

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**INFECȚII INTERCURENTE ȘI
OPORTUNISTE LA PACIENȚII AFLAȚI
ÎN TERAPIE CU AGENȚI BIOLOGICI
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. ADRIAN STREINU-CERCEL**

**Student-doctorand:
RAMONA ȘTEFANIA VLĂDESCU (căsăt. POPESCU)**

2018

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE ELABORATE ȘI PUBLICATE.....	6
A. ARTICOLE IN EXTENSO ÎN REVISTE DIN ȚARĂ.....	6
B. LUCRĂRI PREZENTATE LA CONGRESE CU REZUMAT PUBLICAT ÎN REVISTA SAU VOLUMUL DE REZUMATE – poster	6
ABREVIERI.....	8
INTRODUCERE.....	10
PARTEA GENERALĂ.....	13
Capitolul 1. Terapia biologică.....	13
1.1 Cum definim terapia biologică.....	13
1.2 Agenți biologici utilizați în tratamentul bolilor reumatice de tip inflamator	14
1.2.1 Nomenclatura agenților biologici utilizați în tratamentul bolilor reumatice de tip inflamator	14
1.2.2 Clasificare și mecanisme de acțiune	15
1.2.3 Perspective și noi direcții de dezvoltare.....	17
1.2.3.1 Căile de semnalizare JAK/STAT.....	18
1.2.3.2 Alarminile S100	18
1.2.3.3 Celulele dendritice tolerogene	18
1.2.3.4 Chemokine	19
1.2.3.5 Biosimilarii	19
1.2.3.6 Alte perspective	19
Capitolul 2. Infecții secundare terapiei cu agenți biologici	20
2.1 Citokinele și rolul lor în fiziopatologia răspunsului inflamator sistemic și în răspunsul imun al gazdei	20
2.1.1 TNF-α și infecțiile bacteriene	20
2.1.2 TNF-α și infecțiile virale	22
2.1.3 TNF-α și infecțiile fungice	22
2.1.4 TNF-α și infecțiile parazitare	22
2.1.5 IL-1	22
2.1.6 IL-6	23
2.2 Infecții bacteriene	23
2.2.1 Tuberculoza	23
2.2.2 Listeria monocytogenes	24
2.2.3 Alte infecții bacteriene	24
2.3 Infecții virale	25
2.3.1 Virus hepatitic B	25
2.3.2 Virus hepatitic C	28
2.3.3 Herpes simplex virus	29
2.3.4 Virusul varicelo-zosterian	30
2.3.5 Virusul Epstein-Barr	31
2.3.6 Citomegalovirus	33
2.3.7 Virusul herpetic uman 8	34
2.3.8 Papilomavirus uman	35
2.3.9 Polyomavirus – JC	36
2.4 Infecții fungice	37

2.4.1 Candidoza	37
2.4.2 Pneumocystis jirovecii	37
2.4.3 Aspergiloza	38
2.4.4 Cryptococcus spp.	38
2.4.5 Micoze endemice	38
2.5 Infecții parazitare	39
Capitolul 3. Profilaxia și managementul complicațiilor infecțioase secundare terapiei biologice	40
3.1 Screening pentru depistarea tuberculozei active sau latente	41
3.2 Screening pentru infecția cu VHB și VHC	43
3.3 Vaccinare	46
PARTEA SPECIALĂ	50
Capitolul 4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	50
Capitolul 5. Metodologia generală a cercetării	51
5.1 Considerații etice	51
5.2 Analiza statistică	52
Capitolul 6. Monitorizarea în dinamică a pacienților cu afecțiuni reumatice pe durata terapiei cu agenți biologici	53
6.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	53
6.2 Pacienți și metode	54
6.2.1 Lotul de studiu	54
6.2.2 Lotul control	54
6.2.3 Monitorizarea pacienților pe durata studiului	55
6.3 Rezultate	56
6.3.1 Determinarea incidenței infecțiilor intercurrente și/sau oportuniste la pacienții cu terapie biologică	60
6.3.2 Dinamica numărului de neutrofile pe parcursul terapiei biologice	61
6.3.3 Dinamica limfocitelor CD4, CD8 și CD3 pe parcursul terapiei biologice	62
6.3.4 Dinamica Ac antiHBs pe parcursul terapiei biologice	64
6.3.5 Evaluarea riscului de a dezvolta bacteriemii spontane pe durata terapiei biologice	64
6.3.6 Evaluarea portajului nazal și/sau faringian cu Staphylococcus aureus pe durata terapiei biologice comparativ cu populația generală	64
6.4 Discuții	65
Capitolul 7. Evaluarea factorilor de risc și de prognostic în infecțiile latente, intercurrente și oportuniste la pacienții cu afecțiuni reumatice aflați în tratament cu agenți biologici...70	70
7.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	70
7.2. Pacienți și metode	71
7.2.1 Lotul de studiu	71
7.2.2 Etica studiului	71
7.2.3 Material și metode	71
7.3. Rezultate	71
7.3.1 Descrierea lotului	71
7.3.2 Terapia biologică	76
7.3.3 Infecții oportuniste	82
7.3.4 Infecții intercurrente	87

7.3.5 Prevalența infecției VHB	94
7.3.6 Prevalența infecției TBC latentă	97
7.4. Discuții	99
Capitolul 8. Experiența Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” privind complicațiile infecțioase apărute la pacienții cu afecțiuni reumatice aflați în tratament cu agenți biologici	104
8.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	104
8.2. Material și metodă	105
8.3. Rezultate	105
8.4. Discuții	118
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	123
BIBLIOGRAFIE	126
ANEXE	143

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE ELABORATE ȘI PUBLICATE

A. ARTICOLE IN EXTENSO ÎN REVISTE DIN ȚARĂ

1. Current recommendations regarding vaccination of patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. **Ramona Ștefania Popescu**, Oana Săndulescu, Anca Streinu-Cercel, Andra Bălănescu, Ruxandra Ionescu, Adrian Streinu-Cercel. Romanian Journal of Rheumatology – volume XXVI, no. 1, 2017, p19-23, ISSN 1843-0791 – Anexa 1.
2. Treatment challenges in Enterococcus faecium sepsis and Clostridium difficile diarrhea in a patient with B-Cell non-Hodgkin Lymphoma – case report. **Ramona Ștefania Popescu**, Adina Ilie, Rodica Bacruban, Cătălin Apostolescu, Adrian Streinu-Cercel. Revista Română de Boli Infecțioase, Vol. 18, no. 4, 2015, p160, ISSN 1454-3389 – Anexa 2.
3. Herpes virus, human papilloma virus and polyomavirus infection in patients undergoing biological therapy. **Ramona Ștefania Popescu**, Oana Săndulescu, Andra Bălănescu, Mihaela Rădulescu, Ruxandra Ionescu, Adrian Streinu-Cercel. Romanian Journal of Rheumatology, vol. XXIV, no. 2, 2015, p66-73, ISSN 1843-0791 – Anexa 3.

B. LUCRĂRI PREZENTATE LA CONGRESE CU REZUMAT PUBLICAT ÎN REVISTA SAU VOLUMUL DE REZUMATE - poster

1. Seroprevalence of HBV in patients with inflammatory systemic diseases treated with biological agents. **Ramona Ștefania Popescu**, Andra Rodica Balanescu, Anca Streinu-Cercel, Oana Săndulescu, Adrian Streinu-Cercel. The third edition of the CEE Meeting on Viral Hepatitis and Co-infection with HIV, septembrie 2017, Ljubljana, Slovenia – Anexa 4.
2. Hepatitis B reactivation associated to rituximab therapy for b-cell non-hodgkin lymphoma - case reports. **Ramona Ștefania Popescu**, Oana Săndulescu, Aida Roxana Aguridă, Magdalena Moțoi, Luminița Bradu, Adrian Streinu-Cercel. Congresul Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, 28-30 mai 2015 – Anexa 5.

3. Long term immunosuppression and its secondary infectious complications in a patient with rheumatoid arthritis – case report. **Ramona Ștefania Popescu**, Rodica Bacruban, Adrian Streinu-Cercel. Conferința Națională de Boli Infecțioase, Timișoara, 28-30 mai 2015 – Anexa 6.

4. Sepsis with multiple etiology associated to rituximab therapy for b-cell non-hodgkin lymphoma - case report. **Ramona Ștefania Popescu**, Ruxandra Moroti, Doina Antonică, Adriana Hristea. Conferința Națională de Boli Infecțioase, Craiova 7-9 mai 2015 – Anexa 7.

5. Intercurrent and opportunistic infections in patients treated with biological agents: study hypothesis. **Ramona Ștefania Popescu**, Andra Bălănescu , Adrian Streinu-Cercel. Conferința “The 10th Edition of the Scientific Days of The National Institute for Infectious Diseases Prof. Dr. Matei Balș”, București octombrie 2014. BMC Infect Dis. 14(Suppl 7): P40 – Anexa 8.

INTRODUCERE

Terapia biologică a deschis o nouă eră în multe ramuri ale medicinei, mai ales în ceea ce privește reumatologia. Agenții biologici au la ora actuală o aplicabilitate foarte largă în afecțiunile reumatice, dermatologice, gastrointestinale, neurologice sau neoplazice. Deși în prezent există o experiență destul de vastă în practica utilizării agenților biologici, se menține încă un interes crescut vizavi de siguranța și toleranța acestor molecule.

Riscul apariției infecțiilor oportuniste secundare utilizării acestor molecule este deja bine stabilit, însă cum agenți noi continuă să apară supravegherea acestor terapii se desfășoară în continuare la nivel internațional. De-a lungul timpului au fost concepute în mai multe țări europene registre care să monitorizeze siguranța și eficiența acestor terapii. Astfel, în Franța au fost constituite 2 astfel de registre și anume: registrul RATIO (Research Aaxed on Tolerance of Biotherapies) conceput să colecteze prospectiv toate cazurile de limfom sau infecții oportuniste la pacienții în terapie cu blocanți TNF- α indiferent de indicație și registrul AIR (AutoImmunity and Rituximab) cu scopul de a analiza toate cazurile de infecții severe la pacienții cu PR în tratament cu rituximab. Alte țări, precum Marea Britanie, Germania, Spania sau Suedia au conceput astfel de registre cu rolul de a colecta date referitoare la efectele secundare ale agenților biologici, inclusiv infecții severe și/sau oportuniste.

Studiul de față își propune să determine ratele de infecții severe și infecții intercurrente secundare utilizării agenților biologici în România, dar și să evalueze factorii de risc asociați.

Având în vedere multitudinea de molecule disponibile în prezent am decis să utilizez ca lot de studiu pacienți cu boli reumatice inflamatorii aflați în tratament cu agenți biologici. La nivel mondial, blocanții TNF- α au deschis orizontul terapiilor biologice pentru tratamentul bolilor reumatice în anul 1998, iar din anul 2001 și România se bucură de aceste molecule. Cu toate acestea, la nivel național date exacte despre apariția infecțiilor oportuniste secundare sunt extrem de limitate.

Cum la ora actuală terapiile biologice au câștigat din ce în ce mai mult teren în tratamentul bolilor reumatice este foarte importantă conștientizarea riscului secundar de infecție de către medicul care îi utilizează în practica curentă, dar și o familiarizare cu aceste molecule de către medicul infecționist pentru un management corect și o valorificare cât mai bună a acestor terapii revoluționare.

Studiul de față a avut ca lot pacienți cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici aflați în evidența a două clinici de reumatologie din București. Am realizat o analiză prospectivă, dar și retrospectivă a evoluției acestor pacienți pe durata terapiei.

Lucrarea se compune din 4 părți (Introducere, Partea generală, Partea specială și partea de Concluzii și contribuții personale) fiecare cu mai multe capitole și/sau subcapitole.

Partea generală cuprinde trei capitole, **Capitolul 1** – realizează o introducere în ceea ce înseamnă terapia biologică și expune o imagine de ansamblu asupra multitudinii de opțiuni terapeutice existente în acest moment. **Capitolul 2** – redă cele mai recente date din literatura de specialitate privind infecțiile secundare terapiei cu agenți biologici, iar **Capitolul 3** - oferă o prezentare actuală și practică privind profilaxia și managementul complicațiilor infecțioase secundare terapiei biologice, aici fiind incluse screeningul pentru depistarea tuberculozei active sau latente, screeningul pentru depistarea infecției VHB și VHC, dar și politicile internaționale de vaccinare a pacienților în tratament cu agenți biologici.

Partea specială, reprezintă un studiu complex al temei abordate, realizat printr-o analiză prospectivă, dar și retrospectivă a evoluției pacienților cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici. Cercetarea se compune din 3 studii individuale ale căror rezultate au fost coroborate în formularea concluziilor finale.

Studiul 1. Monitorizarea în dinamică a pacienților cu afecțiuni reumatice pe durata terapiei cu agenți biologici – studiu prospectiv desfășurat pe o perioadă de 18 luni în cadrul Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” ce a avut ca lot studiu pacienți aflați în evidența clinicilor de reumatologie din cadrul Spitalului “Sf. Maria” și Spitalul Clinic Colentina.

Studiul 2. Evaluarea factorilor de risc și de prognostic în infecțiile latente, intercurrente și oportuniste la pacienții cu afecțiuni reumatice aflați în tratament cu agenți biologici – studiu retrospectiv desfășurat în clinica de reumatologie a spitalului “Sf. Maria”.

Studiul 3. Experiența Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” privind complicațiile infecțioase apărute la pacienții cu afecțiuni reumatice aflați în tratament cu agenți biologici – studiu transversal desfășurat în perioada octombrie 2013 – decembrie 2017.

Lucrarea însumează în total 150 pagini, cu 27 tabele și 20 de figuri și o bogată bibliografie de peste 300 de referințe.

Ipoteza de lucru și obiectivele generale

La ora actuală agenții biologici sunt din ce în ce mai frecvent utilizați în clinică motiv pentru care este foarte importantă conștientizarea riscului secundar de infecție de către medicul care îi utilizează în practica curentă, dar și o familiarizare cu aceste molecule de către medicul infecționist pentru un management corect și o valorificare cât mai bună a acestor terapii revoluționare.

Studiul de față își propune să determine toleranța și siguranța utilizării terapiilor biologice, să analizeze ratele de infecții severe secundare și infecții intercurrente, dar și să evalueze factorii de risc asociați.

Având în vedere multitudinea de molecule biologice disponibile în prezent pentru tratamentul a numeroase afecțiuni din specialități medicale diferite, am decis să utilizez ca lot de studiu pacienți cu boli reumatice inflamatorii aflați în tratament cu agenți biologici.

Atât reumatologia cât și bolile infecțioase reprezintă specialități medicale a căror dezvoltare în ultimii ani a fost una exponențială din punct de vedere al accesului la resurse diagnostice și terapeutice. În acest context, colaborarea interdisciplinară devine extrem de importantă, în principal în vederea asigurării unei abordări unitare, coerente, a pacientului.

Desfășurarea acestui studiu în cadrul Disciplinei de Boli Infecțioase din Institutul de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” (INBIMB) asigură capacitatea de încorporare a rezultatelor derivate din acest studiu în practica clinică și în supravegherea epidemiologică a infecțiilor secundare terapiei cu agenți biologici. Astfel, studiul propus reprezintă o îmbinare a unor domenii diferite dar totodată complementare și sinergice ale științelor medicale, precum microbiologia, biologia moleculară, epidemiologia, reumatologia și bolile infecțioase.

Monitorizarea în dinamică a pacienților cu afecțiuni reumatice pe durata terapiei cu agenți biologici

Obiectivele specifice ale acestui studiu sunt:

1. determinarea incidenței infecțiilor intercurente și/sau oportuniste la pacienții cu terapie biologică
2. monitorizarea în dinamică a valorilor numărului de neutrofile pe parcursul terapiei biologice
3. monitorizarea în dinamică a valorilor numărului de limfocitelor CD4+, CD8+ și CD3+ pe parcursul terapiei biologice
4. monitorizarea în dinamică a titrului de Ac antiHBs pe parcursul terapiei biologice
6. determinarea incidenței bacteriemiiilor spontane pe durata terapiei biologice
7. evaluarea incidenței portajului nazal și/sau faringian cu *Staphylococcus aureus* la pacienții în tratament cu agenți biologici comparativ cu populația generală

Rezultate

Studiul prospectiv a inclus 37 de pacienți cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici și un lot control de 40 de pacienți. Lotul de studiu a fost format din 19 (51.4%) bărbați și 15 (37.5%) femei, iar media vârstei a fost de 47.62 ± 13.74 ani.

Lotul studiu a cuprins 13 (35.1%) pacienți cu poliartrită reumatoidă, 17 (45.9%) cu spondilartită și 7 (18.9%) cu artrită psoriazică. Dintre aceștia 17 (45.9%) erau în tratament cu etanercept, 9 (24.3%) cu adalimumab, 6 (16.2%) cu rituximab și 5 (13.5%) cu infliximab. Urmărirea pacienților în studiu a corespuns unei perioade de urmărire de 53 pacienți-ani.

Determinarea incidenței infecțiilor intercurente și/sau oportuniste la pacienții cu terapie biologică

Pe durata desfășurării studiului doar două paciente au prezentat episoade infecțioase severe ce au necesitat internare pentru investigații suplimentare și tratament de specialitate în clinica noastră.

Este vorba despre o pacientă care a dezvoltat multiple plăgi cutanate supurate fesă dreaptă și stângă (granuloame post tratamentente injectabile im), dar și deget IV picior stâng ce

au necesitat tratament chirurgical, motiv pentru care a întrerupt terapia biologică și a fost exclusă din studiu. Degetul IV a necesitat amputație din cauza extinderii infecției la nivel osos. De menționat, pacienta era în tratament cu etanercept pentru PR și cu excepția unei patologii cardiace nu prezenta alte comorbidități. De la nivelul leziunilor au fost izolați *Acinetobacter haemolyticus* și *Stenotrophomonas maltophilia*. A primit tratament antibiotic și recomandare către clinica de chirurgie pentru tratament de specialitate.

O altă pacienta a prezentat un episod de pneumonie interstițială ce a necesitat internare în clinica noastră, a primit tratament antibiotic cu claritromicină 500 mg la 12 ore cu evoluție favorabilă. Nu a fost identificat agentul patogen (serologie *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burnetti* – negative). Pacienta a întrerut terapia biologică pe durata internării în clinica noastră, dar a reluat-o ulterior cu același agent biologic.

În rândul pacienților urmăriți prospectiv nu au mai fost înregistrate alte infecții oportuniste și/sau severe. Pacienții au prezentat infecții intercurrente, cel mai frecvent IACRS, raportate retrospectiv către medicul investigator.

Deoarece lotul mic de pacienți și datele insuficiente nu au permis efectuarea unor calcule statistice corespunzătoare, în vederea determinării incidenței infecțiilor intercurrente și/sau oportuniste în rândul acestor pacienți am decis ca aceste date să fie prelucrate împreună cu cele ale pacienților din studiul următor.

Dinamica numărului de neutrofile pe parcursul terapiei biologice

La prima determinare pacienții au avut o mediană a numărului total de leucocite de $6.33 \cdot 10^3$ (IQR 5.39 – 7.86), iar la a doua determinare o mediană de $6.8 \cdot 10^3$ (IQR 5.95 – 8.56) fără modificări cu semnificație statistică ($Z = -0.228$, $p = 0.82$). La ultima determinare, leucocitele au avut o medie de 7.6 ± 1.71 , de asemenea fără modificări semnificative față de prima evaluare ($t(8) = -1.007$, $p = 0.34$).

La prima determinare, neutrofilele au avut o medie de 4.64 ± 1.54 , iar la a doua determinare media a fost de 4.12 ± 1.42 ($t(22) = 1.047$, $p = 0.307$). La ultima determinare, mediana neutrofilelor a fost de 3.95 (IQR 3.39 – 5.30) ($Z = -0.652$, $p = 0.515$).

Dinamica limfocitelor CD4, CD8 și CD3 pe parcursul terapiei biologice

Pe parcursul studiului au fost efectuate 3 determinări la interval de câte 6 luni ale limfocitelor CD4+, CD8+ și CD3+ la pacienții în tratament cu agenți biologici. Prima determinare s-a făcut la 34 de pacienți, următoarele la 15, respectiv 6 pacienți. Pe parcursul terapiei biologice nu au fost identificate modificări semnificative ale valorilor limfocite CD4+, CD8+, CD3+.

În urma efectuării unui test one-way ANOVA nu s-au determinat diferențe semnificative statistic între media valorilor CD4+, CD8+ și CD3+ în funcție de terapia de fond ($F(3,31) = 0.148$, $p = 0.906$; $F(3,31) = 0.180$, $p = 0.9$; respectiv $F(3,31) = 0.190$, $p = 0.9$). De asemenea, nu au existat diferențe semnificative statistic între valoarea raportului CD4+/CD8+ în funcție de medicația de fond ($F(3,31) = 0.9$, $p = 0.452$).

Dinamica Ac antiHBs pe parcursul terapiei biologice

Din lotul de studiu, 12 pacienți, adică 32.4% prezentau Ac antiHBs în titru protector (valoare peste 10) cu o mediană de 59.35 (IQR 38.45 – 365.5), 2 (17%) dintre aceștia prezentând dovada trecerii printr-o infecție VHB. Din lotul control, 13 pacienți (32.5%) prezentau Ac antiHBs în titru protector, cu o mediană de 49.9 (IQR 20.14 – 395) ($U = 68.5$, $p = 0.60$), dintre aceștia tot 2 (17%) pacienți prezentau dovada trecerii prin boală.

În dinamică determinarea titrului de Ac antiHBs în lotul studiu a arătat o mediană 43.56 (IQR 19.75 – 574.25) ($Z = -0.169$, $p = 0.86$). Datele au fost disponibile pentru 8 dintre cei 12 pacienți cu Ac antiHBs pozitivi.

Evaluarea riscului de a dezvolta bacteriemii spontane pe durata terapiei biologice

Pe durata studiului, pacienților li s-au recoltat în cadrul vizitelor de studiu hemoculturi pe medii speciale pentru germeni aerobi, anaerobi și BK în afebrilitate. Pe durata studiului nu s-a înregistrat niciun rezultat pozitiv.

Evaluarea portajului nazal și/sau faringian cu *Staphylococcus aureus* pe durata terapiei biologice comparativ cu populația generală

În urma evaluării portajelor, 4 (11%) pacienți au prezentat portaj pozitiv faringian cu *Staphylococcus aureus*, 2 pacienți cu SA, o pacientă cu PR și un pacient cu AP. Dintre aceștia,

2 prezentau și portaj pozitiv nazal. Toate tulpinile izolate erau metilino-rezistente, cu testul de rezistență inductibilă la clindamicină pozitiv, însă toate tulpinile prezentau sensibilitate la fluorchinolone, rifampicină, trimetoprim-sulfametoxazol și acid fusidic. Toți pacienții erau în tratament cu agenți antiTNF (3 cu etanercept și unul cu infliximab).

Discuții

Deși evaluările pe durata terapiei nu au identificat niciun pacient cu neutropenie, se poate observa o dinamică descrescătoare a acestora, însă fără semnificație statistică ($t(5) = 0.061$, $p = 0.954$). În literatura de specialitate au fost raportate mai multe cazuri de neutropenie dezvoltată după utilizarea agenților antiTNF (1, 2), acest eveniment fiind încadrat ca reacție adversă foarte rară, însă nu a fost identificat mecanismul producerii până la momentul actual.

Având în vedere aceste aspecte trebuie recunoscută importanța monitorizării în dinamică a numărului de neutrofile la acești pacienți pentru a putea surprinde din timp astfel de reacții adverse ce impun oprirea terapiei.

La ora actuală datele privind evoluția diferitelor subpopulații de limfocite T CD4+ sau CD8+ pe parcursul terapiei antiTNF- α sunt destul de limitate. Un studiu recent efectuat de Dulic et al. (3, 4) la pacienți cu PR și SA în tratament cu agenți antiTNF- α responsivi la tratament a arătat că frecvența celulelor naive CD4+ și CD8+ este mai scăzută, în timp ce se observă o creștere a populațiilor de celule proinflamatorii Th1, Th2, Th17 și celule HLA-DR4+ activate comparativ cu pacienții netratați sau cu subiecții sănătoși. În aceste condiții chiar dacă pe durata studiului nu s-a înregistrat o scădere semnificativă a numărului absolut de limfocite CD4+, nu se pot trage concluzii ferme privind efectul terapiei biologice asupra acestora necunoscându-se dinamica subpopulațiilor de limfocite T în lotul studiat. Mai mult decât atât, nu deținem date anterioare inițierii terapiei biologice.

Evaluarea Ac antiHBs pe durata terapiei a evidențiat o minimă scădere a medianeii titrului de anticorpi, însă fără nicio semnificație statistică. La niciunul dintre pacienți nu s-a observat o scădere a titrului de anticorpi sub valoarea de protecție. Un singur pacient prezenta Ac antiHBs cu valoare borderline și s-a menținut astfel și la evaluarea ulterioară. Într-adevăr studiile confirmă scăderea titrului de Ac antiHBs și chiar pierderea lor pe durata terapiei cu molecule anti-TNF (5), însă nu s-a înregistrat un risc mai mare de reactivare a VHB în rândul acestor pacienți. Se consideră că acești pacienți nu devin neapărat neprotejați, în ciuda pierderii

Ac antiHBs, fiind binecunoscut rolul memoriei imunologice. Cu toate acestea, scăderea titrului de Ac antiHBs survenită pe durata terapiei nu poate fi trecută cu vederea deoarece s-a demonstrat faptul că răspunsul limfocitelor B cu memorie antigen-specifică poate fi scăzut pe durata terapiei cu molecule antiTNF prin efectul asupra centrilor germinativi și asupra rețelelor de celule foliculare dendritice (6).

În cazul pacienților cu Ac antiHBs dobândiți prin vaccinare nu se cunosc date referitoare la utilitatea unui rapel în cazul scăderii sau pierderii acestora pe durata terapiei. Acest aspect ar trebui totuși supus atenției mai ales în țările cu prevalență medie, precum România, sau crescută a infecției VHB.

Evaluarea factorilor de risc și de prognostic în infecțiile latente, intercurrente și oportuniste la pacienții cu afecțiuni reumatice aflați în tratament cu agenți biologici

Obiectivele specifice ale acestui studiu sunt:

1. identificarea incidenței infecțiilor oportuniste și intercurrente la pacienții cu afecțiuni reumatice inflamatorii aflați în terapie cu agenți biologici din România și comparație cu datele existente pe plan internațional;
2. stabilirea particularităților infecțiilor oportuniste, dar și intercurrente la acești pacienți (tablou clinic, evoluție, răspuns la tratament);
3. identificarea factorilor de risc pentru dezvoltarea infecțiilor pe durata terapiei;
4. determinarea incidenței infecțiilor intercurrente și/sau oportuniste în funcție de terapia utilizată
5. determinarea seroprevalenței infecției VHB în rândul acestor pacienți
6. determinarea prevalenței tuberculozei latente în rândul acestor pacienți

Rezultate

Am studiat o cohortă de 291 de pacienți, dintre care 171 (58.8%) cu poliartrită reumatoidă, 102 (35.1%) cu spondilartrită și 18 (6.2%) cu artrită psoriazică. Mediana vârstei în lotul studiat a fost de 56 (IQR: 42 - 66) cu o rată bărbați:femei de 0.6:1, iar 78.4% dintre pacienți proveneau din mediul urban. Mediana vârstei pacienților cu PR a fost de 62 (IQR: 54 – 69), a

pacienților cu SA a fost 41 (IQR: 35 - 50) ani, iar cea a pacienților cu AP a fost de 57 (IQR: 45 – 61).

Studiul a inclus 180 de femei, 148 (82%) cu PR, 21 (12%) cu SA și 11 (6%) cu AP. Dintre cei 111 bărbați incluși în studiu 81 (73%) aveau SA, 23 (21%) aveau PR și 7 (6%) aveau AP.

Terapia biologică

Urmărirea pacienților pe durata studiului a corespuns unei perioade de 7143 luni (595.25 pacienți-an) de tratament cu agenți biologici cu o mediană de 24 (IQR: 17-35) luni de urmărire/pacient.

Aproape jumătate (48%) dintre pacienții din lotul de studiu aveau istoric de utilizare a cel puțin unui alt agent biologic decât cel actual. Dintre aceștia 33.7% se aflau la al doilea agent biologic, iar 2 pacienți aveau istoric de 6 scheme terapeutice.

Principalul motiv pentru schimbarea terapiei biologice a fost reprezentat de lipsa de răspuns secundar la terapie (61.9%), urmat ca frecvență de apariția efectelor adverse (28.6%) cum ar fi apariția de rash sau reacții de tip anafilactic. De menționat, doar în 2.4% din cazuri motivul schimbării agentului biologic a fost reprezentat de apariția unui eveniment infecțios.

Infecții oportuniste

Pe parcursul lunilor de urmărire în cadrul studiului au fost identificate 9 (7%) infecții oportuniste, un caz de tuberculoză pulmonară, un caz de tuberculoză extrapulmonară, o ITU cu *Pseudomonas aeruginosa*, o plagă suprainfectată cu *Acinetobacter haemolyticus* și *Stenotrophomonas maltophilia* deget IV picior stâng cu extindere osoasă și 5 cazuri de herpes zoster.

Ținând cont de faptul că perioada de urmărire este egală cu 595.25 pacienți-ani ne confruntăm cu o rată a incidenței infecțiilor oportuniste nonTB de 11.75 la 1000 pacienți-ani ($7/595.25 = 0.01175$ pacienți-ani = 11.75 infecții oportuniste la 1000 pacienți-ani) și o rată a incidenței TBC de 3.3 cazuri noi la 1000 pacienți-ani ($2/595.25 = 0.0033$ pacienți-ani = 3.3 cazuri noi la 1000 pacienți-ani).

Dintre cele 6 cazuri de infecții oportuniste nonTB, 5 (83%) au fost la pacienți care primeau medicație concomitentă cu prednison, în doze $< 7.5\text{mg/zi}$, și doar unul dintre aceste

cazuri a apărut în primii doi ani de terapie biologică, perioadă considerată ca asociind cel mai înalt risc de apariție al infecțiilor.

Conform WHO incidența TBC în România este de 74 de cazuri noi în populația generală (inclusiv pacienții HIV pozitivi) la 100000 de locuitori/an, ceea ce corespunde cu 0.74 cazuri noi la 1000 locuitori/an. Comparând aceste cifre rezultă că rata incidenței TBC în rândul pacienților cu terapie biologică este de 4.45 ori mai mare decât în populația generală.

O analiză extinsă a registrelor medicale ale acestor pacienți a mai identificat încă 4 cazuri de tuberculoză: un caz TBC pulmonar, un caz TBC ganglionar, un caz peritonită TBC și un caz TBC diseminat (sistemic). Toți pacienții au întrerupt terapia biologică și au primit tratament specific cu evoluție favorabilă.

Toate cazurile identificate de TBC în urma analizei registrelor medicale ale pacienților au fost la pacienți aflați în tratament cu agenți antiTNF.

Se observă astfel că din cele 6 cazuri de tuberculoză identificate prin analiza registrelor două cazuri (33%) erau de tuberculoză pulmonară și mai mult de jumătate, 4 (67%) au fost cazuri de tuberculoză extrapulmonară.

Infecții intercurrente

Pe durata studiului au fost identificate 99 episoade infecțioase intercurrente, cel mai frecvent infecții acute de tract respirator superior (IACRS) (33%), infecții de tract urinar (26%) și infecții ORL (16%) cu o rată a incidenței infecțiilor intercurrente de 166.31 la 1000 pacienți-ani.

Dintre acestea, 19 (19%) episoade infecțioase au apărut în primii 2 ani de la debutul terapiei biologice.

Cele mai multe infecții au fost raportate la pacienții sub tratament cu etanercept (34%) cu o rată a incidenței de 239.43 de cazuri la 1000 pacienți-ani. Mediana timpului scurs de la inițierea terapiei cu etanercept și până la apariția evenimentului infecțios a fost de 61.5 (IQR: 35 – 86).

Referindu-ne însă la rata incidenței episoadelor infecțioase, primele locuri sunt ocupate de infliximab biosimilar și golimumab cu o rată a incidenței de 571.42 la 1000 pacienți-ani, respectiv 304.34 la 1000 pacienți-ani, ceea ce se traduce prin 2 episoade infecțioase raportate în 3.5 ani de urmărire terapie cu infliximab biosimilar, respectiv 7 episoade infecțioase raportate

în 23 ani de urmărire terapie cu golimumab. Cea mai mică rată a incidenței în studiul prezent a asociat-o tocilizumab și anume 78.12 la 1000 pacienți-ani.

Pe parcursul apariției episoadelor infecțioase doar un singur pacient a necesitat oprirea terapiei biologice și modificarea agentului utilizat, fiind vorba de un pacient cu SA în tratament cu etanercept care a dezvoltat abces articulație coxo-femurală pe proteză metalică. În alte 7 cazuri (7.1%) s-a decis întreruperea terapiei biologice pe durata episodului infecțios.

Printre factorii de risc pentru apariția unui episod infecțios pe durata terapiei biologice au fost identificați: terapia biologică prelungită ($p = 0.005$, $r = -0.163$), istoric de terapie biologică anterioară ($p = 0.009$, $OR = 2.04$)– acești pacienți prezentând un risc de două ori mai mare de a prezenta un eveniment infecțios intercurrent, dar și prezența diabetului zahart ($p = 0.032$) ca și comorbiditate.

În plus, pacienții cu poliatrită reumatoidă care au prezentat la inițierea terapiei biologice un scor de activitate DAS28(VSH) mărit, prezintă un risc mai mare de a asocia infecții intercurrente pe durata terapiei biologice.

Analiza statistică a arătat că pacienții în tratament cu etanercept asociază un risc de 1.8 mai mare de a dezvolta un eveniment infecțios intercurrent pe durata terapiei ($p = 0.028$, $OR = 1.88$, $IC95\% = 1.08 - 3.26$), studiul de față identificând o rată a incidenței infecțiilor intercurrente de 239.43 la 1000 pacienți-ani, cu o mediană de apariție de 61.5 (35 – 86) de la inițierea terapiei cu acest agent.

Prevalența infecției VHB

Evaluarea completă a markerilor virali hepatici prin determinarea AgHBs, Ac anti-HBs, Ac anti-HBc și Ac anti-VHC a fost disponibilă pentru 238 de pacienți. Dintre aceștia 78 (32.6%) au prezentat anticorpi protectori împotriva VHB, mai mult de jumătate dintre aceștia (53.8%) câștigând această protecție secundar trecerii prin boală, iar restul de 46.2% prin vaccinare.

De asemenea, trebuie remarcat că 138 (58%) de pacienți din cei 238 ale căror determinări sunt disponibile nu prezintă dovada vaccinării antiVHB sau dovada trecerii prin boală, acest lot de pacienți putând beneficia de vaccinarea antiVHB.

Infecția cronică VHB, obiectivată prin prezența AgHBs, a fost identificată la 3 (1.1%) pacienți din lotul de studiu, toți fiind în tratament antiviral cu entecavir și cu AND-VHB nedetectabil la momentul înregistrării datelor.

De remarcat faptul că mai mult de un sfert (26.8%) dintre pacienții evaluați prezintă dovada trecerii prin infecția VHB, iar 22 (34.8%) dintre ei nu au dezvoltat anticorpi protectori.

Pacienții cu vârstă mai înaintată au riscul mai mare de a prezenta dovada trecerii printr-o infecție VHB, însă nu s-a corelat cu boala de fond, durata bolii, prezența comorbidităților, cu istoricul de intervenții chirurgicale sau cu terapia biologică de lungă durată.

Niciunul dintre pacienții care prezentau dovada trecerii prin boală nu au dezvoltat reactivare a infecției VHB pe durata urmăririi în studiu.

Prevalența infecției TBC latentă

Din lotul studiat 70 (24.1%) de pacienți au fost diagnosticați cu TBC latent, 39 (56%) având PA, 26 (37%) aveau SA și 5 (7%) pacienți aveau AP. Pentru 58 (83%) dintre aceștia diagnosticul a fost stabilit utilizându-se QuantiFERON TB Gold, iar un singur pacient din acest lot a avut o primă determinare negativă cu pozitivare ulterioară la 3 ani. Restul de 12 (17%) pacienți au fost diagnosticați în urma testului IDR la PPD.

Analiza statistică a datelor arată faptul că bărbații au un prezentat mai frecvent un rezultat pozitiv la QuantiFERON TB Gold cu un risc de 1.6 ori mai mare decât femeile ($\chi^2(1) = 5.310$, $p = 0.03$, $RR = 1.623$, $IC95\% = 1.0 - 2.4$, $\Phi = -0.139$). Nu a mai fost identificată nicio altă variabilă ca potențial factor de risc pentru un rezultat pozitiv la acest test.

Discuții

Aproape jumătate (48%) dintre pacienții din lotul de studiu aveau istoric de utilizare a cel puțin unui alt agent biologic decât cel actual. De menționat, doar în 2.4% din cazuri motivul schimbării agentului biologic a fost reprezentat de apariția unui eveniment infecțios. Într-adevăr, un studiu recent (7) a raportat cea mai frecventă cauză de întrerupere a tratamentului antiTNF ca fiind pierderea eficacității (51.5%), în 19.1% din cazuri motivul a fost reprezentat de apariția efectelor adverse.

Pe parcursul lunilor de urmărire în cadrul studiului au fost identificate 9 (7%) infecții oportuniste: un caz de tuberculoză pulmonară, un caz de tuberculoză extrapulmonară, o ITU cu *Pseudomonas aeruginosa*, o plagă suprainfectată cu *Acinetobacter haemolyticus* și *Stenotrophomonas maltophilia* deget IV picior stâng cu extindere osoasă și 5 cazuri de herpes zoster. Deși conform Winthrop et al. (8) care au elaborat o listă cu infecții oportuniste la pacienții

cu boli inflamatorii sistemice în tratament cu terapie biologică pentru a exista un consens în raportarea acestora în cadrul studiilor clinice și a supravegherii postmarketing, infecții cu germeni precum cei mai sus amintiți nu intră în categoria infecțiilor oportuniste consider importantă menționarea acestora în această categorie având în vedere faptul că niciuna dintre paciente nu aveau patologii asociate care să justifice acest tip de infecții.

Rata incidenței infecțiilor oportuniste nonTB a fost de 11.75 la 1000 pacienți-ani, de aproape 10 ori mai mare față de cea raportată în cele mai recente studii (9). Această diferență este justificată pe de o parte de metodologia de studiu diferită (raportarea evenimentelor adverse și colectarea datelor), dar și de modul de încadrare al infecțiilor oportuniste. În plus, nu putem omite nicio posibilă scădere a incidenței cazurilor de herpes zoster ca urmare a vaccinării pacienților cu imunodepresie cu vaccin zosterian conform recomandărilor EULAR.

Rata incidenței TBC de 3.3 cazuri noi la 1000 pacienți-ani, de 4.45 ori mai mare decât în populația generală și de 5 ori mai mare față de pacienții cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți antiTNF din zone cu endemicitate scăzută a tuberculozei (de exemplu Marea Britanie) (9), dar comparativ egală cu cea din zone cu endemicitate crescută. Analiza datelor din registrul brazilian de monitorizare a terapiilor biologice în bolile reumatice (10) a identificat o incidență a tuberculozei de 1.01/1000 pacienți-ani în grupul control și de 2.87 în rândul utilizatorilor de agenți antiTNF- α .

Toate cazurile identificate de TBC în urma analizei registrelor medicale ale pacienților au fost la pacienți aflați în tratament cu agenți antiTNF ceea ce corespunde cu datele din literatură care au identificat un risc semnificativ scăzut de tuberculoză la pacienții în tratament cu rituximab comparativ cu agenții antiTNF- α (9).

În plus, mai mult de jumătate dintre cazuri (67%), au fost cazuri de tuberculoză extrapulmonară.

Rata incidenței infecțiilor intercurrente a fost de 166.31 la 1000 pacienți-ani. Pe durata studiului au fost identificate 99 episoade infecțioase intercurrente, cel mai frecvent infecții acute de tract respirator superior (IACRS) (33%), infecții de tract urinar (26%) și infecții ORL (16%).

Deoarece colectarea datelor s-a efectuat retrospectiv trebuie subliniat riscul omiterii unor astfel de episoade intercurrente, pacienții raportând periodic aceste infecții.

Datele din literatura de specialitate sunt extrem de limitate în ceea ce privește riscul general de infecții la pacienții cu afecțiuni inflamatorii sistemice în tratament cu agenți biologici.

O meta-analiză efectuată de Zhigao Xu et al. (11) nu a identificat diferențe în ratele de infecții generale la pacienții cu spondilartrită în tratament cu biologici și cei în tratament cu placebo și nici nu a fost observată vreo diferență a ratei de infecții în funcție de terapia de fond. Acest aspect poate numărul redus de studii viziavi de rata infecțiilor intercurrente la această categorie de pacienți.

Printre *factorii de risc pentru apariția unui episod infecțios intercurrent* pe durata terapiei biologice au fost identificați:

- terapia biologică prelungită ($p = 0.005$, $r = -0.163$)
- istoric de terapie biologică anterioară ($p = 0.009$, $OR = 2.04$) – acești pacienți prezentând un risc de două ori mai mare de a prezenta un eveniment infecțios intercurrent
- diabetul zaharat ($p = 0.032$)
- scor de activitate DAS28(VSH) mărit la inițierea terapiei biologice (pentru pacienții cu poliartrită reumatoidă)

Alte variabile precum vârsta, IMC, boala de fond sau prezența altor comorbidități nu au fost identificate ca factori de risc pentru apariția evenimentelor intercurrente infecțioase.

Variabile precum diabetul zaharat și valoarea scorului DAS28 crescută la inițierea terapiei biologice au fost identificate în studii ca factori de risc pentru apariția de infecții severe. Un studiu efectuat de Emery et al. (12) a arătat că o pentru fiecare creștere a scorului DAS28 cu o unitate s-a observat o creștere cu 27% a ratei infecțiilor severe.

Experiența Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” privind complicațiile infecțioase apărute la pacienții cu afecțiuni reumatice aflați în tratament cu agenți biologici

Studiul de față își propune să determine:

- severitatea și particularitățile episoadelor infecțioase ce necesită internare și investigații în clinica de boli infecțioase

- evoluția pacienților cu boli reumatice în tratament cu agenți biologici ce necesită internare într-o secție de boli infecțioase
- caracteristici clinice și de laborator ale pacienților în tratament cu agenți biologici care dezvoltă tuberculoză pe parcursul terapiei

Rezultate

În intervalul studiat au fost identificați 37 de pacienți cu afecțiuni reumatice (PR, SA sau AP) în tratament cu agenți biologici internați în clinica INBIMB pentru o patologie de natură infecțioasă.

Dintre pacienții internați în clinica noastră 11 (30%) sufereau de infecții oportuniste (9 cazuri tuberculoză, 1 caz herpes zoster, 1 caz encefalită herpetică).

Dintre cei 37 de pacienți cu afecțiuni reumatice internați în clinica noastră în intervalul studiat, 25 (67.6%) erau femei și 12 (32.4%) bărbați. Referitor la patologia de fond 21 (56.8%) pacienți erau diagnosticați cu PR, 8 (21.6%) cu SA și 8 (21.6%) cu AP.

Cei mai mulți dintre pacienții se aflau în tratament cu adalimumab (14, 37.8%), urmat de rituximab, etanercept, infliximab în proporții egale (7, 18.9%) și 2 (5.4%) pacienți erau în tratament cu tocilizumab. Doar 6 (16.2%) dintre pacienți prezentau printre comorbidități DZ.

Pacienții au avut vârsta medie de 56.95 ± 16.73 și au avut o perioadă de spitalizare cu mediana de 9 zile (IQR 6 – 21).

Nu s-a putut calcula durata terapiei biologice în rândul pacienților din lipsa datelor complete.

Dintre cele 7 cazuri de pneumonie acută, doar la un caz a fost identificat agentul etiologic și anume *Coxiella burnetii*, și un singur pacient prezenta factori de risc predispozanți pentru infecții pulmonare repetate și anume bronșiectazii.

Aproape un sfert (24%) dintre pacienții cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici internați în clinica noastră în intervalul studiat prezentau infecție cu micobacterii. Dintre cele 9 cazuri de infecție doar un singur pacient (11%) a prezentat afectare exclusiv pulmonară, 4 pacienți (44.5%) au prezentat afectare pulmonară și extrapulmonară (peritonită, afectare hepatică, splenică sau renală), iar 4 (44.5%) au prezentat afectare strict extrapulmonară (două cazuri de tuberculoză sistemică, un caz tuberculoză renală și un caz meningită TBC cu tuberculoame cerebrale). Niciunul dintre pacienții cu afectare pulmonară nu a prezentat aspect

de cavernă TBC. Au existat 2 cazuri de determinări cerebrale (tuberculoame), unul dintre cazuri prezentând și meningită TBC. În ambele cazuri diagnosticul final s-a stabilit prin biopsie cerebrală.

Pacienții primeau terapie biologică în medie de 30.83 ± 21.17 luni, pentru 4 dintre pacienți nu se cunoaște durata terapiei biologice. Referitor la terapia biologică de fond, 5 (56%) dintre acești pacienți erau în tratament cu adalimumab, 2 (22%) în tratament cu infliximab și câte un pacient în tratament cu rituximab și etanercept, reprezentând fiecare 11%. Se observă că mai mult de 2/3 dintre pacienți se aflau în tratament cu anticorpi monoclonali anti-TNF ($p = 0.248$).

Marea majoritate a pacienților (78%) prezentau un istoric de boală actual de cel puțin 3 săptămâni și toți pacienții au asociat sindrom febril. Dintre cei 9 pacienți care au fost internați în clinica noastră 7 (78%) fuseseră internați anterior în alt serviciu medical și tot atâția primiseră tratament antibiotic fără răspuns favorabil.

De menționat că dintre cei 9 pacienți diagnosticați cu tuberculoză pentru 33% dintre ei diagnosticul a reprezentat un diagnostic de excludere stabilit prin probă terapeutică și anume:

- două cazuri de tuberculoză sistemică, un pacient cu AP în tratament cu adalimumab și unul cu PR în tratament cu rituximab, cu sindrom febril prelungit, fără răspuns la tratament antibiotic și antifungic cu spectru larg, dar cu răspuns favorabil după instituirea terapiei anti-tuberculoase
- un caz de tuberculoză renală la o pacientă tânără, 26 ani, cu PR în tratament cu rituximab, cu piurie importantă și sindrom febril prelungit, neresponsive la tratament antibiotic și antifungic cu spectru larg, dar cu răspuns favorabil după instituirea terapiei anti-tuberculoase.

Pentru restul pacienților diagnosticul de tuberculoză s-a stabilit prin detectarea *Mycobacterium tuberculosis* prin PCR GeneXpert MTB/RIF din lichidul de lavaj bronhoalveolar (LBA) sau din lichidul cefalo-rahidian (LCR). Niciunul dintre pacienții la care s-a efectuat bronhoscopie și au avut rezultat pozitiv pentru *Mycobacterium tuberculosis* din LBA prin tehnici moleculare nu a prezentat rezultat pozitiv la examinarea frotiului Ziehl-Neelsen (ZN). Cei 2 pacienți la care s-a stabilit diagnosticul de tuberculoză sistemică în urma probei terapeutice au prezentat hemoculturi negative pentru BK, dar și PCR nedetectabil de *Mycobacterium tuberculosis* din LBA.

Referitor la screeningul anterior inițierii terapiei biologice pentru diagnosticarea tuberculozei latente se cunosc date doar pentru 2 pacienți. Ambii fuseseră diagnosticați cu

tuberculoză latentă prin testare QuantiferonTB Gold și primiseră tratament cu izoniazidă 9 luni. Mai mult, dintre cei 9 pacienți diagnosticați cu tuberculoză 4 au beneficiat de testare QuantiferonTB Gold pe parcursul investigațiilor, iar 2 dintre ei au avut rezultat pozitiv, în schimb un pacient a prezentat rezultat indeterminat, iar unul a prezentat rezultat negativ. De asemenea, trebuie menționat că pentru unul dintre acești pacienți diagnosticul de tuberculoză a fost stabilit prin probă terapeutică, nereușindu-se izolarea *Mycobacterium tuberculosis*.

Analiza datelor de laborator la pacienții cu tuberculoză au fost comparate cu cele ale pacienților cu terapie biologică urmăriți în cadrul studiului anterior, dar și cu ale pacienților din lotul control. Deoarece pe durata urmăririi în studiu nu s-au înregistrat modificări semnificative ale parametrilor de laborator de la o vizită la alta am ales să utilizez în această analiză datele înregistrate la vizita 1.

Pacienții internați în INBIMB cu tuberculoză au prezentat o mediană a numărului total de leucocite de $8.7 * 10^3/\mu\text{L}$ (IQR: 5.76 – 12.45), pacienții cu terapie biologică dar fără tuberculoză $7.2 * 10^3/\mu\text{L}$ (IQR: 5.77 – 8.15), iar lotul control $6.2 * 10^3/\mu\text{L}$ (IQR: 5.22 – 7.43), fără diferență semnificativă statistic între pacienții cu terapie biologică cu sau fără tuberculoză ($p = 0.11$).

Se observă o că valorile absolute ale limfocitelor în rândul pacienților internați în INBIMB cu tuberculoză sunt semnificativ statistic mai scăzute decât valorile pacienților cu terapie biologică fără tuberculoză ($p = 0.02$), dar și față de valorile subiecților sănătoși ($p = 0.001$). În plus, raportul monocitelor/limfocite este semnificativ statistic mai crescut la pacienții internați cu tuberculoză față de celelalte două categorii studiate ($p < 0.001$, respectiv $p < 0.001$), însă nu există diferență a acestui raport între pacienții în tratament cu agenți biologici fără tuberculoză și subiecții sănătoși ($U = 664$, $p = 0.38$).

Pacienții cu un raport monocite/limfocite $> 25\%$ au o probabilitate de 2.17 ori mai mare să prezinte tuberculoză (**Chi(1) = 8.6, p = 0.03, OR = 2.17, IC95% = 1.53 – 3.08**) comparativ cu pacienții aflați în tratament cu agenți biologici dar fără tuberculoză.

Analiza datelor de laborator a mai arătat de asemenea valori scăzute la determinarea procalcitoninei, cu excepția pacientei cu sepsis cu *Pseudomonas* care a prezentat o valoare foarte crescută de 123.84 ng/ml. Restul pacienților la care s-a efectuat determinarea procalcitoninei au avut o mediană de 0.11 ng/ml (IQR: 0.07 – 0.43).

8.4. Discuții

Dintre pacienții internați în clinica noastră 11 (30%) au fost diagnosticați cu infecții oportuniste (9 cazuri tuberculoză, 1 caz herpes zoster, 1 caz encefalită herpetică). Comparând datele acestor pacienți cu restul pacienților internați în clinica noastră în intervalul studiat rezultatele arată că AP poate reprezenta un factor de risc pentru apariția de infecții severe pe durata terapiei biologice ($p = 0.035$). Deși riscul de infecții asociat terapiei biologice este deja bine stabilit până la ora acutală nu am identificat studii care să evalueze acest risc în funcție de patologia de fond.

Dintre cele 9 cazuri de infecție cu micobacterii doar un singur pacient (11%) a prezentat afectare exclusiv pulmonară, 4 pacienți (44.5%) au prezentat afectare pulmonară și extrapulmonară, iar 4 (44.5%) au prezentat afectare strict extrapulmonară. Într-adevăr, Tauseef et al. (13) într-un review de literatură notează că $\geq 50\%$ dintre cazurile de tuberculoză asociate utilizării agenților antiTNF reprezintă afectare extrapulmonară și/sau infecție diseminată.

Un studiu realizat de Lim et al. (14) a identificat vârsta > 65 ani ca factor de risc pentru apariția tuberculozei pe durata terapiei, factor ce nu este însă confirmat de analiza cazurilor din clinica noastră.

Dintre pacienții care au fost diagnosticați cu tuberculoză 78% erau în tratament cu anticorpi monoclonali antiTNF. Într-adevăr, studiile (15, 16) au arătat riscul de a dezvolta tuberculoză este mai mare la pacienții în tratament cu anticorpi monoclonali antiTNF față de pacienții în tratament cu receptori solubili TNF. Referitor la riscul de dezvolta tuberculoză pe durata terapiei cu molecule antiCD20 (rituximab) riscul este semnificativ mai scăzut comparativ cu medicația antiTNF, 12 cazuri/100 000 ani-pacienți comparativ cu 65 cazuri/100 000 ani-pacienți (9).

Un studiu realizat de La Manna et al. (17) a arătat că pacienții cu tuberculoză pulmonară activă au prezentat un raport crescut monocite/limfocite (M/L) comparativ cu subiecții sănătoși sau cu pacienții cu tuberculoză latentă ($p < 0.0001$), neexistând diferențe semnificative statistice între raportul M/L la subiecții sănătoși, pacienții cu tuberculoză latentă și pacienții cu tuberculoză vindecată. Acest raport este modificat atât prin creșterea numărului absolut de monocite cât și scăderea numărului total de limfocite. În plus, analiza a arătat că raportul M/L scade aproape de valorile normale după terapie anti-tuberculoasă. Aceste date, i-au determinat pe autori să concluzioneze că acest raport poate fi utilizat ca instrument în monitorizarea

răspunsului la tratament. Aceeași concluzie a fost formulată și de Agarwal et al. (18) în urma studiului efectuat la pacienți cu tuberculoză osteoarticulară.

Datele de laborator au arătat valori scăzute ale procalcitoninei la pacienții diagnosticați cu tuberculoză. Ugajin et al. (19) evaluând 102 pacienți cu tuberculoză pulmonară au raportat o medie a valorilor procalcitoninei la acești pacienți de 0.21 ± 0.49 , semnificativ statistică mai scăzută decât în rândul pacienților cu pneumonie acută. În schimb, și acest studiu, dar și altele (20, 21) au concluzionat că o valoare crescută a procalcitoninei la pacienții cu tuberculoză reprezintă un marker de prognostic nefavorabil.

Se poate contura astfel un ***profil al pacientului cu boli reumatice în tratament cu agenți biologici și suspiciune înaltă de infecție cu micobacterii:***

- sindrom febril prelungit (durata peste 3 săptămâni) neresponsiv la tratament antibiotic cu spectru larg
- limfopenie și/sau raport monocite/limfocite crescut peste 25%
- procalcitonină sub valoarea de 2 ng/ml
- tratament cu agenți antiTNF, în special anticorpi monoclonali antiTNF

Mai mult, studiul de față a arătat de asemenea că pacienții cu artrită psoriazică asociază un risc mai mare de apariție a tuberculozei comparativ cu pacienții cu PR sau SA, însă această corelație necesită confirmare ulterioară în studii extinse.

Diagnosticul de infecție cu *Mycobacterium tuberculosis* a fost stabilit prin tehnici moleculare, precum GeneXpert MTB/RIF din LBA sau LCR, niciunul dintre acești pacienți nu a prezentat un rezultat pozitiv la examinarea directă (frotiu ZN). Se confirmă astfel, încă o dată, importanța și utilitatea tehnicilor moleculare în stabilirea diagnosticului de tuberculoză, beneficiind totodată de identificarea rapidă a tulpinilor cu rezistență la rifampicină.

În ceea ce privește screeningul anterior inițierii terapiei biologice pentru diagnosticarea tuberculozei latente se cunosc date doar pentru 2 pacienți. Ambii fuseseră diagnosticați cu tuberculoză latentă prin testare QuantiferonTB Gold și primiseră tratament cu izoniazidă 9 luni. Dezvoltarea tuberculozei la acești pacienți poate avea două explicații, și anume:

1. eșec terapeutic - monoterapia cu izoniazidă asigură o protecție în proporție de 60 – 90% pe o durată de aproximativ 10 – 15 ani (22) și poate ajunge până la 93% la cei cu complianță foarte bună la tratament.

2. infecție latentă cu *M. tuberculosis* cu rezistență la izoniazidă, situație în care se recomandă tratamentul cu rifampicină în monoterapie (22). În România, un studiu realizat de Florea et al. (23) din 63 de tulpini de *M. tuberculosis* testate, 22 (35%) aveau rezistență la izoniazidă și rifampicină.

Astfel, se ridică întrebarea dacă în România, țară cu incidență crescută a tuberculozei și cu rate de rezistență la tratament înalte, este suficient tratamentul cu izoniazidă în monoterapie a infecției latente TB sau este necesară o nouă abordare.

Mai mult, dintre cei 9 pacienți diagnosticați cu tuberculoză 4 au beneficiat de testare QuantiferonTB Gold pe parcursul investigațiilor, iar 2 dintre ei au avut rezultat pozitiv, în schimb un pacient a prezentat rezultat indeterminat, iar unul a prezentat rezultat negativ. În plus, trebuie menționat că pentru unul dintre acești pacienți diagnosticul de tuberculoză a fost stabilit prin probă terapeutică, nereușindu-se izolarea *Mycobacterium tuberculosis*.

În acest context, nu trebuie pierdut din vedere faptul că terapia biologică poate scădea numărul de limfocite CD4 reactive față de TB și implicit scăderea producției de IFN (24) ceea ce poate conduce la un rezultat negativ al QuantiferonTB în ciuda unei tuberculoze active. De asemenea, trebuie luată în considerare la această categorie de pacienții și infecții cu micobacterii nontuberculoase, cel mai frecvent fiind raportate infecții cu *Mycobacterium avium complex* (25), situație în care stabilirea diagnosticului poate fi mult întârziată.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Lucrarea de față se compune din 3 studii observaționale: unul prospectiv, unul retrospectiv și unul transversal.

Studiile au urmărit pacienții prospectiv pe o durată de 53 persoane-ani și retrospectiv pentru o durată de 595.25 persoane-ani.

Incidența infecțiilor intercurrente la pacienții cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici a fost de 166.31 la 1000 pacienți-ani, cel mai frecvent fiind vorba de IACRS (33%), urmate de ITU (26%) și infecții în sfera ORL (17%).

Episoadele infecțioase intercurrente au apărut în proporție de 19% în primii 2 ani de la debutul terapiei biologice. Cele mai multe infecții au fost raportate la pacienții sub tratament cu etanercept (34%) cu o rată a incidenței de 239.43 de cazuri la 1000 pacienți-ani. Mediana

timpului scurs de la inițierea terapiei cu etanercept și până la apariția evenimentului infecțios a fost de 61.5 luni (IQR: 35 - 86).

Au fost identificați următorii **factori de risc** pentru apariția unui episod infecțios:

- terapia biologică prelungită sau istoric de terapie biologică anterioară
- prezența diabetului zaharat
- utilizarea etanercept ca schemă terapeutică – există un risc de 1.8 mai mare de a dezvolta un eveniment infecțios intercurrent pe durata terapiei comparativ cu celelalte molecule investigate pe durata studiului
- scor de activitate DAS28(VSH) mai crescut la inițierea terapiei biologice (pentru pacienții cu poliartrită reumatoidă)

Alte variabile precum vârsta, IMC, boala de fond sau prezența altor comorbidități nu au fost identificate ca factori de risc pentru apariția evenimentelor intercurrente infecțioase.

Incidența infecțiilor oportuniste nonTB la pacienții cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici a fost de 11.75 la 1000 pacienți-ani, cel mai frecvent fiind vorba de herpes zoster.

Incidența tuberculozei a fost de 3.3 cazuri noi la 1000 pacienți-ani. Pacienții au un risc de 4.45 ori mai mare de a dezvolta tuberculoză față de populația generală din România (aici fiind incluși și pacienții cu infecție HIV) și de 5 ori mai mare față de pacienții cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți antiTNF din zone cu endemicitate scăzută a tuberculozei (de exemplu Marea Britanie), dar comparativ egală cu cea din zone cu endemicitate crescută (de exemplu Brazilia).

Toate cazurile identificate de tuberculoză prin analiza registrelor pacienților au fost la pacienți ce se aflau în tratament cu agenți antiTNF. Peste jumătate (67%) dintre aceste cazuri sunt reprezentate de afectări extrapulmonare. Se confirmă astfel riscul mai crescut de apariție a tuberculozei la pacienții în tratament cu agenți antiTNF comparativ cu pacienții în tratament cu agenți antiCD20.

Analiza detaliată a cazurilor de tuberculoză la pacienții cu afecțiuni reumatice în tratament cu agenți biologici internați în cadrul Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” a permis conturarea unui ***profil de pacient cu index înalt de suspiciune clinică pentru infecția cu micobacterii***:

- sindrom febril prelungit (durata peste 3 săptămâni) neresponsiv la tratament antibiotic cu spectru larg
- limfopenie și/sau raport monocite/limfocite crescut peste 25%
- procalcitonină sub valoarea de 2 ng/ml
- tratament cu agenți antiTNF, în special anticorpi monoclonali antiTNF

Mai mult, studiul de față a arătat de asemenea că pacienții cu artrită psoriazică asociază un risc mai mare de apariție a tuberculozei comparativ cu pacienții cu PR sau SA, însă această corelație necesită confirmare ulterioară în studii extinse.

Deși 8 din cei 9 pacienți identificați cu tuberculoză se aflau în tratament cu agenți antiTNF nu s-a identificat o corelație statistică cel mai probabil dat fiind numărului scăzut de cazuri. De asemenea vârsta înaintată a pacientului nu a reprezentat factor de risc suplimentar pentru apariția tuberculozei.

În plus, din analiza acestor cazuri se poate concluziona că:

- mai mult de 50% dintre cazuri reprezintă afectare strict extrapulmonară sau tuberculoză diseminată
- tratamentul tuberculozei latente cu izoniazidă nu oferă protecție absolută împotriva unei reactivări TB pe durata terapiei
- deoarece terapia biologică poate scădea numărul de limfocite CD4+ reactive față de TB și implicit scăderea producției de IFN ne putem confrunța cu un rezultat negativ al QuantiferonTB în ciuda unei tuberculoze active
- nu trebuie pierdut din vedere la acești pacienți nici posibilitatea unei infecții cu micobacterii, altele decât *Mycobacterium tuberculosis*
- importanța diagnosticului de tuberculoză prin tehnici moleculare.

De asemenea, studiul de față a mai arătat că:

- mai mult de jumătate (52.95%) dintre pacienții cu boli reumatice în tratament cu agenți biologici au avut un IMC peste 25%, aproximativ egal cu populația generală, însă cu un procent aproape dublu de pacienți obezi comparativ cu populația generală, 15.15% respectiv 9.4%.
- acești pacienți necesită o evaluare atentă și consiliere nutrițională pentru a înlătura un posibil factor de risc suplimentar pentru apariția de infecții și/sau evoluție nefavorabilă a acestora.
- peste 60% dintre pacienți asociau cel puțin o comorbiditate, cel mai frecvent fiind vorba de afecțiuni cardio-vasculare.

- aproximativ 30% dintre pacienți suferiseră în antecedente cel puțin o intervenție chirurgicală, cel mai frecvent în legătură directă cu boala de fond (sinovectomii sau protezări articulare).
- aproape jumătate (48%) dintre pacienții urmăriți aveau un istoric de utilizare a cel puțin unui alt agent biologic decât cel actual. Principalul motiv pentru schimbarea terapiei biologice a fost lipsa de răspuns secundar la terapie (61.9%), doar în 2.4% din cazuri motivul a fost reprezentat de apariția unui eveniment infecțios
- femeile au un risc de 3.11 ori mai mare decât bărbații să necesite schimbarea terapiei biologice, de asemenea pacienții cu PR, cu istoric prelungit de boală, cu tratamente biologice de lungă durată au un risc mai mare de a necesita schimbarea a cel puțin un agent biologic de-a lungul vieții
- mai mult de un sfert (26.8%) dintre pacienții evaluați prezentau dovada trecerii prin infecția VHB, iar 22 (34.8%) nu prezentau anticorpi protectori. Pacienții cu vârsta peste 60 ani au un risc mai mare de a prezenta dovada trecerii printr-o infecție VHB.
- mai mult de jumătate dintre pacienți (58%) nu prezintă dovada vaccinării antiVHB sau dovada trecerii prin boală, acest lot de pacienți putând beneficia de vaccinarea antiVHB.
- prevalența infecției cronice VHB, obiectivată prin prezența AgHBs, a fost de 1.1% în lotul de studiu, toți fiind în tratament antiviral cu entecavir și cu ADN -VHB nedetectabil la momentul înregistrării datelor
- niciun pacient ce a prezentat dovada trecerii printr-o infecție VHB nu a experimentat reactivarea hepatitei VHB pe durata studiului
- în lotul studiat prevalența tuberculozei latente a fost de 24.1%, pentru 83% dintre ei diagnosticul a fost stabilit utilizându-se QuantiferonTB Gold.
- persoanele de sex masculin au un risc de 1.6 ori mai mare să prezinte tuberculoză latentă. Nu au fost identificați alți factori de risc pentru infecția TB latentă (vârsta, consumul de tutun, boala de fond, alte comorbidități etc).
- referitor la dinamica numărului de neutrofile și limfocite CD4+, CD8+, CD3+ pe parcursul terapiei biologice nu au fost identificate modificări semnificative. De asemenea, nu au fost determinate diferențe semnificative statistic între media valorilor CD4+, CD8+ și CD3+ sau a raportului CD4+/CD8+ în funcție de terapia de fond.

- niciun pacient nu a prezentat hemoculturi pozitive pe durata studiului, astfel putem aprecia că riscul de a dezvolta bacteriemii spontane prin translocăție bacteriană de la nivel intestinal pe durata terapiei biologice este probabil extrem de scăzut.
- toate tulpinile de *S. aureus* izolate din portaj nazal/faringian la acești pacienți erau metilicilino-rezistente, cu test de rezistență inductibilă la clindamicină pozitiv, însă toate tulpinile prezentau sensibilitate la fluorochinolone, rifampicină, trimetoprim-sulfametoxazol și acid fusidic. Toți pacienții cu portaje pozitive se aflau în tratament cu agenți antiTNF.
- având în vedere procentul crescut de intervenții chirurgicale în rândul pacienților cu afecțiuni reumatice, în principal fiind vorba de protezări articulare, consider extrem de importantă determinarea portajului nazal și/sau faringian la această categorie de pacienți și decontaminare riguroasă muco-cutanată anterior oricărei manevre invazive.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Wenham C, Gadsby K, Deighton C. Three significant cases of neutropenia with etanercept. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(3):376-7.
2. Hastings R, Ding T, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Moots RJ, et al. Neutropenia in patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(6):764-9.
3. Dulic S, Vasarhelyi Z, Sava F, Berta L, Szalay B, Toldi G, et al. T-Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients on Long-Term Anti-TNF or IL-6 Receptor Blocker Therapy. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:6894374.
4. Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L, et al. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*. 2017.
5. Mori S, Fujiyama S. Hepatitis B virus reactivation associated with antirheumatic therapy: Risk and prophylaxis recommendations. *World J Gastroenterol*. 2015;21(36):10274-89.
6. Anolik JH, Ravikumar R, Barnard J, Owen T, Almudevar A, Milner EC, et al. Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks. *J Immunol*. 2008;180(2):688-92.
7. Garcia-Lagunar MH, Gutierrez-Civicos MR, Garcia-Simon MS, Conesa-Zamora P, Jimenez-Santos E, Cano-Vivar P, et al. Reasons for Discontinuation and Adverse Effects of TNFalpha Inhibitors in a Cohort of Patients With Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis. *Ann Pharmacother*. 2017;51(5):388-93.
8. Winthrop KL, Novosad SA, Baddley JW, Calabrese L, Chiller T, Polgreen P, et al. Opportunistic infections and biologic therapies in immune-mediated inflammatory diseases: consensus recommendations for infection reporting during clinical trials and postmarketing surveillance. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(12):2107-16.
9. Rutherford AI, Patarata E, Subesinghe S, Hyrich KL, Galloway JB. Opportunistic infections in rheumatoid arthritis patients exposed to biologic therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2018.

10. Yonekura CL, Oliveira RDR, Titton DC, Ranza R, Ranzolin A, Hayata AL, et al. Incidence of tuberculosis among patients with rheumatoid arthritis using TNF blockers in Brazil: data from the Brazilian Registry of Biological Therapies in Rheumatic Diseases (Registro Brasileiro de Monitoracao de Terapias Biologicas - BiobadaBrasil). *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 2017;57 Suppl 2:477-83.
11. Xu Z, Xu P, Fan W, Yang G, Wang J, Cheng Q, et al. Risk of infection in patients with spondyloarthritis and ankylosing spondylitis receiving antitumor necrosis factor therapy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp Ther Med.* 2017;14(4):3491-500.
12. Emery P, Gallo G, Boyd H, Morgan CL, Currie CJ, Poole CD, et al. Association between disease activity and risk of serious infections in subjects with rheumatoid arthritis treated with etanercept or disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;32(5):653-60.
13. Ali T, Kaitha S, Mahmood S, Ftesi A, Stone J, Bronze MS. Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. *Drug Healthc Patient Saf.* 2013;5:79-99.
14. Lim CH, Chen HH, Chen YH, Chen DY, Huang WN, Tsai JJ, et al. The risk of tuberculosis disease in rheumatoid arthritis patients on biologics and targeted therapy: A 15-year real world experience in Taiwan. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178035.
15. Fallahi-Sichani M, Flynn JL, Linderman JJ, Kirschner DE. Differential risk of tuberculosis reactivation among anti-TNF therapies is due to drug binding kinetics and permeability. *J Immunol.* 2012;188(7):3169-78.
16. Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Breban M, et al. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis Rheum.* 2009;60(7):1884-94.
17. La Manna MP, Orlando V, Dieli F, Di Carlo P, Cascio A, Cuzzi G, et al. Quantitative and qualitative profiles of circulating monocytes may help identifying tuberculosis infection and disease stages. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171358.
18. Agarwal A, Bhat MS, Kumar A, Shaharyar A, Mishra M, Yadav R. Lymphocyte/monocyte ratio in osteoarticular tuberculosis in children: a haematological biomarker revisited. *Trop Doct.* 2016;46(2):73-7.
19. Ugajin M, Miwa S, Shirai M, Ohba H, Eifuku T, Nakamura H, et al. Usefulness of serum procalcitonin levels in pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J.* 2011;37(2):371-5.
20. Rasmussen TA, Sogaard OS, Camara C, Andersen PL, Wejse C. Serum procalcitonin in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(2):251-6, i.
21. Huang CT, Lee LN, Ho CC, Shu CC, Ruan SY, Tsai YJ, et al. High serum levels of procalcitonin and soluble TREM-1 correlated with poor prognosis in pulmonary tuberculosis. *J Infect.* 2014;68(5):440-7.
22. Kim HW, Kim JS. Treatment of Latent Tuberculosis Infection and Its Clinical Efficacy. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2018;81(1):6-12.
23. Florea D, Otelea D, Olaru ID, Hristea A. Broad-range PCR coupled with mass-spectrometry for the detection of Mycobacterium tuberculosis drug resistance. *Germs.* 2016;6(1):10-3.
24. Saliu OY, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity. *J Infect Dis.* 2006;194(4):486-92.
25. Winthrop KL, Chang E, Yamashita S, Iademarco MF, LoBue PA. Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(10):1556-61.