

## Multiple Myeloma, Febril Nötropenik Hastalarda Aspergillus Galaktomannan Testi Yalancı Pozitifliğine Neden Olabilir mi?

<sup>1</sup>Müge Aslan, <sup>1</sup>Yasemin Öz, <sup>1</sup>Filiz Akşit, <sup>2</sup>Meltem Olga Akay,  
<sup>3</sup>Ferhat Gürkan Aslan

<sup>1</sup>Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı

<sup>2</sup>Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı

<sup>3</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı

\*email: [mduzceker@ogu.edu.tr](mailto:mduzceker@ogu.edu.tr)

**ÖZET:** Galaktomannan (GM) antijen testi invaziv aspergillozun erken tanısında, özellikle hematolojik maligniteli ve kemik iliği transplant hastalarında onaylanmış, invaziv olmayan bir tanı yöntemidir. Ancak, çeşitli nedenlere bağlı bildirilen yalancı pozitif sonuçlar testin yararlılığını kısıtlamaktadır. Çeşitli fungal orjinli antibakteriyeller, bazı mantar türleri, elektrolit replasman solüsyonu kullanımı, hemodiyaliz hastaları yalancı pozitif GM Ag testinin bilinen nedenlerindedir. Bunun yanında laboratuvarımızdaki rutin çalışmalar sırasında yalancı GM Ag pozitifliğinin multiple myelomalı hasta grubunda da sıklıkla ortaya çıktığı gözlenmiştir. Çalışmamızda multiple myeloma tanısıyla takip edilen invaziv aspergilloz (İA) açısından Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu-Mikoz Çalışma Grubu (EORTC-MSG) rehberlerine göre; klinik ve/veya radyolojik bulgu taşımayan 39 hastanın 10'unda ardışık en az iki kez GM Ag testi pozitifliği tespit edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak, multiple myeloma dışı hematoloji hastalarından EORTC'ye göre İA olarak sınıflandırılmayan 29 hasta ile kanıtlanmış İA bulunan bir hasta da yer aldı. Real-time PCR testi ile İA olmayan 39 multiple myeloma hastası ile 29 kontrol hastasının serum örneklerinin tamamı Aspergillus DNA'sı açısından negatif bulundu. Bu nedenle GM pozitifliği septanan multiple myelomalı 10 hastada GM testi yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir. GM Ag testi İA'un erken tanısında kullanışlı non-invaziv bir test olmakla birlikte, birçok durumda yalancı pozitif sonuçların da elde edilebileceği unutulmamalı, diğer klinik ve laboratuvar test sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Galaktomannan, invaziv aspergilloz, tanı, yanlış pozitiflik

### DOES MULTIPLE MYELOMA CAUSE FALSE POSITIVE RESULTS OF THE ASPERGILLUS GALACTOMANNAN ASSAY?

**ABSTRACT:** Invasive aspergillosis (IA) early diagnosis and treatment crucial especially for hematological malignancy and bone marrow transplant patients. Diagnosis may be facilitated with a noninvasive test galactomannan antigen detection. But this test have some limitations like false positive results. False positivity can be seen with concomitant administration of some fungus derived antibiotics, infection by fungi other than Aspergillus, plasmalyte infusional solutions, patients with hemodialysis. However in our laboratory false GM antigen positivity results were detected frequently in patients diagnosed as multiple myeloma. In our study we defined patients according to European Organisation for the Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group (EORTC/MSG) criteria, 10 of the 39 patients with no clinical and radiological signs for IA was detected at least two consecutive GM antigen positivity. Furthermore, we randomly selected 29 patients with no signs of IA and one proven IA patient as control group. Using real-time PCR assay 39 multiple myeloma and 29 control patient were found negative. Therefore, we evaluated 10 multiple myeloma patients with GM positivity as falsely elevated. GM antigen test is valuable tool for diagnosis of invasive aspergillosis but positive results may be interpreted with other clinical or radiological signs and symptoms. Multiple myeloma may also be an important cause of false GM positivity.

**KEYWORDS:** Diagnosis, false positive, galactomannan, invasive aspergillosis.

## 1. Giriş

Fırsatçı invaziv mantar enfeksiyonları özellikle immünyetmezlikli hasta sayısındaki artışa paralel olarak; önemli mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir (1,2). Erken ve doğru tanı, antifungal tedavinin zamanında başlanması ve antifungal ajanların gereksiz kullanımını azaltmak için son derece önemlidir. Son yıllarda invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında fungal antijenlerin ve DNA'nın tespitine yönelik daha hızlı ve non-invaziv testlere olan ilgi artmıştır. Galaktomannan (GM), *Aspergillus* türlerinin üremeleri sırasında hücre dışına salgılanan bir hücre duvarı bileşenidir. Hasta örneklerinde bu antijeni saptamaya yönelik geliştirilen Platelia *Aspergillus* Ag testi invaziv aspergillozun erken tanısında, özellikle hematolojik maligniteli ve kemik iliği transplant hastalarında, kullanılmak üzere Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış invaziv olmayan bir tanı yöntemidir. GM Ag testi, invaziv aspergilloz tanısında tüm dünyada yaygın olarak kullanılmakla birlikte, çeşitli nedenlere bağlı bildirilen yalancı pozitif sonuçlar test için olumsuzluk oluşturmaktadır.

Multiple myeloma artmış monoklonal serum immünglobulin düzeyleri ile karakterize bir plazma hücre hastalığı olup, laboratuvarımızdaki rutin çalışmalar sırasında yalancı GM Ag pozitifliğinin bu hasta grubunda daha sıklıkla ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda yalancı galaktomannan pozitifliği saptanan ve invaziv fungal hastalığı olmayan multiple myelomalı hastaların değerlendirilmesi ve galaktomannan yalancı pozitifliğinde multiple myelomanın yerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntem

Ocak 2011- Temmuz 2012 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji ve Kemik İliği Transplantasyon servislerinde takip edilmekte olan multiple myelomalı hastalar değerlendirmeye alındı. Bu dönemde hastaların serum galaktomannan düzeyleri haftada iki kez Platelia *Aspergillus* EIA (Bio-Rad, Marnes La-Coquette, Fransa) kiti kullanılarak değerlendirildi. Ardışık iki örnekte optik dansite indeksinin 0.5 ve üzerinde olması pozitif olarak kabul edildi.

*Aspergillus* DNA'sını saptamaya yönelik eş zamanlı olarak aynı serum örneklerine real-time PCR testi de uygulandı. Bu amaçla, Qiamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden Germany) kullanılarak üretici önerileri doğrultusunda serum örneklerinden nükleik asit izolasyonu yapıldı. Real-time PCR testi için Mycassay *Aspergillus* (Myconostica Ltd, Manchester, UK) kullanılarak *Aspergillus* DNA varlığı araştırıldı.

Hastalar invaziv aspergilloz (İA) açısından Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu - Mikoz çalışma Grubu (EORTC-MSG) rehberlerine göre sınıflandırıldı (3).

## 3. Bulgular

Çalışmaya multiple myelomalı 44 hasta dahil edildi. Bu hastaların 39'unda IA'ü düşündürecek klinik ve/veya radyolojik bulgu saptanmadı ve EORTC'ye göre IA olarak kabul edilmedi. IA bulunmayan bu hastaların 10'unda ardışık en az iki kez GM Ag testi pozitif olarak tespit edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak, multiple myeloma dışı hematoloji hastalarından herhangi bir klinik ve/veya radyolojik bulgusu bulunmayan ve EORTC'ye göre IA olarak sınıflandırılmayan 29 hasta ile kanıtlanmış IA bulunan bir hasta da yer aldı.

Real-time PCR testi ile IA olmayan 39 multiple myeloma hastası ile 29 kontrol hastasının serum örneklerinin tamamı *Aspergillus* DNA'sı açısından negatif bulundu. Multiple myeloma hastalarından 5'i ise IA açısından yüksek olasılıklı olarak sınıflandırılmış olup, bu hastalardan 1'inde ve kontrol grubundaki kanıtlanmış IA bulunan bir hastada GM Ag ve real-time PCR testleri pozitif saptanmıştır.

## 4. Tartışma

İnvaziv aspergilloz genellikle immün yetmezliği olan hastalarda gelişerek mortalite ve morbiditeyi artırmaktadır. Bu nedenle erken tanı, uygun tedavinin en kısa sürede başlanması için önemlidir. İnvaziv aspergillozda tanı, klinik bulgular, radyolojik ve laboratuvar verilerinin birlikte değerlendirilmesine dayanmaktadır (4). Kesin tanı, etkenin klinik örnekte direkt mikroskopi ve histopatolojik olarak görüntülenmesi ve kültürde üretilerek tür düzeyinde

tanımlanması ile konulmaktadır. Ancak hematolojik maligniteli hastalarda, trombositopeni, hipoksi ve genel durum bozukluğu nedeniyle biyopsi veya derin doku örnekleme genelde mümkün olmamaktadır. İnvaziv aspergillozlu olgularda doku örneklerinin hastaların genel durumu nedeniyle zor elde edilmesi, diğer klinik örneklerin (balgam, kan vb.) tanıda duyarlılık ve özgüllük açısından yetersiz kalması ve uzun sürede sonuçlanması nedeniyle yeni tanısal yöntem arayışları gündeme gelmiştir. Görüntüleme yöntemleri ile tanıyı destekleyen bulgular (halo, buzlu cam, nodül gibi) elde edilse de, bunlar sadece invaziv aspergilloza özgül olmayabilir (5,6).

GM antijen testi ve *Aspergillus*'a özgül nükleik asitlerin saptanmasına yönelik testler, son yıllarda kullanılmaya başlayan invaziv olmayan tanı yöntemleridir. *Aspergillus* cinsine özgül GM antijeni, enzim temelli bir immunolojik test (*Platelia Aspergillus* ELISA) ile saptanmaktadır. Kültür dışındaki bu tanı yöntemlerinden en çok kullanılan Galaktomannan antijen testi pozitifliği, invaziv aspergillozun erken tanısında önemli ve EORTC-MSG'nin tanımladığı mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında bulunmaktadır. Bu testin kullanımı FDA tarafından serum ve BAL örnekleri için 2003 ve 2011 yıllarında onaylanmıştır (3,4). Yapılan çalışmalarda farklı duyarlılık ve özgüllük oranlarının yanı sıra (FDA'ye göre özgüllük ve duyarlılık sırasıyla %80.7 ve %89.2 olarak bildirilmekle birlikte, birçok çalışmada özgüllük oranları %23-100 gibi farklı aralıklarda bulunmuştur) (7,8), çeşitli yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik nedenleri de bildirilmiştir. GM testinin duyarlılığının çocuklarda ve erişkinlerde farklılıklar gösterdiği ve aspergillozlu erişkin ve çocuk hastalardaki yalancı pozitiflik oranlarının sırasıyla %3-10 ve %10-44 ve yenidoğanlarda %80 civarında olduğu bildirilmektedir (9). Pediatrik hastalarda ve yeni doğanlarda yüksek yalancı pozitiflik nedeni anne sütünde ve formüle mamalarda yüksek konsantrasyonda bulunan *Bifidobacterium bifidum*'un çapraz reaksiyonu ya da onların salgıladığı lipoglikan (galaktofuranoz kalıntıları) ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (10,11).

Yoğun kemoterapi nedeniyle barsak endotelyumundaki hasar sonucu diyetteki GM

absorbsiyonu artabilir. *Platelia Aspergillus* GM ile *Penicillium* spp. arasında da çapraz reaksiyon gösterilmiştir. Fakat *Penicillium* türleri nadir insan patojenlerinden olduğundan klinikle çok az ilgili olarak görülmektedir. Ayrıca fungal orjinli ilaçlar örneğin; antibakteriyeller (ampisilin sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asit) de yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. *Paecilomyces variotii* ve *Alternaria* spp. *Geotrichum* spp., *Histoplasma* spp., *Cryptococcus* spp. gibi diğer mantarlarla da çapraz reaksiyon gözlenmiştir. Bakteriyemik hastalar ve reaktif otoantikorları olan hastalarda da yanlış pozitif reaksiyonlar bildirilmiştir. Ticari elektrolit replasman solüsyonu uygulanması, siklofosamid kullanımı, GVHD, hemodiyaliz hastaları ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastalar da yanlış pozitif antijenemi nedeni olarak kısa süre önce rapor edilmiştir (7,12,13).

Yoshida ve ark. (14) çalışmalarında multiple myeloma hastalarının GM antijen testi sonuçlarının yorumlanmasında zorluklar olabileceğini, bunun da yüksek düzeydeki paraprotein optik interferansından kaynaklanabileceğini ve multiple myeloma hasta grubunda GM antijen testinin invaziv aspergilloz tanısında daha az yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Mori ve arkadaşları (15), 124 hematolojik maligniteli hastayı değerlendirdikleri çalışmalarında 21 hastada GM pozitifliği saptanmış ve immunglobulin G (IgG)-subtip multiple myeloma hastası olanların %52.3'ünde (11/21) galaktomannan antijeninin yalancı pozitif olarak belirlemişlerdir. Bunların aksine, multiple myeloma ve Waldenström's makroglobulinemili 29 hastanın değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise GM antijen testinin bu hasta grubunda yalancı pozitiflik nedeni olmadığı ve şüpheli invaziv mantar enfeksiyonu olanlarda tanı amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (16).

Çalışma grubumuzda ise 44 multiple myeloma hastasının 10'unda (%22.7) GM antijen testi pozitifliği tespit edilmiş olup, PCR sonuçları negatif, İA açısından radyolojik ve/veya klinik herhangi bir bulgusu olmayan bu hastalarda GM testi yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

GM Ag testi İA tanısında oldukça kullanışlı non-invaziv bir test olmakla birlikte, birçok

durumda yalancı pozitif sonuçların da elde edilebileceği unutulmamalı ve diğer klinik ve laboratuvar test sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir. Çalışmamızda multiple myeloma hastalarında da oldukça yüksek oranda yalancı pozitif sonuçlar gözlemledik. Ancak GM Ag testi yalancı pozitifliği üzerine multiple myelomanın etkisi ve bunun

nedeninin açıklanması için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, İA'un non-invaziv tanısında GM Ag testi hala önemini korumakla birlikte, yalancı pozitif ve negatif sonuçlar ile moleküler testlerin yararlılığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

#### KAYNAKLAR

1. Neofytos, D., Horn, D., Anaissie, E., Steinbach, W., Olyaei, A., Fishman, J., Pfaller, M., Chang, C., Webster, K., Marr, K. (2009). Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin. Infect. Dis*, 48, 265–273.
2. Pagano, L., Caira, M., Nosari, A., Van Lint, M.T., Candoni, A., Offidani, M., Aloisi, T., Irrera, G., Bonini, A., Picardi, M., Caramatti, C., Invernizzi, R., Mattei, D., Melillo, L., de Waure, C., Reddiconto, G., Fianchi, L., Valentini, C.G., Girmenia, C., Leone, G., Aversa, F. (2007). Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin. Infect. Dis*. 45, 1161–1170.
3. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly. J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., Pappas, P.G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C.A., Denning, D.W., Patterson, T.F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W.E., Herbrecht, R., Hope, W.W., Kibbler, C.C., Kullberg, B.J., Marr, K.A., Muñoz, P., Odds, F.C., Perfect, J.R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B.H., Sobel, J.D., Sorrell, T.C., Viscoli, C., Wingard, J.R., Zaoutis, T., Bennett, J.E. (2008). European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MCG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*, 46(12), 1813-1821.
4. Hope, W.W., Walsh, T.J., Denning, D.W. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Disease*, 5, 609-622.
5. Georgiadou, S.P., Sipsas, N.V., Marom, E.M., Kontoyiannis, D.P. (2011). The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clinical Infectious Diseases*, 52(9), 1144-1155.
6. Kontoyiannis, D.P., Bodey, G.P. (2002). Invasive aspergillosis in 2002: An update. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(3), 161-172.
7. Marr, K.A., Balajee, S.A., McLaughlin, L., Tabouret, M., Bentsen, C., Walsh, T.J. (2004). Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *Journal of Infectious Diseases*, 190, 641-649.
8. Barton, R.C. (2013). Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2013/459405.
9. Steinbach, W.J. (2010). Invasive aspergillosis in pediatric patients. *Curr Med Res Opin*, 26(7), 1779-1787.
10. Verweij, P.E., and Mennink-Kersten, M. A. S. H. (2006). Issues with galactomannan testing. *Medical Mycology*, 44, 179-183.
11. Mennink-Kersten M.A., Klont R.R., Warris A., Verweij P.E. (2004). Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. *Lancet*, 363, 325-327.
12. Millon, L., Grenouillet, F., Crouzet, J., Larosa, F., Loewert, S., Bellanger, A.P., Deconinck, E., Legrand, F. (2010). False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. *Medical Mycology*; 48(4), 661-664.
13. Gerlinger, M.P., Rousselot, P., Rigaudeau, S., Billon, C., Touratier, S., Castaigne, S., Eloy, O. (2012). False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect*, 42(1), 10-14.
14. Yoshida, K. (2006). Recent advances of serodiagnosis for systemic fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 47:135-142.
15. Mori Y., Nagasaki Y., Kamezaki K., Takenaka K., Iwasaki H., Harada N., Miyamoto T., Abe Y., Shimono N., Akashi K., Teshima T. (2010). High incidence of false-positive *Aspergillus* galactomannan test in multiple myeloma. *Am. J. Hematol*. 85, 449-451.
16. Issaa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A., Marty, M.F. (2012). Serum Galactomannan and (1-3)- $\beta$ -D-Glucan Assays for Patients with Multiple Myeloma and Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Journal of Clin Microbiol*, 50(3), 1054-1056.