Pa nos pulmões. Alguns desfechos como negatificação ou queda de títulos de anticorpo, genotipagem de Pa e a negatificação da cultura de via aérea são os mais utilizados para evidenciar que a erradicação foi alcançada (Tabela 5) (18).

Taccetti et al. num estudo com objetivo de estudar o período de reaparecimento da Pa na cultura após a erradicação e diferenciar entre reaparecimento da mesma cepa e recolonização por outra cepa, analisaram 173 pacientes com FC de um centro de Florença (Itália), por 9 anos. Os resultados mostraram que 51% desses pacientes foram recolonizados pelos mesmos patógenos, mas 73% das culturas mostraram diferentes genótipos de Pa. O tempo médio entre dois isolamentos de Pa foi de 18 (4–80) meses. O declínio da função pulmonar foi significativamente menor nos pacientes tratados ($p < 0,05$), as cepas dos pacientes tratados foram mais sensíveis aos antibióticos ($p < 0,005$), e não houve diferença estatística para emergência de outros patógenos (bactérias e fungos) (25).

Li et al., num estudo randomizado de 16 anos, 56 neonatos com FC diagnosticados por triagem neonatal foram acompanhados utilizando-se testes sorológicos para avaliar o impacto da antibioticoterapia anti-Pa precoce. Os autores observaram que a terapia de erradicação levou a um menor risco e maior tempo de transição para Pa mucoide comparado com aos pacientes não tratados ($p=0,001$). Além disso, entre os pacientes com Pa mucoide observou-se aumento dos títulos de anticorpos contra exotoxina A, lisado celular e elastase em comparação aos pacientes com Pa não-mucoide (26).

Anstead et al., numa subanálise do estudo EPIC-CT, demonstraram a relação entre cultura e dados sorológicos em indivíduos com infecção por Pa. O objetivo foi entender se a sorologia basal para Pa poderia prever falha no tratamento, tempo de exacerbação pulmonar e risco de reaparecimento da Pa pós-

erradicação. Os autores mostraram que a elevação de anticorpos contra 2 antígenos, exotoxina A e protease alcalina, antes do tratamento de erradicação associou-se a um alto índice de novo isolamento durante o período de 60 semanas de seguimento. Entretanto, a sorologia não foi preditiva de exacerbação pulmonar durante esse período e houve apenas concordância moderada entre a sorologia e a cultura coletada ao mesmo tempo. O estudo sugeriu ser impossível determinar se a sorologia caracteriza infecção residual por Pa, precursora da infecção, ou se a discordância é resultado da limitação da cultura de orofaringe. Os resultados mostraram que a infecção por Pa nem sempre leva a uma resposta sorológica e muitas vezes a sorologia mantém-se elevada quando a cultura está negativa (54).

Hansen et al. em estudo retrospectivo, avaliaram 15 anos de experiência no tratamento da colonização intermitente por Pa em 146 pacientes com FC, utilizando como avaliação de sucesso da erradicação a mediana de tempo de recorrência da Pa. A terapia com colistimetato IN e ciprofloxacino VO foi avaliada, resultando em uma mediana de tempo de recorrência de Pa de 1,9 meses (0 - 58,3 meses) no grupo não tratado, de 5 meses (0,2 - 112,8 meses) no grupo tratado por 3 semanas e de 10,4 meses (0 - 98,2 meses) no grupo tratado por 3 meses, sem diferença entre 3 semanas e 3 meses de tratamento (46).

Gibson et al. em estudo prospectivo envolvendo 75 crianças com FC submetidas a terapia de erradicação com tobramicina IN por 28 ou 56 dias, utilizou a cultura proveniente do lavado bronco-alveolar (LBA) no início e logo após o tratamento para avaliar a sua efetividade. Como resultado, 75% dos pacientes tratados tinham cultura do LBA negativa até 3 meses após a intervenção (55).

Proesmans et al., num estudo comparando a efetividade da erradicação da Pa entre dois regimes diferentes, usaram como desfecho primário a cultura de via aérea coletada ao final de cada tratamento. Os autores alcançaram taxas de sucesso de 79,3% no grupo tratado com tobramicina IN isolada e de 79,3% no grupo tratado como colistimetato IN associado a ciprofloxacino VO, sem diferença estatística entre eles (44).

Stanojevic et al também utilizaram a primeira cultura após a intervenção anti-Pa para avaliar a efetividade do tratamento com tobramicina IN 80mg/dose 2 vezes ao dia por 365 dias contra 300mg/dose 2 vezes ao dia por 28 dias. Os autores encontraram uma taxa de falha da erradicação similar entre os grupos, com 11% de culturas positivas para Pa ao final de cada terapia (56). Recentemente, o centro de FC de Toronto, no Canadá, avaliou a efetividade de um protocolo de erradicação em fases. Como desfecho primário os autores utilizaram a primeira cultura de via aérea realizada após cada fase de tratamento, resultando numa taxa de sucesso acumulada de 89% (53).

Em resumo, o resultado das culturas de via aérea após o tratamento é um desfecho bastante utilizado na avaliação da efetividade da erradicação da Pa, mas a definição de sucesso difere muito na literatura (40). Muitos estudos avaliam a efetividade pelo resultado da primeira cultura de via aérea coletada logo após o término da erradicação (44, 51, 55, 56), mas pode-se encontrar os que consideram as culturas coletadas após 6 meses (52) a 12 meses (17, 57). Vale ressaltar que os trabalhos que avaliam a ausência de Pa por um período de 12 meses classificam esses casos como erradicação a longo prazo ou sustentada (39, 58).

5 HIPÓTESE

5 Hipótese

O protocolo sistematizado da erradicação do primeiro aparecimento de *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com FC adotado em nosso centro de referência por 8,5 anos foi efetivo.

6 OBJETIVOS E DESFECHOS RELACIONADOS

6 Objetivos e Desfechos relacionados

6.1 Objetivo Primário

Descrever a efetividade do protocolo de erradicação sistematizado da colonização inicial da Pa em pacientes pediátricos com fibrose cística adotado no centro de referência em FC do ICr do HC FMUSP no período de junho de 2004 a dezembro de 2012.

6.2 Objetivos Secundários

- Descrever o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes na colonização inicial da Pa (idade, gênero, estado nutricional, escore de Shwachman-Kulczychi, mutação no gene CFTR).

6.3 Desfechos e variáveis

- A efetividade do protocolo foi avaliada através dos seguintes desfechos: 1) foi considerado sucesso da erradicação o não aparecimento de Pa na primeira cultura de via aérea subsequente à fase da erradicação; 2) foi considerado falha da erradicação o aparecimento de Pa na primeira cultura de via aérea subsequente à fase da erradicação.

- Colonização inicial foi definida como o primeiro aparecimento de Pa na vida, identificada pela cultura de via aérea (escarro, orofaringe ou LBA).
- Peso e altura foram medidos durante as consultas médicas.
- O Índice de massa corpórea (IMC) foi obtido através dos dados pômbero-estaturais descritos em prontuário e o escore Z foi calculado utilizando o software WHO Anthro para crianças de até 5 anos de idade e o WHO AnthroPlus (<http://www.who.int/childgrowth/software>) para crianças a partir de 5 anos de idade.
- O escore de Shwachman-Kulczychi (E-SK) foi realizado anualmente de forma rotineira nas consultas para avaliar a gravidade da FC.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7 Materiais e métodos

7.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de vida real, coorte retrospectiva com eixo de análise prospectivo. Os dados foram coletados através da análise dos prontuários dos pacientes acompanhados no ambulatório de fibrose cística do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, no período de junho de 2004 a dezembro de 2012.

7.2 População do estudo

7.2.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes menores de 18 anos de idade.
- Pacientes com diagnóstico confirmado de FC, segundo os critérios internacionais (59).
- Pacientes acompanhados no serviço de pneumologia pediátrica do ICr do HC FMUSP, no período de junho de 2004 a dezembro de 2012.
- Pacientes que realizaram um mínimo de 4 culturas de via aérea num período de 12 meses.
- Pacientes que nunca tiveram Pa e a primeira colonização ocorreu dentro do período do estudo.

- Pacientes que foram submetidos ao protocolo sistematizado de erradicação de Pa descrito no estudo (Figura 9) no período de junho de 2004 a dezembro de 2012.

7.2.2 Critérios de exclusão:

- Pacientes que iniciaram qualquer tipo de tratamento de erradicação em data anterior ao início do estudo.
- Pacientes que foram submetidos a outros esquemas terapêuticos de erradicação diferente do protocolo descrito no estudo.
- Pacientes que declararam ter interrompido precocemente o antibiótico inalatório preconizado pelo protocolo do estudo.

7.3 Protocolo de erradicação da Pa

O protocolo de erradicação avaliado nesse estudo está esquematizado na Figura 9. Os pacientes que apresentaram colonização inicial por Pa eram elegíveis ao protocolo de erradicação. Na fase 1 os pacientes recebiam ciprofloxacino VO (25-50mg/kg/dia) de 12/12 horas por 3 semanas associado a colistimetato IN (10^6 UI) de 12/12 horas por 6 semanas. Uma cultura pós-tratamento de erradicação era realizada e caso houvesse crescimento de Pa então o paciente era submetido à fase seguinte. Na fase 2 os pacientes recebiam ciprofloxacino VO (25-50mg/kg/dia) de 12/12 horas por 3 semanas associado a colistimetato IN (10^6 UI) de 12/12 horas por 3 meses. Nova cultura era realizada após a fase 2 e se houvesse aparecimento

de Pa a próxima fase era iniciada. Na fase 3 os pacientes recebiam ciprofloxacino VO (25-50mg/kg/dia) de 12/12 horas por 6 semanas associado a colistimetato IN (10^6 UI) de 12/12 horas por 6 meses. Terminada a fase 3, os pacientes eram submetidos a nova cultura de via aérea, e estando essa negativa para Pa considerava-se sucesso, caso contrário, determinava-se a falha da erradicação.

Nos casos em que os pacientes estivessem com exacerbação pulmonar da FC no momento da erradicação, e com necessidade de internação, substituíam-se o antibiótico oral por endovenoso até o momento da alta hospitalar. Caso o paciente ainda precisasse completar o antibiótico sistêmico determinado pela fase de erradicação, ele recebia prescrição de ciprofloxacino VO domiciliar. O tratamento com o antibiótico IN não sofria alterações em casos de internação hospitalar.

Figura 9: Protocolo de erradicação da Pa em fases utilizado no centro de referência de FC do ICr HC FMUSP – 2004 a 2012

Culturas de trato respiratório foram feitas após cada fase e seu resultado indicava a próxima etapa. Posologia utilizada: ciprofloxacino oral (25-50mg/kg/dia até 1500mg/dia) 12/12 horas; colistimetato IN (10⁶UI) 12/12 horas. Nos pacientes exacerbados com necessidade de hospitalização no momento da erradicação, iniciava-se o antibiótico sistêmico por via endovenosa (ceftazidima 150mg/kg/dia, 8/8 horas até 9 gr/dia associado a amicacina 20mg/kg/dia, 24/24 horas), sem mudança no esquema do antibiótico inalatório.

IN: inalatório; UI: unidades internacionais; VO: via oral

Os pacientes com fibrose cística em seguimento no ambulatório do ICr HC FMUSP têm acesso gratuito às medicações necessárias ao seu tratamento assegurado pela Secretaria do Estado da Saúde e Ministério da Saúde. Ao receber a prescrição médica, o paciente dirige-se à farmácia do HC para retirada das medicações. Os antibióticos inalatórios devem ser ministrados em nebulizadores a jato de ar que são os adequados a esse fim.

7.4 Monitoramento microbiológico das vias aéreas

Os pacientes realizavam rotineiramente culturas de via aérea (escarro, orofaringe ou LBA), no mínimo, a cada 3 meses, o que nos permitiu avaliar o reaparecimento ou não da Pa. Todas as culturas foram processadas no laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

8 Amostra e análise estatística

8.1 Justificativa da Amostra

A amostra foi construída através da avaliação do prontuário de todos os pacientes pediátricos com fibrose cística que preenchiam os critérios de inclusão.

Optou-se por uma amostra descritiva, pois o objetivo do estudo é avaliar o protocolo específico utilizado em nosso serviço, não sendo realizado cálculo amostral.

8.2 Análise Estatística

A variável desfecho é a taxa de sucesso da erradicação, cujo cálculo será por fases e cumulativo. A taxa de sucesso é o número de culturas negativas dividida pelo número de pessoas que receberam a fase de tratamento, em análise descritiva.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Medcalc (MedCalc® Software bvba).

A análise descritiva dos dados foi realizada através da tabulação de medidas de tendência central (média para distribuições normais e mediana para distribuições não normais), medidas de dispersão (IQR e IC 95%) e proporções.

9 Resultados

9.1 População do Estudo

Foram avaliados 167 prontuários de pacientes pediátricos com fibrose cística, que estiveram em seguimento no período de junho de 2004 a dezembro de 2012. Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, finalizamos a amostra do estudo em 29 pacientes (Figura 10). O estudo foi aprovado pela comissão de pesquisa e ética do Hospital das Clínicas da FMUSP (Parecer CPE nº 1175/24/2014).

Figura 10: Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo

9.2 Características clínicas e demográficas dos pacientes

As características clínico-epidemiológicas dos pacientes no início de cada fase de erradicação podem ser encontradas na Tabela 6. Destaca-se que na primeira colonização por Pa a mediana de idade dos pacientes era baixa (Figura 11) e a maioria deles era do gênero masculino (59,6%).

Figura 11: Distribuição da idade dos pacientes incluídos no estudo na colonização inicial por Pa

Tabela 6: Características clínico-epidemiológicas dos pacientes no início de cada fase do protocolo de erradicação da Pa

Parâmetros	Fase 1 (n = 29)	Fase 2 (n = 12)	Fase 3 (n = 6)
Mulheres, n (%)	41,4%	66,7%	66,7%
Idade, mediana em anos (IQR)	2,7 (0,9 a 5,3)	3,6 (1,9 a 5,8)	3,8 (2,6 a 4,5)
IMC (escore Z), mediana (IQR)	- 0,4 (-1 a 0,7)	- 0,4 (-0,8 a 0,9)	- 1,2 (-1,6 a 1,1)
Genótipo, n (%)			
F508-del heterozigoto	44,8%	33,3%	33,3%
F508-del homozigoto	20,7%	33,3%	16,7%
Outras mutações	34,5%	33,3%	50,0%
Escore Shwachman-Kulczychi, mediana (IQR)	85,0 (85-90)	77,5 (72,5 a 90)	72,5 (60 a 82,5)
Exacerbação pulmonar da FC, n (%)	9 (31,0%)	4 (33,3%)	1 (16,7%)
Coinfecção, n (%)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (27,6%)	5 (41,7%)	2 (33,3%)
MRSA	1 (3,4%)	1 (8,3%)	0
<i>Burkholderia cepacia complexo</i>	1 (3,4%)	2 (16,7%)	0
Estado pancreático, n (%)			
Insuficiente	26 (86,2%)	11 (91,7%)	5 (83,3%)
Suficiente	3 (13,8%)	1 (8,3%)	1 (16,7%)
Medicações inalatórias em uso, n (%)			
Inalação com NaCl 3%	1 (3,4%)	0	0
Inalação com Dornase-alfa	3 (10,3%)	1 (8,3%)	0
Beta-agonista de curta ação	4 (13,8%)	1 (8,3%)	1 (16,7%)

FC: Fibrose cística; IMC: Índice de Massa Corpórea; IQR: Intervalo Interquartil.
 MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. NaCl: Cloreto de sódio.

9.3 Efetividade do protocolo de erradicação

Durante o período de 8,5 anos de estudo, os 29 pacientes apresentaram 47 episódios de Pa elegíveis à erradicação. Em apenas 5 desses episódios foi necessária a utilização de antibiótico EV por exacerbação concomitante da doença pulmonar da FC, sendo 4 desses já no primeiro aparecimento de Pa. Os pacientes

realizaram uma média de 7 (DP ± 2) culturas de via aérea em 12 meses, sendo a maioria delas de orofaringe (75%).

De todos os isolamentos de Pa elegíveis à erradicação, 87,2% foram não-mucoides. A mediana de tempo entre o término da fase de erradicação e a primeira cultura subsequente foi de 16 dias (IQR: 6 a 28) na fase 1, de 35 dias (IQR: 14 a 43) na fase 2 e de 43 dias (IQR: 31 a 63) na fase 3.

Todos os 29 pacientes incluídos no estudo foram submetidos à fase 1 do protocolo de erradicação. Destes, 17 tiveram sucesso já na fase 1, e 12 foram submetidos à fase 2 por apresentarem cultura positiva para Pa. Dos pacientes que receberam a segunda fase de erradicação, 6 pacientes tiveram sucesso e 6 foram submetidos à fase 3 do protocolo. Dentre os pacientes que receberam a terceira fase, 4 obtiveram sucesso e apenas 2 tiveram falha (Figura 12).

A taxa de sucesso do protocolo de erradicação da Pa após a fase 1 foi de 58,6% (IC 95%: 40,7 a 74,5), após a fase 2 foi de 50,0% (IC 95%: 25,4 a 74,6) e após a fase 3 foi de 66,7% (IC 95%: 30,0 a 90,3), totalizando 93,1% (IC: 78,0 a 98,1) de taxa de sucesso acumulado. Os dois pacientes que tiveram falha na erradicação da Pa têm como peculiaridades idade maior na colonização inicial em um (4,1 anos) e doença mais grave no outro (escore Shwachman-Kulczychi de 70) quando comparados aos demais pacientes. O paciente mais grave estava em exacerbação pulmonar no momento da erradicação, mas sem necessidade de antibioticoterapia endovenosa ou internação, e nenhum dos dois pacientes apresentou Pa mucoide na primeira colonização.

Figura 12: Descrição da efetividade do protocolo de erradicação da Pa
Taxa de sucesso acumulado: 93,1% (IC: 78,0 a 98,1)

10 Discussão

Nosso estudo é o primeiro a avaliar um protocolo de erradicação de Pa aplicado em crianças brasileiras com FC. O tratamento de erradicação em 3 fases adotado no Instituto da Criança foi efetivo em um cenário de vida real com alta taxa de sucesso (93%). Através de um protocolo baseado em fases incrementou-se a porcentagem dos pacientes sem aparecimento de Pa pós-erradicação em 34%, sugerindo um benefício real dessa abordagem.

O tratamento de erradicação aqui estudado foi aplicado no primeiro aparecimento de Pa na vida em todos os casos, diferindo da maioria dos estudos publicados. Vários trabalhos permitiram que os pacientes fossem incluídos mesmo já tendo apresentado Pa previamente (25, 44, 48, 51, 53, 60), sendo geralmente crianças de maior idade. A baixa idade encontrada nos pacientes estudados na primeira colonização por Pa é preocupante, exigindo uma intervenção terapêutica precoce para maximizar a chance de sucesso, como observado nessa casuística.

Apesar de a erradicação da Pa ser considerada uma terapia padrão, ainda não há evidências suficientes sobre qual a melhor estratégia terapêutica a ser seguida (40). Existem poucos estudos avaliando a efetividade da terapia de erradicação por fases de tratamento. Frederiksen et al. descreveram os resultados da aplicação de um protocolo com três fases, utilizando colistimetato IN e ciprofloxacino VO, variando a dose e tempo de tratamento entre as fases, alcançando assim uma taxa de sucesso de 78%, e melhora da função pulmonar nos

pacientes tratados (33). Tacetti et al. avaliaram o tratamento de erradicação em duas fases, utilizando colistimetato IN e ciprofloxacino VO, com maior tempo de uso de ATB IN na segunda fase. Tal estudo resultou em uma taxa de sucesso de 81%, com uma mediana de reaparecimento da Pa de 18 (4-80) meses (25). Blanchard et al. publicaram recentemente uma experiência com um protocolo de erradicação de 2 fases em um centro de FC no Canadá. O referido protocolo se baseava no resultado da cultura e presença ou não de sintomas respiratórios, podendo os pacientes receberem duas fases de tobramicina IN associada ou não a ATB EV. O estudo mostrou uma taxa de sucesso acumulado de 88% (53).

Usar colistimetato IN associado a ciprofloxacino VO como terapia de erradicação anti-Pa é uma prática consagrada (22), mas recentemente a literatura vem discutindo a real necessidade do antibiótico sistêmico nas terapias de erradicação. Protocolos mais recentes têm sinalizado o papel do antibiótico inalatório isoladamente na erradicação da Pa, com uma tendência para encurtar essa terapia comparada aos estudos iniciais (40). Treggiari et al. no importante estudo multicêntrico EPIC-CT observaram benefícios semelhantes entre os grupos que receberam ATB inalatório associado ao sistêmico e o grupo que apenas recebeu ATB inalatório, com mesma redução de taxa de exacerbação e de reaparecimento de Pa. Os autores sugeriram ao final que a associação de ciprofloxacino VO não trouxe benefício aos pacientes (48). Ratjen et al. trataram a colonização precoce por Pa em 88 pacientes com tobramicina IN por 28 dias ou 56 dias. Os resultados mostraram que a mediana de recorrência de Pa foi similar entre os grupos assim como a porcentagem de pacientes sem Pa no primeiro mês após

o tratamento de erradicação (93 e 92%, respectivamente). O uso mais prolongado de tobramicina IN não se mostrou efetivo nesse grupo de pacientes (51) . Esses achados permitem que os centros de FC optem por encurtar o tempo de uso de antibiótico inalatório nas erradicações para 28 dias e sugerem que a associação com ciprofloxacino seja feita de forma individualizada, por exemplo quando se detecta exacerbação pulmonar concomitante ao isolamento inicial da Pa.

Em relação a escolha do antibiótico inalatório a ser utilizado na erradicação, evidencia-se uma tendência do uso do colistimetato em países europeus (25, 33, 42, 43, 46) e da tobramicina nos países da América do Norte (48, 51, 53). Proesmans et al. publicaram os resultados de um estudo clínico randomizado, controlado e multicêntrico comparando o uso de tobramicina IN por 28 dias contra colistimetato IN + ciprofloxacino VO por 3 meses. Os autores evidenciaram que a taxa de sucesso da erradicação entre os grupos foi semelhante e sem diferença estatística (63% e 65% respectivamente), e ambos os grupos apresentaram a mesma condição clínica ao longo dos dois anos do estudo (44). Um estudo italiano também avaliou o uso dos dois diferentes antibióticos inalatórios na erradicação da Pa em 223 pacientes com FC, e mostrou não haver diferença no sucesso da erradicação entre tobramicina IN e colistimetato IN, ambos por 28 dias e associados a ciprofloxacino VO pelo mesmo período (65,28% e 62,8% respectivamente) (52). A partir dos resultados desses estudos entende-se que ambos os antibióticos inalatórios podem ser usados com boa efetividade na erradicação, sendo a escolha baseada na disponibilidade do medicamento e na tolerância do paciente à medicação.

A manutenção da erradicação a longo prazo, principal meta das terapias de erradicação da Pa, ainda é um importante desafio. Nosso estudo mostrou uma tendência de aumento do reaparecimento da Pa com o passar do tempo. A coorte observacional derivada do estudo EPIC-CT mostrou que 69% dos pacientes ainda estavam livres de Pa após 12 meses da terapia de erradicação, e que estes pacientes apresentaram uma redução de 74% de colonização crônica por Pa (39). Taccetti et al. avaliaram a eficácia do regime de erradicação em 3 tempos (logo após o tratamento, após 4 e 6 meses) e mostraram que o reaparecimento de Pa aos 6 meses foi de 64,1% (52). Já outros estudos mostram que a erradicação pode se sustentar por até 2 anos após a intervenção em alguns casos (40). A vigilância microbiológica após a terapia de erradicação, com realização de culturas de via aéreas a cada 2 a 3 meses é fundamental, e frente ao reaparecimento de Pa novas tentativas de erradicação podem ser feitas antes que o paciente configure o estado de colonização crônica (52).

Entre as limitações do nosso estudo, podemos citar a casuística reduzida e o desenho retrospectivo baseado em revisão de prontuários. Fatores que não puderam ser avaliados, como a função pulmonar (devido à baixa idade dos pacientes), adesão e uso correto do tratamento seriam de grande interesse e poderiam representar fontes de viés para os resultados observados. Por outro lado, o estudo incluiu pacientes na primeira colonização por Pa identificada na vida, conferindo uma amostra mais homogênea e trazendo uma importante informação de vida real.

Estudos maiores de longo prazo, multicêntricos, com braços comparadores que avaliem crianças de baixa idade na primeira colonização por Pa na vida, ainda são necessários tanto para determinar a melhor estratégia de erradicação, quanto para indicar a melhor intervenção em casos de falha imediata da erradicação.

11 Conclusão

O protocolo de erradicação da *Pseudomonas aeruginosa* em fases adotado no centro de referência em FC do ICr HC FMUSP por 8,5 anos foi efetivo, com uma taxa de sucesso acumulado de 93%.

O primeiro aparecimento da *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu em crianças com fibrose cística de baixa idade, predominantemente meninos, com estado nutricional normal, gravidade leve da doença, e com ao menos um alelo F508-del presente.

12 Referências

1. Treggiari MM, Rosenfeld M, Mayer-Hamblett N, Retsch-Bogart G, Gibson RL, Williams J, Emerson J, Kronmal RA, Ramsey BW; EPIC Study Group. Early anti-pseudomonal acquisition in young patients with cystic fibrosis: rationale and design of the EPIC clinical trial and observational study'. *Contemp Clin Trials*. 2009;30(3):256-68.
2. MC F, AJ L. Aspectos epidemiológicos da Fibrose Cística. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2011;10(4):12-22.
3. Programme WHG. *The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis: report of a joint meeting of WHO/IECFTN/ICF(M)A/ECFS*. [cited nov. 2018]. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/68702>; 2002.
4. Raskin S. *Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras*: Universidade Federal do Paraná; 2001.
5. GBEFC. *Registro Brasileiro de Fibrose Cística*. 2016.
6. Patient Registry. *Annual Data Report*. Cystic Fibrosis Foundation; 2015.
7. Foundation CF. *Annual Report*. Cystic Fibrosis Foundation; 2016.[cited nov. 2018]. Available from: <https://www.cff.org/About-Us/Reports-and-Financials/>.
8. Reis FJ, Damaceno N. Fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)*. 1998:S76-S94. .

9. GIBSON LE, COOKE RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;23(3):545-9.
10. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1981;305(25):1489-95.
11. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, [Buchwald M](#), [Tsui LC](#). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
12. Chernick V, Boat TF, Wilmott RW, Bush A. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*. 7a ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2006.
13. de Cássia Firmida M, Marques BL, da Costa CH. Fisiopatologia E manifestações clínicas da Fibrose cística. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2011;10(4).
14. Vaca L. Premio Nobel de Química 2014: un reconocimiento a la búsqueda por romper los límites de difracción de la luz. *Rev Fac Med (Méx)*. 2015;58(3):46-52.
15. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. *Cystic Fibrosis Center*, Sick Children Hospital. 2018 [cited 18/11/2018]. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>.
16. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):662-74.

17. Athanazio RA, da Silva LVRF, das Diretrizes Brasileiras GdT. Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. *J Bras Pneumol*. 2017;43(3):219-45.
18. Doring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*. 2004;3(2):67-91.
19. Athanazio RA, Silva Filho LVRF, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, Procianoy EDFA, Adde FV, Reis FJC, Ribeiro JD, Torres LA, Fuccio MB, Epifanio M, Firmida MC, Damaceno N, Ludwig-Neto N, Maróstica PJC, Rached SZ, Melo SFO; Grupo de Trabalho das Diretrizes Brasileiras de Diagnóstico e Tratamento da Fibrose Cística. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2017;43(3):219-45.
20. *Registro Brasileiro de Fibrose Cística*: GBEFC; 2015. [citado nov 2018]
Disponível em:
<http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2015.pdf>.
21. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017;181S:S4-S15.e1.
22. Shwachman H, Kulczycki LL. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis: studies made over a five-to fourteen-year period. *AMA J Dis Child*. 1958;96(1):6-15.

23. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2003;2(1):29-34.
24. Heltshe SL, Khan U, Beckett V, Baines A, Emerson J, Sanders DB, Gibson RL, Morgan W, Rosenfeld M. Longitudinal development of initial, chronic and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2018;17(3):341-7.
25. Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2005;26(3):458-61.
26. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005;293(5):581-8.
27. Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9(6):492-7.
28. Douglas TA, Brennan S, Gard S, Berry L, Gangell C, Stick SM, Clements BS, Sly PD. Acquisition and eradication of *P. aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2009;33(2):305-11.
29. Lebecque P, Leal T, Zylberberg K, Reyhler G, Bossuyt X, Godding V. Towards zero prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2006;5(4):237-44.

30. Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros*. 2005;4:49-54.
31. Schelstraete P, Haerynck F, Van daele S, Deseyne S, De Baets F. Eradication therapy for *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by *P. aeruginosa*. *J Cyst Fibros*. 2013;12(1):1-8.
32. Brett MM, Simmonds EJ, Ghoneim AT, Littlewood JM. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1992;67(9):1086-8.
33. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1997;23(5):330-5.
34. Kerem E, Corey M, Gold R, Levison H. Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pediatr*. 1990;116(5):714-9.
35. Ballmann M, Rabsch P, von der Hardt H. Long-term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1998;53(9):732-7.
36. FitzSimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *Curr Probl Pediatr*. 1994;24(5):171-9.

37. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, Touw DJ. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. 2000;16(4):749-67.
38. Jaffar-Bandjee MC, Lazdunski A, Bally M, Carrère J, Chazalotte JP, Galabert C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 1995;33(4):924-9.
39. Mayer-Hamblett N, Kloster M, Rosenfeld M, Gibson RL, Retsch-Bogart GZ, Emerson J, Thompson V, Ramsey BW. Impact of sustained eradication of new *Pseudomonas aeruginosa* infection on long-term outcomes in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*. 2015;61(5):707-15.
40. Langton Hewer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;4:CD004197.
41. Mogayzel Jr PJ, Naureckas ET, Robinson KA, Brady C, Guill M, Lahiri T, Lubsch L, Matsui J, Oermann CM, Ratjen F, Rosenfeld M, Simon RH, Hazle L, Sabadosa K, Marshall BC. Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Guideline*. Pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(10):1640-50.
42. Littlewood J, Miller M, Ghoneim A, Ramsden C. Nebulised colomycin for early *pseudomonas* colonisation in cystic fibrosis. *Lancet*. 1985;325(8433):865.

43. Valerius NH, Koch C, Høiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet*. 1991;338(8769):725-6.
44. Proesmans M, Vermeulen F, Boulanger L, Verhaegen J, De Boeck K. Comparison of two treatment regimens for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2013;12(1):29-34.
45. Conway SP, Lee TW. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in people with cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2009;3(4):349-61.
46. Hansen C, Pressler T, Høiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. *J Cyst Fibros*. 2008;7(6):523-30.
47. Vazquez C, Municio M, Corera M, Gaztelurrutia L, Sojo A, Vitoria JC. Early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Acta Paediatr*. 1993;82(3):308-9.
48. Treggiari MM, Retsch-Bogart G, Mayer-Hamblett N, Khan U, Kulich M, Kronmal R, Williams J, Hiatt P, Gibson RL, Spencer T, Orenstein D, Chatfield BA, Froh DK, Burns JL, Rosenfeld M, Ramsey BW; Early *Pseudomonas* Infection Control (EPIC) Investigators. Comparative efficacy and safety of 4 randomized regimens to treat early *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2011;165(9):847-56.

49. Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet*. 2001;358(9286):983-4.
50. Schelstraete P, Deschaght P, Van Simaey L, Van Daele S, Haerynck F, Vaneechoutte M, et al. Genotype based evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* eradication treatment success in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2010;9(2):99-103.
51. Ratjen F, Munck A, Kho P, Angyalosi G. Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial. *Thorax*. 2010;65(4):286-91.
52. Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, Buzzetti R, Costantini D, Trevisan F, Zavataro L, Campana S; Italian Group for *P aeruginosa* Eradication in Cystic Fibrosis. Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols. *Thorax*. 2012;67(10):853-9.
53. Blanchard AC, Horton E, Stanojevic S, Taylor L, Waters V, Ratjen F. Effectiveness of a stepwise *Pseudomonas aeruginosa* eradication protocol in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2017;16(3):395-400.
54. Anstead M, Heltshe SL, Khan U, Barbieri JT, Langkamp M, Döring G, Dharia S, Gibson RL, Treggiari MM, Lymp J, Rosenfeld M, Ramsey B. *Pseudomonas aeruginosa* serology and risk for re-isolation in the EPIC trial. *J Cyst Fibros*. 2013;12(2):147-53.

55. Gibson RL, Emerson J, Mayer-Hamblett N, Burns JL, McNamara S, Accurso FJ, Konstan MW, Chatfield BA, Retsch-Bogart G, Waltz DA, Acton J, Zeitlin P, Hiatt P, Moss R, Williams J, Ramsey BW. Duration of treatment effect after tobramycin solution for inhalation in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2007;42(7):610-23.
56. Stanojevic S, Waters V, Mathew JL, Taylor L, Ratjen F. Effectiveness of inhaled tobramycin in eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014;13(2):172-8.
57. Emiralioglu N, Yalcin E, Meral A, Sener B, Dogru D, Ozcelik U, Kiper N. The success of the different eradication therapy regimens for *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Clin Pharm Ther.* 2016;41(4):419-23.
58. Zemanick ET, Emerson J, Thompson V, McNamara S, Morgan W, Gibson RL, Rosenfeld M; EPIC Study Group. Clinical outcomes after initial *pseudomonas* acquisition in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50(1):42-8.
59. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008;153(2):S4-S14.
60. Mayer-Hamblett N, Kloster M, Rosenfeld M, Gibson RL, Retsch-Bogart GZ, Emerson J, Thompson V, Ramsey BW. Impact of Sustained Eradication of

New *Pseudomonas aeruginosa* Infection on Long-term Outcomes in Cystic Fibrosis. *Clin Infect Dis*. 2015;61(5):707-15.