

Westfälische PILZBRIEFE

Herausgegeben von der Pilzkundlichen Arbeitsgemeinschaft in Westfalen
Schriftleitung: Dr. H. Jahn, 4931 Heiligenkirchen/Detmold, Alter Sportplatz 466

V. Band

Heft 6

1965

Differenzierung von Fragmenten giftiger und essbarer Pilze auf Grund ihrer hämagglutinierenden und hämolytischen Eigenschaften

Von St. R a s z e j a , Gdańsk

Schon seit langer Zeit interessierte man sich für gewisse in höheren Pilzarten vorkommende Substanzen, die Affinität zu Blutkörperchen aufwiesen, wobei man sich vorerst mit den Hämolysinen und später mit den Agglutininen (3, 4, 5, 6) beschäftigte. Prinzipiell wurde keine Korrelation zwischen der Toxizität der Pilze und ihren hämagglutinierenden bzw. hämolytischen Eigenschaften festgestellt. Zu den Ausnahmefällen sollte *Gyromitra esculenta* gehören, was sich später jedoch auch als unbegründet erwies (9).

In den letzten 15 Jahren wurden die aus Pilzfruchtkörperextrakten gewonnenen Hämagglutinine wiederum zum Gegenstand lebhaften Interesses der Wissenschaftler. Diesmal suchte man Agglutinine, die menschliche Blutkörperchen verschiedener Gruppen spezifisch agglutinierten (1, 2, 7, 11, 14, 15). In letzter Zeit fand der Fruchtkörperextrakt aus *Laccaria laccata* als Reagenz zur Unterscheidung menschlichen Blutes von Tierblut u. a. in der Kriminalistik seine Anwendung (12).

Die einzelnen Autoren bedienten sich zur Feststellung der „serologischen“ Eigenschaften höherer Pilzarten verschiedener Methoden. Die einen verwendeten ausgedrückten Saft, andere fertigten Extrakte aus zerkleinerten frischen Pilzen bzw. getrockneten Pilzfruchtkörpern an.*

Die bisherigen Untersuchungen weisen auf eine recht große Unterschiedlichkeit der Pflanzen in Bezug auf ihre hämagglutinierenden und hämolytischen Eigenschaften sogar innerhalb einer Familie und manchmal auch innerhalb einer Gattung hin.

* Eine eingehende Übersicht des Schrifttums betr. dieser Nachforschungen sowie auch der Untersuchungen über den chemischen Aufbau der Phyttagglutinine und ihrer Inhibitoren ist in einer anderen Arbeit des Autors enthalten (13).

Es tauchte also die Möglichkeit auf, dieses Phänomen zur Differenzierung verschiedener Pflanzenarten sowie auch giftiger und essbarer Pilze auszunutzen. Es scheint, daß die Differenzierung gewisser Pilzfragmente (besonders derjenigen, die der charakteristischsten Elemente — der Sporen — entbehren), auf Grund ihrer Affinität zu menschlichen oder tierischen Blutkörperchen im Laboratorium, das sich mit der Analyse von bei Vergiftungsfällen sichergestellten Pilzfragmenten beschäftigt, Anwendung finden könnte.

Material und Methodik

Für die vorliegende Arbeit wurden unter 50 Pilzarten, die zwecks Feststellung arteigener Phyttagglutinine (13) untersucht wurden, nur 19 der populärsten, davon 7 giftige, 2 ungenießbare (leicht giftige) und 10 essbare, ausgewählt. Auf Grund der äußeren Ähnlichkeit ihrer morphologischen Kennzeichen sowie der daraus erfolgenden tragischen Verwechslungen durch Pilzsammler (9, 10) wurden sie in 6 Gruppen zusammengestellt.

Frischgesammelte Fruchtkörper wurden in einer Temperatur von 30 — 40° C zwei Tage lang getrocknet. Hüte und Stiele wurden getrennt getrocknet. Das getrocknete Pilzmaterial wurde zu Pulver zerrieben und daraus ein Extrakt mit physiologischer Na Cl-Lösung im Verhältnis 10:1 hergestellt und in einer Temperatur von 37 — 40° C für die Dauer von 3 Stunden aufbewahrt, wobei das Reagenzglas häufig geschüttelt wurde. Der Extrakt wurde zentrifugiert und die Flüssigkeit oberhalb des Satzes zu den Untersuchungen benutzt. Die hämagglutinierenden bzw. hämolytischen Eigenschaften des Extraktes wurden untersucht, indem man eine 2 — 3% Suspension von menschlichen Blutkörperchen der Gruppen 0, A₁, B sowie Ochsen-, Schweine-, Hammel- und Pferdeblutkörperchen benutzte. Zur Bestimmung des Titors der Agglutinine bzw. Hämolsine wurde der Extrakt in geometrischer Reihenfolge verdünnt.

Ergebnisse

Wie aus der beigefügten Tabelle hervorgeht, unterscheiden sich die Extrakte aus essbaren und giftigen Pilzen in der Mehrzahl der Gruppen durch ihre „serologischen“ Eigenschaften. *Amanita phalloides* zeigt sehr deutliche hämolytische Eigenschaften im Verhältnis zu menschlichen Blutkörperchen, wie sie keine der übrigen Arten der Gruppe 1 aufweist. Eine gesonderte Untersuchung des Extraktes aus Hut und Stiel dieses Knollenblätterschwamms (*Amanita phalloides*) zeigte, daß beide Teile identische Eigenschaften haben, wengleich auch die Stiele in geringerem Maß. Dies schafft Möglichkeiten einer „serohämatalogischen“ Identifizierung von Stielfragmenten der zur Gruppe 1 zählenden Pilze.

Tabelle: Hämagglutinierende und Hämolytische Eigenschaften von Extrakten aus Hüten und Stielen giftiger und essbarer Pilze nach Einteilung in Gruppen 1 — 6.

Bemerkung: Die Ziffern mit vorgesetztem Buchstaben „h“ bezeichnen den reziproken Titer der Hämolyse, die übrigen Ziffern bezeichnen den reziproken Agglutinationstiter.

	Name der Pilzart	Teil d. Fruchtkörpers	Blutkörpersuspension						
			0	A ₁	B	Ochse	Schwein	Schaf	Pferd
1.	<i>Amanita phalloides</i>	Hut	h128	h128	h128	—	h1	h1	h1
		Stiel	h64	h64	h64	—	—	—	—
	<i>Amanita citrina</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—
		Stiel	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Agaricus campestris</i>	Hut	4	2	4	—	2	2	64
		Stiel	4	2	4	—	1	1	64
	<i>Agaricus silvicola</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—
		Stiel	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Lepiota procera</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—
		Stiel	—	—	—	—	—	—	—
<i>Russula aeruginea</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—	
	Stiel	—	—	—	—	1	—	4	
<i>Tricholoma equestre</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—	
	Stiel	—	—	—	—	—	—	—	
2.	<i>Amanita pantherina</i>	Hut	2	1	1	—	—	1	1
		Stiel	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Amanita muscaria</i>	Hut	512	64	256	—	1	1	32
		Stiel	64	16	32	—	—	—	4
<i>Amanita rubescens</i>	Hut	2h8	2h8	2h8	2h8	2h8	2h8	2h8	
	Stiel	—	—	—	—	—	—	—	
3.	<i>Lactarius torminosus</i>	Hut	32	32	32	1	8	8	64
		Stiel	8	8	8	—	4	4	16
	<i>Lactarius rufus</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	8
		Stiel	—	—	—	—	—	—	8
<i>Lactarius deliciosus</i>	Hut	h2	h2	h2	h2	h2	h2	h2	
	Stiel	2	2	2	—	2	1	32	
4.	<i>Clitocybe dealbata</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—
		Stiel	—	—	—	—	h2	h2	—
	<i>Marasmius oreades</i>	Hut	1	—	4	2	4	2	1
Stiel		4	1	16	4	16	8	1	
5.	<i>Nematoloma fasciculare</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—
		Stiel	h2	h2	h2	h2	h2	h2	h2
	<i>Armillariella mellea</i>	Hut	—	—	—	—	—	—	—
Stiel		—	—	—	—	—	—	—	
6.	<i>Rhodophyllus sinuatus</i>	Hut	8	8	8	8	8	8	8
		Stiel	2	2	2	2	2	2	2
	<i>Boletus edulis</i>	Hut	32	32	32	2	32	16	64
		Stiel	8	8	8	1	16	4	16
	<i>Agaricus campestris</i>	Hut	4	2	4	—	2	2	64
		Stiel	4	2	4	—	1	1	64

Ein Vergleich der Extrakteigenschaften der 2. Pilzgruppe ist bedeutend weniger nutzbringend. Im Bereich des Hutes weist jede der drei erwähnten Pilzarten andere Eigenschaften auf: *Amanita pantherina* agglutiniert Blutkörperchen in geringem Grade, *Amanita muscaria* sehr deutlich und zwar mit teilweiser Spezifität, *Amanita rubescens* hämolysiert deutlich. Untersuchungen des Stieles jedoch lassen eine Unterscheidung zwischen *Amanita pantherina* und *Amanita rubescens* nicht zu, da sie keine Affinität zu Blutkörperchen aufweisen. Die Extrakte aus Stielfragmenten dieser beiden Arten lassen sich jedoch vom Extrakt des Stieles einer *Amanita muscaria* unterscheiden, der deutliche Agglutinationseigenschaften aufweist.

Die Differenzierung der Extrakte aus den der 3. Gruppe eingereihten Pilzen gibt bedeutend bessere Ergebnisse. Alle drei Arten dieser Gruppe zeichnen sich durch verschiedene charakteristische Eigenschaften aus. Der Extrakt aus dem Hute des giftigen *Lactarius torminosus* agglutiniert deutlich Menschen- und Pferdeblutkörperchen; dagegen agglutiniert der Extrakt aus demselben Teil des Fruchtkörpers von *Lactarius rufus* ausschließlich Pferdeblutkörperchen — und der des essbaren *Lactarius deliciosus* hämolysiert in geringem Grade die Blutkörperchen aller benutzten Tierarten. Der Vergleich der serologischen Eigenschaften der Stiele der einzelnen *Lactarius*-Arten beweist, daß hier grundsätzliche Unterschiede bestehen. In ähnlicher Weise kann man die in der Tabelle angeführten Pilzarten der Gruppen 4 und 5 differenzieren.

In Gruppe 6 agglutinieren alle Extrakte menschliche und tierische Blutkörperchen und unterscheiden sich ausschließlich durch den Agglutinationstiter (um 1 — 3 Verdünnungsgrade). In dieser Gruppe weisen sowohl der Stiel wie auch der Hut beider essbaren Arten — im Gegensatz zu *Rhodophyllus sinuatus* — eine gewisse Artspezifität auf.

In der Folge wurden Versuche durchgeführt, die die Feststellung der Widerstandsfähigkeit der Agglutinine und Hämolysine gegen die Einwirkung erhöhter Temperatur zum Ziel hatten. Die Untersuchungen erwiesen, daß Pilzhämolysine bei einer Erwärmung des Extraktes auf 60° C, Agglutinine dagegen bei 80° C und einige (z. B. *Lactarius torminosus*) erst beim Kochen vernichtet werden.

Zwecks Untersuchung der Bewahrung der agglutinierenden und hämolysierenden Eigenschaften des der Verdauung unterworfenen Fruchtkörpers wurde Pilzfragmenten Magensaft beigefügt. Die Verdauung dauerte 15 Minuten, 2 Stunden und 24 Stunden. Aus der ganzen Untersuchungsreihe ergibt sich, daß in Pilzen, die einer längeren Einwirkung von Magensaft ausgesetzt waren, keine „serologisch“ aktiven Substanzen aufzufinden waren. Diese Substanzen blieben dann erhalten, wenn die Einwirkung des Magensaftes kurze Zeit andauerte (15 Minuten, seltener bis zu 2 Stunden) und die Pilzstückchen möglichst groß und unzerkleinert waren.

D i s k u s s i o n

Die Untersuchungen über die hämagglutinierenden und hämolysierenden Eigenschaften der Giftpilze sowie der ihnen ähnlichen essbaren Pilze schaffen neue Möglichkeiten für die Identifizierung von Pilzfragmenten. Besonders wertvoll

scheint die Tatsache zu sein, daß man auf diese Weise nicht nur die Extrakte aus Teilen des Hutes, sondern auch des Stieles der Pilzfruchtkörper differenzieren kann. Es ist nämlich bekannt, daß die mykologische Diagnostik dann, wenn das Untersuchungsmaterial sich auf Stielfragmente begrenzt, sehr schwierig ist.

Die „serologische“ Differenzierung beschränkt sich auf frische Fruchtkörper, die keinem Kochen oder starkem Erhitzen oder auch langdauernder Verdauung ausgesetzt werden. Es kommen jedoch Pilzvergiftungsfälle vor, bei denen es gelingt, Pilzabfälle (meistens Stiele), die vor der Speisenzubereitung fortgeworfen worden waren, für Laboratoriumsuntersuchungen zu sichern.

Die oben erwähnten Untersuchungen stellen die erste Probe einer Differenzierung giftiger und eßbarer Pilze auf Grund der Unterschiedlichkeit ihrer nachgewiesenen hämagglutinierenden oder hämolytischen Eigenschaften dar, wobei nicht alle Möglichkeiten erschöpft worden sind. So ist es z. B. nicht ausgeschlossen, daß die Anwendung einer Blutkörperchensuspension anderer Tierarten (Hund, Kaninchen, Meerschweinchen u. dgl.) für die Untersuchungen eine bessere und genauere Differenzierung der einzelnen Pilzarten gestatten würden.

Es scheint, daß die Ergebnisse der durchgeführten Beobachtungen außerdem ihre Anwendung auf dem Gebiet der Nahrungsmitteluntersuchungen finden könnten. Eine Fälschung des im Handel erhältlichen Pilzmehls (bei Ersatz des aus teuren Pilzarten bestehenden Pilzmehls durch ein solches aus gewöhnlichen und billigeren Pilzarten), könnte in sehr einfacher Weise mit Hilfe der oben beschriebenen Untersuchungen der Agglutinationseigenschaften des Pilzmehl-Extraktes aufgedeckt werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Untersuchung der hämagglutinierenden und hämolytischen Eigenschaften von Pilzextrakten läßt eine Differenzierung vieler giftiger und eßbarer Pilzarten, die äußerlich einander ähnlich sind, zu.

Zur „serologischen“ Untersuchung bestimmter Pilzarten kann man nicht nur den Hut des Fruchtkörpers, sondern auch Teile des Stieles, die sich sonst für eine botanische Untersuchung nicht eignen, aber bei Vergiftungsfällen gesichert werden konnten, ausnutzen.

L i t e r a t u r:

1. Bernheimer, A., Farkas, M.: Hemagglutinins among higher fungi. J. of Immunology 70, 198; 1953.
2. Elo, J., Estola, E., Malmström, N.: On phytagglutinins present in mushrooms. Ann. med. biol. exper. Fenn. 29, 297; 1951.
3. Ford, W. W.: The toxins and antitoxins of poisonous mushrooms. J. infect. dis. 3, 191; 1906.
4. Ford, W. W.: On the presence of hemolytic substances in edible fungi. J. infect. dis. 4, 434; 1907.
5. Friedberger, E., Brossa, G. A.: Über die Wirkung von Pilzextrakten. Z. Immunitätsf. 15, 506; 1912.
6. Galli-Valerio, B., Bornard, M.: Hämagglutinine und Hämolsine in getrockneten Pilzen. Z. Immunitätsf. 25, 154; 1916.
7. Krüpe, M.: Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper. Stuttgart 1956.

8. R a s z e j a , S.: Diagnostyka śmiertelnych zatruc piestrzenicą (*Gyromitra esc.*) Patologia Pol. 10, 35; 1959.
9. R a s z e j a , S.: Histologische Untersuchungen der Leber bei Pilzvergiftungen. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 50, 417; 1960.
10. R a s z e j a , S.: Rozpoznanie zatruc grzybami i ich znaczenie sądowolekarskie. Arch. med. sąd. 15, 109; 1963.
11. R a s z e j a , S.: Über spezifische Phyttagglutinine aus *Laccaria laccata v. proxima*. Z. Ärztl. Fortbild. 58, 14; 1964.
12. R a s z e j a , S.: Eine neue Methode zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblutspuren unter Anwendung eines artspezifischen Phyttagglutinationsinhibitors. Z. Ärztl. Fortbild. 58, 14; 1964.
13. R a s z e j a , S.: Zastosowanie hemaglutynin i hemolizyn otrzymanych z grzybów wyższych do badań sądowo-lekarskich (Application of mushrooms in the medico-legal investigation), Medycyna Dośw. XXVIII, 217; PTPN Poznań 1964.
14. T é t r y , A., S u t t o n , E., M o u l l e c , J.: Mise en évidence d'une phytoagglutinine spécifique anti-A₁ chez le champignon *Clitocybe nebularis*. Comptes rendus 237, 1566; 1953.
15. T é t r y , A., S u t t o n , E., M o u l l e c , J.: Présence d'une phytoagglutinine spécifique anti-O chez le champignon Ascomycète *Xylaria polymorpha*. Comptes rendus 238, 277; 1954.

Anschrift des Verfassers: Doz. Dr. med. Stefan R a s z e j a , Gdańsk, ul. Debinki 7 (Institut f. gerichtl. Medizin der Med. Akademie) — Polen.