



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF



Nadia E. Aikawa^{a,b,*}, Daniela T.A. Rosa^{c,d}, Gilda M.B. Del Negro^{c,d}, Julio C.B. Moraes^b, Ana C.M. Ribeiro^b, Carla Gonçalves Saad^b, Clovis A. Silva^{a,b} e Eloisa Bonfá^b

^a Universidade São Paulo, Faculdade de Medicina, Unidade de Reumatologia Pediátrica, São Paulo, SP, Brasil

^b Universidade São Paulo, Faculdade de Medicina, Disciplina de Reumatologia, São Paulo, SP, Brasil

^c Universidade São Paulo, Faculdade de Medicina, Laboratório de Micologia Médica (LIM 53), São Paulo, SP, Brasil

^d Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 18 de julho de 2014

Aceito em 1 de março de 2015

On-line em 1 de agosto de 2015

Palavras-chave:

Candidíase sistêmica

Candida spp.

Anti-TNF

Artrite reumatoide

Espandilite anquilosante

R E S U M O

Objetivo: Avaliar a prevalência de infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. e sua possível associação com dados demográficos, manifestações clínicas e laboratoriais e terapêutica em pacientes com doenças reumatológicas em uso de anti-TNF.

Métodos: Foram incluídos pacientes consecutivos com doenças reumatológicas em uso de agentes anti-TNF. Foram analisados os seguintes fatores de risco até quatro semanas antes do estudo: uso de antibioticoterapia, imunossupressores, hospitalização e procedimentos invasivos. Todos foram avaliados para queixas clínicas, coletaram hemocultura específica para fungos e amostras de sangue para pesquisa de *Candida* spp. por reação em cadeia de polimerase.

Resultados: Foram incluídos 194 pacientes [67 com artrite reumatoide (AR), 47 espondilite anquilosante (EA), 36 artrite idiopática juvenil (AIJ), 28 artrite psoriásica e 16 outros]. A média de idade era de 42 ± 16 anos, com 68 (35%) do sexo masculino e média de duração de doença de 15 ± 10 anos; 64 (33%) pacientes usavam adalimumabe, 59 (36%) etanercepte e 71 (36%) infliximabe; 81% faziam uso concomitante de imunossupressores. No momento do estudo, apenas um (0,5%) paciente apresentou infecção fúngica localizada (candidíase vaginal). Nenhum dos pacientes incluídos apresentou candidíase sistêmica com hemocultura positiva para fungos ou PCR positiva para *Candida* spp. em amostra de sangue periférico.

Conclusões: Este foi o primeiro estudo que avaliou prevalência de doença fúngica invasiva e localizada por *Candida* em um expressivo número de pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF e demonstrou baixo risco de candidíase, apesar da alta prevalência de uso de imunossupressores.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mails: nadia.aikawa@gmail.com, nadia.aikawa@hc.fm.usp.br (N.E. Aikawa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.03.010>

0482-5004/© 2015 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Systemic and localized infection by *Candida* species in patients with rheumatic diseases receiving anti-TNF therapy

A B S T R A C T

Keywords:

Systemic candidiasis
Candida spp.
Anti-TNF
Rheumatoid arthritis
Ankylosing spondylitis

Objective: To evaluate the prevalence of systemic and localized infection by *Candida* species and its possible association with demographic, clinical and laboratory manifestations and therapy in patients with rheumatic diseases taking TNF blockers.

Methods: Consecutive patients with rheumatic diseases receiving anti-TNF agents were included. The following risk factors up to four weeks prior to the study were analyzed: use of antibiotics, immunosuppressant drugs, hospitalization and invasive procedures. All subjects were evaluated for clinical complaints, specific blood cultures were obtained for fungi and blood samples were collected for *Candida* spp. detection by polymerase chain reaction.

Results: 194 patients [67 with rheumatoid arthritis (RA), 47 with ankylosing spondylitis (AS), 36 with juvenile idiopathic arthritis (JIA), 28 with psoriatic arthritis and 16 with other conditions] were included. The average age of patients was 42 ± 16 years, with 68 (35%) male and mean disease duration of 15 ± 10 years. Sixty-four (33%) patients were receiving adalimumab, 59 (30%) etanercept and 71 (36%) infliximab. Eighty-one percent of patients were concomitantly taking immunosuppressants drugs. At the time of the study, only one (0.5%) patient had localized fungal infection (vaginal candidiasis). None of the patients included had systemic candidiasis with positive blood cultures for fungi or PCR positive for *Candida* spp. in peripheral blood sample.

Conclusions: This was the first study to assess the prevalence of invasive and localized fungal disease by candida in a significant number of patients with rheumatic diseases on anti-TNF therapy, and demonstrated low risk of candidiasis, despite the high prevalence of immunosuppressive drug use.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A terapia anti-TNF tem sido amplamente empregada em pacientes com doenças reumatológicas não responsivos a drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs), com melhoria expressiva no prognóstico. Entretanto, concomitantemente, emergem preocupações relacionadas à imunossupressão decorrente de tal terapia, que torna crescentes os relatos de infecções por agentes oportunistas fúngicos, como a *Candida* spp.¹

Esse fungo pode causar uma variedade de apresentações clínicas, incluindo desde um comprometimento limitado ao tecido mucocutâneo a infecções invasivas extremamente graves. A candidíase sistêmica afeta principalmente pacientes submetidos a drogas imunossupressoras, incluindo glicocorticoides, antibioticoterapia de amplo espectro e procedimentos invasivos, com altos índices de mortalidade.²⁻⁵

Candidemia já foi previamente relatada em pequenas séries de pacientes sob terapia biológica com anti-TNF, porém uma clara relação causal ainda não foi estabelecida.^{6,7} Além disso, há raros relatos de infecção sistêmica por *Candida* spp. em pacientes com doenças reumatológicas.^{8,9}

O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de candidíase sistêmica e localizada e sua possível associação com dados demográficos, manifestações clínicas e laboratoriais e terapêutica em pacientes com doenças reumatológicas em uso de agentes anti-TNF.

Materiais e métodos

Foram avaliados pacientes consecutivos com diagnósticos de artrite reumatoide (AR),¹⁰ espondilite anquilosante (EA)¹¹ artrite psoriásica (APs),¹² artrite idiopática juvenil¹³ e outros (doença de Behçet, doença de Crohn, artrite reativa, doença de Still, uveíte idiopática e arterite de Takayasu) acompanhados regularmente no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Todos os pacientes estavam em tratamento com agentes anti-TNF (adalimumabe, etanercepte ou infliximabe) no Centro de Dispensação de Medicamentos de Alta Complexidade (Cedmac) e faziam uso concomitante de drogas modificadoras de doença (DMARDs).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética institucional e um consentimento informado foi obtido de todos os participantes.

Avaliação das doenças reumatológicas

A atividade de doença foi avaliada por meio de instrumentos padronizados, incluindo o Disease Activity Score (DAS28) para pacientes com AR¹⁴ e AIJ e Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (Basdai)¹⁵ para EA e APs.

Os parâmetros laboratoriais foram avaliados pela velocidade de hemossedimentação (VHS) de acordo com o método

de Westergreen (mm/1^a hora) e níveis de proteína C reativa por nefelometria (mg/L).

O tratamento atual concomitante ao anti-TNF com prednisona, DMARDs e imunossupressores (metotrexate, azatioprina, leflunomide, antimalárico, sulfassalazina e/ou ciclosporina) também foi avaliado.

Avaliação de candidíase e fatores de risco

Os pacientes foram avaliados clinicamente no dia da aplicação da terapia anti-TNF em relação a sinais e sintomas de infecção por *Candida* spp., incluindo monilíase oral, candidíase genital, disúria ou leucorreia característica. Foram analisados os seguintes fatores de risco até quatro semanas antes do estudo: uso de antibioticoterapia, imunossupressores, hospitalização e procedimentos invasivos.

1. **Cultura de sangue periférico para fungos:** A cultura de sangue para fungos na população em uso de agente anti-TNF foi feita com frascos com meio de cultura BD BACTEC™-MYCO/F Lytic Medium (Becton Dickinson, USA).
2. **PCR para *Candida* spp. no sangue periférico:** A detecção do DNA da *Candida* spp. foi feita por reação em cadeia da polimerase.¹⁶ A análise do material coletado foi feita no Laboratório de Investigação Médica em Micologia (LIM-53) do HC-FMUSP em pacientes submetidos à terapia anti-TNF-alfa.

As extrações de DNA das amostras de sangue total dos pacientes incluídos no estudo foram feitas de acordo com a técnica descrita por Loeffler et al.¹⁷ Foram coletadas amostras de 3 a 5 mL de sangue em um tubo com EDTA e submetidas a hemólise inicial com solução de NH₄Cl 1,55 M; KHCO₃ 100 mM; EDTA pH 7,4 10 mM. Após obtenção do *pellet* de células livres de hemácias, foram acrescentados 3 mL de solução com Tris-HCl pH 8,0 100 mM; NaCl 4 M; EDTA pH8,2 20 mM. A seguir, as amostras foram vigorosamente agitadas e foram adicionados 600 µL de solução com 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 250U/mL de liticase (L-4276, Sigma, USA) e 5% de β-mercaptoetanol. Os tubos foram mantidos a 37 °C por 2:30 horas e, após o período de incubação, a extração do DNA total foi feita com o QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, Germany), de acordo com o protocolo descrito pelo fornecedor.

Como controles positivos das reações de amplificação, amostras de DNA de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitanae* e *C. pelliculosa* foram obtidas.

Para amplificação do DNA extraído das amostras de sangue dos pacientes e das amostras da *Candida* spp. foi empregada a técnica de *nested*-PCR. Na primeira etapa de amplificação foram usados os *primers* ITS1 e ITS4 e a segunda etapa foi idealizada para dois sistemas de amplificação, com o uso de *primers* espécie-específicos: o sistema 1 composto por *primers* de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. lusitanae*; e o sistema 2, por *primers* de *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

A detecção dos amplificadores foi feita em géis de agarose a 2,5% submetidos a eletroforese em cubas horizontais Horizon H-58 (Life Technologies, EUA), em tampão TAE 1x (TRIS-ácido acético-EDTA pH 8,0), a 80V por 45 minutos. Após eletroforese, os géis foram corados com GelRed™ (Biotium, USA) e os

Tabela 1 – Dados demográficos e tratamento de pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF

Variáveis	n = 194
Dados demográficos	
Idade atual, anos	42 ± 16
Sexo masculino, n (%)	68 (35)
Etnia	
Branco, n (%)	165 (85)
Negro, n (%)	16 (8)
Pardo, n (%)	14 (7)
Amarelo, n (%)	2 (1)
Tempo de doença, anos	15 ± 10
Tempo de terapia anti-TNF, anos	1,9 ± 1,6
Tratamento	
Anti-TNF	
Adalimumabe, n (%)	64 (33)
Etanercepte, n (%)	59 (30)
Infliximabe, n (%)	71 (36)
Glicocorticoides, n (%)	96 (49)
Média de dose, mg/dia	7,8 ± 4,6
Metotrexate, n (%)	88 (45)
Média de dose, mg/semana	22,2 ± 8,6
Leflunomide, n (%)	46 (24)
Sulfassalazina, n (%)	24 (12)
Ciclosporina, n (%)	10 (5)
Azatioprina, n (%)	6 (3)
Cloroquina, n (%)	11 (6)
Os dados estão apresentados como número (%) ou média ± desvio padrão.	

resultados registrados em sistema de fotodocumentação (Uvitec, Inglaterra).¹⁸

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP) ou mediana (variação) para variáveis contínuas e porcentagem para variáveis categóricas.

Resultados

Entre os 194 pacientes incluídos, 67 apresentavam AR, 47 EA, 36 AIJ, 28 artrite psoriásica e 16 outros diagnósticos. A média de idade dos pacientes no momento do estudo era de 42 ± 16 anos, com 68 (35%) de sexo masculino, média de duração de doença de 15 ± 10 anos e média de tempo de uso de terapia anti-TNF de 1,9 ± 1,6 anos; 85% dos pacientes eram brancos, 8% negros, 7% pardos e 1% amarelo; 64 (33%) pacientes faziam uso de adalimumabe, 59 (30%) de etanercepte e 71 (36%) de infliximabe; 81% dos pacientes faziam uso concomitante de imunossupressores. Em relação às medicações concomitantes, 96 (49%) usavam prednisona, 88 (45%) metotrexate, 46 (24%) leflunomide, 24 (12%) sulfassalazina, 10 (5%) ciclosporina, seis (3%) azatioprina e 11 (6%) difosfato de cloroquina (tabela 1).

Entre pacientes com AR, a média de DAS28 era de 3,6 ± 1,5, HAQ de 1,1 ± 0,6, VHS 18 ± 16 mm/1^ah e PCR 10,1 ± 15,4 mg/L. Nos pacientes com EA, a média de BASDAI era de 3,2 ± 2,6, BASFI de 43 ± 32, ASQoL de 6,7 ± 5,4, VHS 8 ± 8 mm/1^ah e PCR 4,3 ± 5,2 mg/L. Entre os pacientes com AIJ, a média de DAS28

Tabela 2 – Parâmetros clínicos e laboratoriais da doença em pacientes reumatológicos em uso de terapia anti-TNF

Variáveis	
<i>Artrite reumatoide (n=67)</i>	
DAS28	3,6 ± 1,5
HAQ	1,1 ± 0,6
VHS, mm/1ª hora	18 ± 16
PCR, mg/L	10,1 ± 15,4
<i>Espondilite anquilosante (n=47)</i>	
BASDAI	3,2 ± 2,6
BASFI	43 ± 32
ASQoL	6,7 ± 5,4
VHS, mm/1ª hora	8 ± 8
PCR, mg/L	4,3 ± 5,2
<i>Artrite idiopática juvenil (n=36)</i>	
DAS28	3,4 ± 1,3
VHS, mm/1ª hora	15 ± 18
PCR, mg/L	19,5 ± 55,1
<i>Artrite psoriásica (n=28)</i>	
DAS28	2,5 ± 1,3
Basdai	3 ± 1,7
VHS, mm/1ª hora	10,3 ± 7,8
PCR, mg/L	4,2 ± 4,7

DAS28, Disease Activity Score 28; HAQ, Health Assessment Questionnaire; VHS, velocidade de hemossedimentação; PCR, proteína C reativa; Basdai, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; Basfi, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index.
Os dados estão apresentados como número (%) ou média ± desvio padrão.

era de $3,4 \pm 1,3$, VHS 15 ± 18 mm/1ªh e PCR $19,5 \pm 55,1$ mg/L (tabela 2).

No momento do estudo, apenas um (0,5%) paciente apresentou infecção fúngica localizada (candidíase vaginal) e nenhum teve monilíase oral. Nenhum dos pacientes incluídos apresentou candidemia com hemocultura positiva para fungos ou PCR positiva para *Candida* spp. em amostra de sangue periférico.

A análise de possíveis fatores de risco para infecção por *Candida* revelou que apenas 14 (7,2%) haviam recebido antibiótico-terapia até quatro semanas antes da avaliação, nove por infecção de trato respiratório, três cutâneas, uma de trato urinário e uma odontogênica. Além disso, nenhum paciente foi hospitalizado ou submetido a procedimentos invasivos até um mês antes do início do estudo.

Discussão

Este foi o primeiro estudo que avaliou a prevalência de doença fúngica invasiva e localizada por *Candida* em um expressivo número de pacientes com doenças reumatológicas tratados com terapia anti-TNF e demonstrou baixo risco de candidíase, apesar da alta prevalência de uso de imunossupressores.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento considerável em infecções em pacientes imunodeprimidos, entre as quais a *Candida* spp., particularmente nas sep- ses nosocomiais, com alto índice de mortalidade. *Candida albicans* é considerada como um agente comensal da flora

normal do trato digestivo e sua patogenicidade é resultado de alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro que induzem modificações no comportamento do fungo.^{19,20}

Pacientes reumatológicos estão frequentemente expostos a diversos fatores de risco associados ao aumento significativo da incidência dessa infecção fúngica nas últimas décadas. O uso de antibioticoterapia de amplo espectro pode causar modificações na flora da mucosa e levar à proliferação de *Candida*; corticoterapia pode afetar a atividade de células polimorfonucleares, macrófagos e células T; procedimentos cirúrgicos e o uso de drogas imunossupressoras, particularmente agentes biológicos, facilitam a proliferação de agentes oportunistas.^{2,21} De fato, na literatura, em 98% das infecções fúngicas invasivas como histoplasmoze, candidíase e aspergilose, foi relatado o uso de pelo menos um imunossupressor, particularmente corticoterapia, associado à terapia anti-TNF.¹

A resposta imune inata é o mecanismo dominante responsável pela depuração de leveduras após a infecção sistêmica inicial. Os monócitos e macrófagos são as células mais associadas com a resposta contra infecção sistêmica por *C. albicans*. As vias pelas quais isso ocorre ainda não são completamente esclarecidas, mas parecem envolver o reconhecimento de padrões moleculares associados patógeno (PAMPs) na levedura por receptores na célula fagocítica, o que resulta na ativação e liberação de citocinas inflamatórias.¹⁹ Além disso, o espectro de defesas contra infecção mucocutânea e sistêmica por *Candida* inclui imunidade celular mediada que é caracterizada pela liberação de citocinas por linfócitos e a ativação de células NK e linfócitos por interleucinas. Entretanto, há evidências que apoiam o papel da resposta humoral na proteção contra a infecção invasiva *Candida*.^{19,20}

Sabe-se que, na infecção sistêmica por *C. albicans*, a produção de TNF é estimulada pelo patógeno. Louie et al.²² demonstraram, em um modelo animal de candidíase sistêmica, que essa citocina teria um papel protetor na infecção. A neutralização da atividade do TNF levaria a uma supressão na produção de IFN, promoveria a apoptose de monócitos, impediria a manutenção do granuloma e permitiria o crescimento do fungo em diversos órgãos.¹ De fato, em uma revisão de relatos de infecções fúngicas invasivas associadas à terapia anti-TNF (infleximabe, adalimumabe, etanercepte) em diversas doenças (doença versus hospedeiro, doença inflamatória intestinal e AR) entre 1966 e 2007, Tsiodras et al.¹ encontraram 281 casos. Candidíase foi responsável por 23% dessas infecções e, entre essas, apenas três ocorreram em pacientes com AR. Embora evidências na literatura sugiram que possa haver diferenças em relação a risco de infecção entre diferentes drogas anti-TNF,²³ o presente estudo evidenciou baixas frequências de candidíase para os três agentes usados.

Além disso, entre pacientes reumatológicos há apenas dois relatos de artrite séptica por *Candida* spp. em pacientes com artrite reumatoide em terapia anti-TNF.^{8,9} Entretanto, nos dois casos, o uso concomitante de outros agentes imunossupressores pode ter contribuído para o desenvolvimento da infecção por *Candida*.

A metodologia de PCR empregada para detecção de *Candida* spp. no presente estudo não parece justificar a ausência de positividade, uma vez que essa é considerada uma das mais sensíveis para o diagnóstico de candidemia em relação

aos métodos tradicionais.²⁴ Em um estudo com camundongos com candidemia induzida, a sensibilidade dessa técnica foi de 79%.²⁵ Por outro lado, o isolamento do fungo em cultura de fluido estéril como sangue e líquido peritoneal é associado a um índice de recuperação baixo e atinge apenas 40 a 60% de positividade em pacientes com candidíase sistêmica comprovada por autópsia.²⁶

A partir deste estudo, concluímos que doença fúngica invasiva e localizada por *Candida* não representou uma infecção frequente em pacientes reumatológicos em terapia imunossupressora associada a agentes anti-TNF.

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), 2009/51897-5 para EB e CAS, Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 302724/2011-7 para CAS e 301411/2009-3 para EB, Federico Foundation para CAS e Núcleo de Apoio à Pesquisa Saúde da Criança e do Adolescente da USP (NAP-CriAd).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Tsiodras S, Samonis G, Boumpas DT, Kontoyiannis DP. Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:181-94.
- Senet JM. Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 1997;14:6-13.
- Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Gottfredsson M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3489-92.
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003;37:1172-7.
- Zaoutis TE, Greves HM, Lautenbach E, Bilker WB, Coffin SE. Risk factors for disseminated candidiasis in children with candidemia. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:635-41.
- Ellerin T, Rubin RH, Weinblatt ME. Infections and anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3013-22.
- Rychly DJ, DiPiro JT. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Pharmacotherapy.* 2005;25:1181-92.
- Miyamoto H, Miura T, Morita E, Morizaki Y, Uehara K, Ohe T, et al. Fungal arthritis of the wrist caused by *Candida parapsilosis* during infliximab therapy for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2012;22:903-6.
- Springer J, Chatterjee S. *Candida albicans* prosthetic shoulder joint infection in a patient with rheumatoid arthritis on multidrug therapy. *J Clin Rheumatol.* 2012;18:52-3.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.
- Bennett PH, Wood PHN. *Population Studies of the Rheumatic Diseases.* New York: Excerpta Medica; 1968. p. 456.
- Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 1991;34:1218-27.
- Petty RE, Southwood T, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* 2004;31:390-2.
- Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:44-8.
- Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994;21:2286-91.
- Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1169-75.
- Loffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3311-2.
- Ponton J, Jones JM. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques. *Infect Immun.* 1986;53:565-72.
- Ashman RB. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. *Front Biosci.* 2008;13:3334-51.
- Richardson M, Rautemaa R. How the host fights against *Candida* infections. *Front Biosci (Schol Ed).* 2009;1:246-57.
- Filler SG, Yeaman MR, Sheppard DC. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 3:S208-12.
- Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Singh JK, et al. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. *Infect Immun.* 1994;62:2761-72.
- van Dartel SA, Fransen J, Kievit W, Flendrie M, den Broeder AA, Visser H, et al. Difference in the risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, infliximab and etanercept: results from the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring (DREAM) registry. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:895-900.
- Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Löfdahl S, Tollemar J. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis.* 1994;26:479-85.
- Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis.* 1993;168:779-83.
- Pizzo PA, Walsh TJ. Fungal infections in the pediatric cancer patient. *Semin Oncol.* 1990;17 3 Suppl 6:6-9.