

ELISA - ein Nachweisverfahren bei Knollenblätterpilzvergiftungen

Ein schriftliches Interview von **Harry Andersson, Braunschweig**, mit **Dr. Herbert Desel**, dem stellvertretenden Leiter des Giftinformationszentrums-Nord der Länder Bremen, Hamburg, Niedersachsen und Schleswig-Holstein in Göttingen und Laborleiter im Labor der Arbeitsgruppe Klinisch-toxikologische Dienstleistungen im Bereich Humanmedizin der Universität Göttingen.

Andersson: Bei Verdacht auf Knollenblätterpilzvergiftung oder um genau zu sein, bei Verdacht auf Pilzvergiftung mit amanitinhaltigen Pilzen wie *Galerina marginata*, *Lepiota*-Arten oder eben *Amanita phalloides*, *A. verna* oder *A. virosa* wurde bisher als Nachweis ein Radioimmuntest (radioimmuno assay, kurz RIA) eingesetzt. Dieser Test stand aber nur in der Haupt-Pilzsaison zur Verfügung. Das hat vermutlich mit der Haltbarkeit und den Kosten zu tun? Aus der Erfahrung wissen wir, dass sich Pilze aber nicht immer an das Lehrbuchwissen halten und oftmals früher als angenommen erscheinen. Auch treiben viele Pilzsammler Vorratswirtschaft durch Einkochen oder Einfrieren, so dass mit Vergiftungen auch außerhalb der Hauptsaison gerechnet werden muss.

Dr. Desel: Ein Radioimmuntest basiert auf dem Nachweis von Radioaktivität. Aus technischen Gründen ist diese Radioaktivität nur kurzzeitig „haltbar“, d.h. das radioaktive Material (Isotop) zerfällt bei Lagerung schnell und macht den Test unbrauchbar. Der von Ihnen angesprochene Amanitin-Radioimmuntest der Firma Bühlmann Laboratories AG, Allschwil (Schweiz), war nach Lieferung nur ca. 2-3 Monate nutzbar. Der Hersteller bot den Test nur in den Sommer- und Herbstmonaten, etwa in der Zeit von Juli bis November an. Bei Kosten in der Größenordnung von ca. 1000 DM pro Satz Testchemikalien wurde dieser Zeitraum von vielen Labor aus Gründen geringer Nachfrage weiter eingeschränkt. D.h. in den Randmonaten waren nur wenige Labors messbereit, außerhalb der Saison kein Labor. Dieser missliche Zustand führte in den letzten Jahren zur Entwicklung von sehr aufwändigen chromatographischen Verfahren (z.B. LC-MS) zum Nachweis von Amanitinen in einzelnen Speziallabors, die in den seltenen Einzelfällen ausserhalb der Saison eingesetzt werden konnten.

Andersson: Der uns allen bekannte Dr. R. Flammer hat in der Schweizerischen Zeitschrift für Pilzkunde (SZP) massiv den Einsatz des Amanit-

in-ELISA-Test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), der ebenfalls von der Firma Bühlmann Laboratories AG hergestellt wird, bei einer vermuteten Knollenblätterpilzvergiftung empfohlen. Ist RIA damit vollständig abgelöst oder existieren beide Nachweisverfahren nebeneinander?

Dr. Desel: Die Fa. Bühlmann hat den Amanitin-RIA bereits in der Saison 2001 nicht mehr angeboten. Alle Laboratorien, die zuvor den RIA einsetzten, verwendeten meines Wissens in der letzten Saison den ELISA, nachdem in einer Vergleichsuntersuchung dessen Verlässlichkeit geprüft worden war

Andersson: Können Sie bitte kurz und für den medizinischen Laien den Amanitin-ELISA-Test beschreiben:

Dr. Desel: ELISA-Tests haben sich seit mehreren Jahren bewährt und werden heute z.B. oft als Suchtest für verschiedene Suchstoffe eingesetzt. Das Testprinzip ist nicht einfach, ich will versuchen es zu erklären: Es beruht prinzipiell, wie der RIA, auf der chemischen Reaktion zwischen der nachzuweisenden Substanz (hier einem Amanitin) und einem spezifischen Antikörper gegen diese Substanz. Antikörper sind Proteine, sie binden z.B. die Amanitine auch in niedriger Konzentration und im Gemisch mit vielen Begleitstoffen ganz gezielt.

Beim ELISA werden an einer Oberfläche gebundene Antikörper und die Probe, die möglicherweise Amanitin(e) enthält, sowie eine Lösung mit chemisch verändertem Amanitin zusammengegeben. Dabei bilden Antikörper und Amanitin eine stabile Verbindung, jeder Antikörper bindet zwei Amanitin-Moleküle.

Ist nun kein Amanitin in der zu untersuchenden Probe enthalten, so binden die Antikörper nur das chemisch veränderte, zugegebene Amanitin. Überschüssiges Amanitin wird abgewaschen. An das Antikörper-gebundene, chemisch veränderte Amanitin bindet man im nächsten Schritt ein Enzym. Anschließend wird überschüssiges, nicht gebundenes Enzym abgewaschen. Das verbliebene, gebundene Enzym kann schließlich eine

Farbreaktion katalysieren (ermöglichen), die man mittels eines Photometers nachweisen kann.

Ist nun viel Amanitin in der zu untersuchenden Probe enthalten, so binden die Antikörper vorzugsweise dieses Amanitin, das chemisch veränderte, zugegebene Amanitin hingegen kaum mehr. An das unveränderte Amanitin aus der Probe kann das Enzym nicht binden, daher kann insgesamt weniger Enzym gebunden werden und letztlich wird die Farbreaktion schwächer. Zusammengefasst heisst das: Viel Amanitin in der Probe verursacht ein kleines Farbsignal, kein oder wenig Amanitin verursacht ein starkes Farbsignal. Durch Untersuchung von Testlösungen mit bekanntem Amanitingehalt wird das System geeicht, sodass auch zuverlässig quantitative Aussagen möglich sind.

Andersson: Vermutlich werden nicht alle Krankenhäuser den Amanitin-ELISA vorrätig halten?

Dr. Desel: Nein, der Test wird aus Kostengründen nur in wenigen klinisch-toxikologischen Speziallabors verfügbar gehalten.

Andersson: Falls ELISA nicht vorrätig ist, kann es zu jeder Tages- und Nachtzeit beschafft werden? Innerhalb welcher Zeit?

Dr. Desel: Nein, die Lieferung und der Aufbau eines solchen Tests in einem Labor dauert im günstigsten Fall einige Tage. Den Giftinformationszentren sind allerdings die Labors in Deutschland und im benachbarten Ausland bekannt, die den Test vorrätig halten und an die im Notfall - meist rund um die Uhr - die Probenmaterialien gesandt werden können.

Andersson: Wie lange ist ELISA haltbar und wie steht es mit den Kosten?

Dr. Desel: Mit einem ELISA-Testkit können eine größere Zahl von Untersuchungen und Eichmessungen durchgeführt werden. Der ELISA ist unangebrochen längere Zeit haltbar, nach Anbruch allerdings nur einige Monate. Die Kosten für das Labor liegen in der gleichen Größenordnung wie die Kosten des RIA. Wie die Kosten an die anfordernden Kliniken weitergegeben werden, wird sehr unterschiedlich gehandhabt.

Aus offensichtlichen Gründen ist es für jedes Labor auch zukünftig rein ökonomisch gesehen sehr unattraktiv, einen Amanitin-ELISA ausserhalb der Saison wegen eines Einzel-Verdachtsfalles anbrechen zu müssen.

Andersson: Kann ein Amanitin-ELISA von jedem Arzt in jedem Krankenhaus und zu jeder Tageszeit durchgeführt werden oder benötigt man ei-

ne spezielle Ausbildung oder besondere Einrichtungen?

Dr. Desel: Eine längere Ausbildung ist sicher nicht erforderlich, allerdings ist eine gewisse praktische Laborerfahrung und vor allem eine praktische Vertrautheit mit dem Test beim Durchführenden erforderlich, um im Notfall ein verlässliches Messergebnis zu gewinnen. Zudem benötigt man ein spezielles Photometer, welches allerdings in vielen Kliniken verfügbar sein könnte. Ein Arzt oder eine Laborfachkraft, die den Test zuvor nicht kennt, wird den Test im Notfall nicht durchführen können und wollen.

Andersson: In welchem Stadium der vermasslichen Vergiftung macht es Sinn, ELISA einzusetzen?

Dr. Desel: Am verlässlichsten ist der Test in der Zeit 6 - 18 Stunden nach der Pilzmahlzeit durch Untersuchung im Urin. In der übrigen Zeit kann ein negatives Messergebnis auch bei Vorliegen einer Vergiftung vorkommen.

Andersson: Nach Produktinformationen beträgt die Zeit bis zum Ergebnis eine Stunde.

Wird diese doch beeindruckend kurze Zeitspanne in der Praxis bestätigt?

Dr. Desel: Im Prinzip ja, wenn auch eine Stunde sehr knapp gerechnet ist. Da die Tests nur an wenigen Stellen durchgeführt werden, wird die meiste Zeit unserer Erfahrung nach für den Probentransport benötigt. Rechnet man die Zeit für die Organisation des Transportes und der Messung hinzu, so fällt die erforderliche Laborzeit tatsächlich meist kaum ins Gewicht.

Andersson: Als Amanitin-Nachweis gibt es neben dem ELISA noch das LC-MS-Verfahren. Wo liegen die Vorteile des ELISA gegenüber dieser anderen Methode?

Dr. Desel: Das LC-MS-Verfahren ist technisch weit aufwändiger und ist nur in sehr wenigen Speziallabors dauerhaft verfügbar.

Andersson: Wenn wir über Vorteile reden, sollten wir auch die Schwachstellen von ELISA ansprechen. Ich weiß, daß ELISA das a- und b-Amanitin nachweist, das b-Amanitin jedoch nicht erfasst. Das scheint zur Zeit nicht von Bedeutung, da Giftpilze, die nur b-Amanitin enthalten, bisher nicht bekannt sind. Aber vor Überraschungen ist man natürlich nie sicher, siehe Grünling. Wo sehen Sie sonst mögliche Probleme in der Anwendung von ELISA?

Dr. Desel: Im Vergleich mit den anderen erprobten Methoden gibt es meines Wissens keine gravierenden Nachteile. In ungewöhnlichen Fällen

werden sich die Labors bemühen, eine zweite Messung mit anderer Methode durchzuführen (oder durchführen zu lassen). Technisch kann es bei der Umstellung des Messverfahrens natürlich zu Anlaufschwierigkeiten in einzelnen Labors kommen. Von ernsthaften Problemen habe ich allerdings bisher nichts gehört.

Andersson: Der häufig zitierte, in der Praxis aber meist wenig hilfreiche Zeitungspapiertest kann zu falsch-positiv Resultaten führen. Ist das bei ELISA auch möglich?

Dr. Desel: Grundsätzlich arbeitet kein Test völlig fehler- und störungsfrei: jeder Test kann zu falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen führen. Von der Aussagekraft her ist der ELISA aus methodischen Gründen sicherlich sehr viel größer als der unzuverlässige Zeitungspapiertest.

Andersson: Kann das Giftinformationszentrum dem Arzt oder der Ärztin im Krankenhaus telefonisch konkrete Hilfestellung bei einer Knollenblätterpilzvergiftung und der Anwendung von ELISA geben?

Dr. Desel: Natürlich werden die Giftinformationszentren häufig von den behandelnden Ärztinnen und Ärzten zum diagnostischen und therapeutischen Vorgehen bei akuten Knollenblätterpilzvergiftungen befragt. Wir helfen durch die Weitergabe der neuesten Erkenntnisse zu spezifischen medizinischen Maßnahmen. Dazu gehören auch Antworten auf die Fragen, ob und wann ein Labortest sinnvoll ist und wie das nächstgelegene messbereite „Amanitin-Labor“ erreichbar ist.

Andersson: Würden Sie bei Vorliegen einer Pilzvergiftung, deren auslösende Art/Arten unbekannt sind, empfehlen, den ELISA vorsichtshalber auf jeden Fall durchzuführen?

Dr. Desel: Oft aber sicher nicht in jedem Fall einer Pilzaufnahme. Wir prüfen jeden solchen Einzelfall nach Vorgeschichte, aufgenommenen Dosis, Zeit seit der Einnahme und Krankheitssymptomatik im Verlauf sorgfältig auf die Notwendigkeit einer Untersuchung. Bei einer massiven Magen-Darm-Symptomatik nach einer Pilzmahl-

zeit raten wir jedoch praktisch immer zu einer erweiterten Diagnostik, sei es zur Hinzuziehung einer oder eines Pilzsachverständigen oder zur Durchführung einer Laboruntersuchung auf Amanitine, mitunter auch zu beidem.

Andersson: Die Erhaltung des Lebens und der Gesundheit des Patienten steht natürlich an erster Stelle. Aber um auch eine Vorstellung von den Kosten einer Pilzvergiftung zu bekommen, nehmen wir einmal eine Knollenblätterpilzvergiftung und deren klinische Behandlung ohne Lebertransplantation an. In welchem Kostenrahmen bewegen wir uns dabei?

Dr. Desel: Die Kosten werden wesentlich durch die Dauer der stationären Behandlung im Krankenhaus bestimmt. Bei einem Tagessatz von beispielsweise 250 Euro können so bei leichten Vergiftungen etwa 1000 Euro, bei schweren Vergiftungen auch ohne Transplantation leicht 3500 Euro an Kosten entstehen.

Andersson: Als Pilzsachverständiger kann ich häufig sehr schnell aus Putzabfällen, Resten der Mahl-

zeit oder aus Erbrochenem die in Frage kommenden Pilzarten makroskopisch oder mikroskopisch ermitteln, wenn mir das Untersuchungsmaterial vorliegt. Kommen wir also zu des Pudels Kern. Macht ELISA den Pilzsachverständigen in der Diagnostik überflüssig?

Dr. Desel: Sicher nicht! Der Pilzsachverständige kann schon sehr früh eine Untersuchung anstellen und ein weitgehend zuverlässiges Untersuchungsergebnis gewinnen, wodurch frühzeitigere Entscheidungen über die weitere Therapie auf sicherer Grundlage möglich werden.

Andersson: Ich glaube, wir wünschen uns alle in der kommenden Saison keine oder nur ganz wenige Pilzvergiftungen. Aber falls doch, gibt es schließlich das Giftinformationszentrum, die Pilzsachverständigen und den ELISA-Test. Ich bedanke mich ganz herzlich, dass Sie sich die Zeit für meine Fragen genommen haben.



Kegelhütiger Knollenblätterpilz
Amanita virosa Foto: Fredi Kasperek