



EVALUATION OF THE DIAGNOSTIC USEFULNESS OF AMANITIN DETERMINATION BY ENZYME-LINK IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Ewa GOMÓŁKA^{1,2}, Dorota SZPAK¹, Agnieszka MORAWSKA¹

¹ Department of Toxicology and Environmental Disease, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Kraków, Poland

² Laboratory of Toxicology, Ludwik Rydygier Specialist Hospital, Kraków, Poland

Abstract

Accidental consumption of poisonous species of wild mushrooms may have tragic consequences. Rapid and reliable differential diagnosis in cases of accidental consumption enables ascertainment of whether *Amanita phalloides* poisoning has occurred and hence early implementation of treatment, before liver and kidney failure occur. The aim of the study was to show the usefulness of amanitin determination in the diagnosis and treatment of patients with suspected poisoning by these mushrooms. The medical histories of patients with suspected poisoning treated at the Toxicology Clinic, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Krakow (KT CM UJ) in the years 2007–2009 were analysed. Amanitins in urine were determined by the ELISA method, making use of reagents produced by Bühlmann. Amanitin determination was performed on 55 patients, of whom 28 were admitted to KT CM UJ. In 14 cases, phalloides syndrome was diagnosed. In this group, the result of amanitin determination was positive in 11 patients (>5 ng/ml). A negative (<1.5 ng/ml) and doubtful result (1.5–5 ng/ml) was ascertained in patients with a diagnosis of gastritis, gallstones (cholelithiasis), and also after consumption of *Amanita*, when urine was collected for analysis longer than 48 hours after consumption of mushrooms. Determination of amanitin in urine allowed us to distinguish phalloides syndrome from nonspecific gastroenteritis. Quick commencement of treatment contributed to a better prognosis for poisoned patients.

Key words

Mushroom poisoning; Phalloides syndrome; Amanitin; ELISA.

Received 4 August 2010; accepted 22 November 2010

1. Introduction

Poisoning by forest mushrooms constitutes a significant problem in Poland during the summer-autumn season [14, 25]. Out of many species of poisonous mushrooms, the most dangerous are: the death cap (*Amanita phalloides*), the fool's mushroom (*Amanita verna*) and the European destroying angel (*Amanita virosa*). Poisoning by these mushrooms carries a high mortality rate, since (specific) symptoms of poisoning occur late, usually when irreversible liver damage has already occurred, whereas initial symptoms are usu-

ally nonspecific – in the form of gastroenteritis. The mentioned species of mushrooms contain amatoxins (bicyclic octapeptides, which are rapidly absorbed through the gastrointestinal tract and cause damage to cells of the liver, kidneys and pancreas), phallotoxins (bicyclic heptapeptides, which are poorly absorbed through the gastrointestinal tract and irritate the mucous membrane of the gastrointestinal tract) and also virotoxins (monocyclic heptapeptides of undefined toxicity) [22]. Amatoxins include -, -, -, - and -amanitin, amanin, amaninamide, amanullin, amanullinic acid and proamanullin. These are compounds of

molecular weight of approx. 900, of which the best known are -, - and -amanitin. Their structural formulae are shown in Figure 1 [15]. The presence of -, - and -amanitin has been confirmed in 9 species of *Amanita* and also in 24 species of *Lepiota* and 9 species of *Galerina* [3, 7, 15, 19, 22, 23]. The percentage of -, - and -amanitin in the sporocarp (fruiting body) of *Amanita phalloides* is respectively 43%, 49% and 8% [27]. The content of amatoxin in mushrooms depends on the species of mushroom, the conditions in which it grows (e.g. soil type) and degree of development of the sporocarp (immature ones contain less toxins) [7, 29]. The distribution of amatoxins in mushrooms is uneven. The cap, hymenophore and ring contain the most amanitins, whilst the stem and volva mainly contain phallotoxins [7].

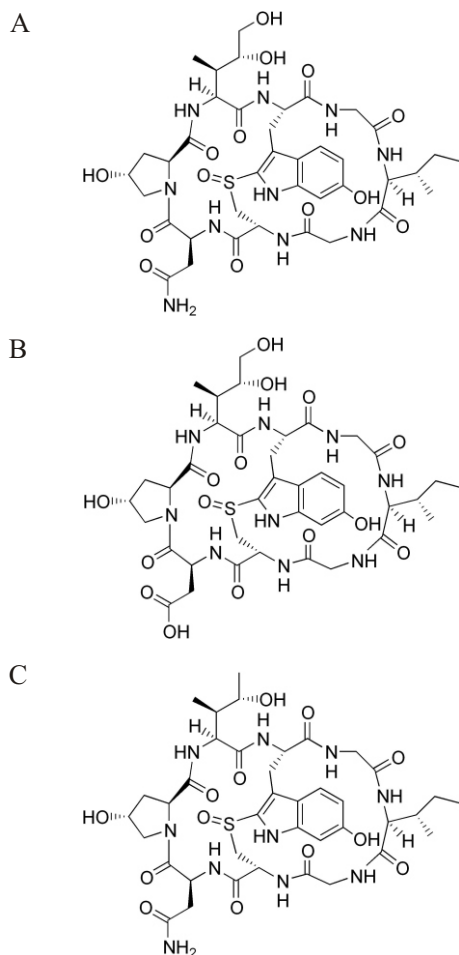


Fig 1. Structure of -amanitin (A), -amanitin (B) and -amanitin (C).

A toxic dose of amanitin is 5–15 mg, which corresponds to 1 *Amanita phalloides* sporocarp, 15–20 sporocarps of *Galerina* species or 30 *Lepiota* species.

A lethal dose of amanitin for an adult person is about 0.1 mg/kg body mass [15, 22].

Amanitins have a toxic effect on cells of parenchymal organs by binding to RNA polymerase II, which leads to impaired protein synthesis and cell death [2, 12, 15, 30]. Amanitins are excreted by the kidneys and can be detected in urine 3–4 hours after eating *Amanita*; in the blood they can be detected only in the first 24 hours due to the short biological half-life $T_{1/2} = 2-3$ h [12]. The concentration of amanitins in body fluids (serum, urine) depends on the length of time that has passed between consumption of mushrooms and collection of material.

Due to a lack of specific symptoms in the early stage of poisoning, diagnosis is usually based on a medical interview and results of biochemical tests. Information such as the species of consumed mushrooms and the time that elapsed between consumption and occurrence of first symptoms is important. During the first 24 hours and at the beginning of the second 24 hours, biochemical parameters (alanine aminotransferase – ALT, asparagine aminotransferase – AST, bilirubin, ammonia and clotting factors) do not usually deviate from the norm, and their build-up occurs over time, correlating with a worsening clinical state of the patient. Toxicological determinations enable early differential diagnosis. In this case, mycological analysis of vomit or stomach rinsings with the aim of identifying fungal spores is ordered. Determination of the concentration of amanitins in body fluids is also possible [1, 23]. Amanitins can be determined by chromatographic methods such as high performance liquid chromatography (HPLC) [6, 7, 13, 18, 28], high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection (HPLC-ECD) [5], liquid chromatography with mass detection (LC-MS, LC-MS-MS) [9, 16, 17]; by capillary electrophoresis methods (CE): capillary electrophoresis with mass detection (CE-MS) [23, 24], capillary electrophoresis with diode detection (CE-DAD) [3] and also by immunological methods: radioimmunoassay (RIA) [3] and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [1, 20]. Liquid chromatography and capillary electrophoresis enable determination of -, - and -amanitins and certain phallotoxins (phalloidin, phalloidin) in body fluids and in tissues of mushrooms. These methods are usually unavailable in medical laboratories, and the long duration of the determinations stemming from the necessity to extract biological material makes it more difficult to apply them in quick diagnosis of acute poisonings. Immunological methods (RIA and ELISA) enable determination of - and also -amanitin in body fluids without the necessity of performing extraction. The

RIA method is based on the reaction of amanitins with labelled antibodies ^{125}I and for this reason is performed only in laboratories adapted to work with isotopes [15]. ELISA is a method that is universally applied in medical laboratories. This method makes use of the enzymatic reaction of amanitins, which compete with labelled antigens to bind with antibodies that have been immobilized on the surface of the dish [1, 15].

However, the usefulness of determining amanitins is still in doubt. The literature presenting experiences of acute intoxication centres in Poland in the process of diagnosing patients poisoned with mushrooms mainly concerns identification of fungal spores [14, 25]. However, determination of amanitins may turn out to be unusually important in situations where there is a suspicion of poisoning by amatoxins from *Amanita phalloides* (death cap). Patients' prognosis depends on the time that has elapsed from consumption of mushrooms to commencement of hospitalisation. Shortening the time of waiting for diagnosis may affect the success of the treatment, and delaying the start of therapy increases the risk of occurrence of organ damage and is linked with high mortality [14, 21, 30].

The aim of the study was to determine the usefulness of the ELISA method in the determination of amanitin in the process of diagnosing and treating patients suspected of having been poisoned by *Amanita phalloides*.

2. Materials and methods

The medical histories of patients treated for mushroom poisoning in the Toxicology Clinic of Collegium Medicum, Jagiellonian University (KT CM UJ) and also data from the Workshop of Analytical Toxicology and Monitored Therapy of Collegium Medicum, Jagiellonian University (PTAiTM CM UJ) from the years 2007–2009 were analysed. Amanitin was determined in urine and blood samples collected when patients were admitted to hospital.

Amanitin was determined by the ELISA method. Reagents manufactured by Bühlmann were used. The specificity of the method is: 100% for α -amanitin, 90% for β -amanitin and also 0.1% for γ - and δ -amanitin. Validation parameters of the method of analysing urine, provided by the manufacturer of the test: range of calibration 1–100 ng/ml; sensitivity 0.22 ng/ml; precision: repeatability in series 6.3%, repeatability between series 7.3%; recovery 99.9%. In accordance with the test producer's recommendations, a concentration of 1.5 ng/ml was assumed as the cut-off value. Concentrations of amanitins in the range 1.5–5 ng/ml

were interpreted as doubtful results (for further diagnosis and observation of patients). Amanitin results above 5 ng/ml were interpreted as positive (confirmation of consumption of poisonous species of *Amanita*).

3. Results

In the years 2007–2009 at PTAiTM CM UJ, amanitins were determined in 55 patients suspected of poisoning by *Amanita phalloides*. In particular years, the number of patients was: 2007 – 13, 2008 – 23, 2009 – 19. On the basis of the interview, the clinical state and also results of toxicological determinations (concentration of amanitins, identification of fungal spores), 28 persons suffering from mushroom poisoning were admitted to the KT CM UJ in the studied period. Three patients were admitted to the KT CM UJ on the basis of a positive result of mycological determinations carried out in referring hospitals. In two of them, determination of amanitins and clinical observation allowed ruling out of poisoning by *Amanita phalloides*. In accordance with data obtained from the interviews, in the hospitalised group, the most frequently consumed mushrooms were *Russula* (46%), the parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) (25%), field mushroom (*Agaricus arvensis*) (7%), and in individual cases – honey mushrooms (*Armillariella mellea*) and the saffron milk cap (*Lactarius deliciosus*). In 4 cases, it was not possible to establish the species of mushroom, but they had a lamellate hymenophore. Data obtained from interviews concerning the type of consumed mushrooms, information concerning the time that had elapsed from consumption of mushrooms to performing of toxicological analyses, results of amanitin determinations and also final diagnoses are presented in Table I.

Amanitin was determined in urine in all patients, and it was also determined in the serum of four patients who had come to hospital during the first 24 hours after consumption of mushrooms. In 12 cases (43%), results of determination of amanitins in urine were negative, in 1 case the result was doubtful (clinical observation allowed poisoning to be ruled out). In the remaining 14 cases (50%), the presence of amanitins at a concentration of >5 ng/ml correlated with diagnosis of phalloides syndrome. Only in one case – when determination was carried out on the 8th day after consumption of mushrooms – was phalloides syndrome diagnosed in the absence of amanitin in urine. In one case, obtaining of a negative result of determination ruled out *Amanita phalloides* poisoning and pointed to the necessity to broaden the diagnostic procedure (botulism was diagnosed).

TABLE I. MUSHROOM INTOXICATION HISTORY, AMANITIN CONCENTRATION IN URINE AND SERUM, AND FINAL DIAGNOSIS OF PATIENTS HOSPITALIZED AT THE DEPARTMENT OF TOXICOLOGY OF COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY IN KRAKÓW IN 2007–2009

No.	Species of consumed mushrooms (data from patients' histories)	Time from mushroom consumption to first gastric symptoms [h]	Amanitin concentration [ng/ml]		Diagnosis
			Serum	Urine	
1	<i>Russula species</i>	23		>5	<i>Amanita phalloides</i> syndrome
2	<i>Agaricus arvensis</i>	52		<1.5	<i>Amanita phalloides</i> syndrome
3	<i>Agaricus arvensis</i>	36		>5	<i>Amanita phalloides</i> syndrome
4	<i>Russula species</i>	>60		<1.5	<i>Amanita phalloides</i> syndrome
5	<i>Craterellus cornucopioides</i>	22		<1.5	Gastritis
6	<i>Russula species</i>	11		<1.5	Gastritis
7	Gill-bearing hymenophores mushrooms	24	<1.5	>10	High degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
8	Gill-bearing hymenophore mushrooms	24		>10	Medium degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
9	<i>Macrolepiota procera</i>	24	<1.5	>10	High degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
10	<i>Macrolepiota procera</i>	24	<1.5	>10	High degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
11	Gill-bearing hymenophore mushrooms	45		>5	High degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
12	<i>Russula species</i>	46		1.5–5	High degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
13	<i>Lactarius deliciosus</i>	24		<1.5	Gastritis
14	Gill-bearing hymenophore mushrooms	24		<1.5	Botulism
15	<i>Russula species</i>	9		>10	<i>Amanita phalloides</i> syndrome
16	<i>Russula species</i>	15	<1.5	<1.5	Gastritis
17	<i>Russula species</i> , <i>Macrolepiota procera</i>	32		>10	Medium degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
18	<i>Macrolepiota procera</i>	24		<1.5	Gastritis
19	<i>Macrolepiota procera</i>	22		<1.5	Gastritis
20	<i>Macrolepiota procera</i>	25		<1.5	Gastritis
21	<i>Macrolepiota procera</i>	29		<1.5	Gastritis
22	<i>Armillariella mellea</i>	48		1.5–5	Gastritis
23	<i>Russula species</i> , <i>Macrolepiota procera</i>	48		1.5	Gastritis
24	<i>Russula species</i>	24		<1.5	Gastritis
25	<i>Russula species</i>	50		5–10	<i>Amanita phalloides</i> syndrome
26	<i>Russula species</i>	50		>10	High degree <i>Amanita phalloides</i> syndrome
27	<i>Russula species</i>	78		1.5–5	Cholelithiasis
28	<i>Russula species</i>	50		1.5–5	Gastritis

Results of determinations of amanitins were highest (from 10 to >100 ng/ml) in patients poisoned by *Amanita phalloides* from whom urine was collected for analysis during the first (24 h) day following consumption of mushrooms. In patients with diagnosed phalloides syndrome who were accepted on the second day, concentrations of amanitin varied between 5.8 ng/ml and 54 ng/ml. On the third and successive days, the concentrations of amanitin in patients with phalloides syndrome did not differ from levels ascertained in patients with other diagnoses (gastritis, cholelithiasis).

The clinical usefulness of determining amanitins in blood serum was not demonstrated. All results of determinations of amanitins in blood serum were negative, including amongst patients with a diagnosis of severe phalloides syndrome (Table I).

Assessment of the degree of severity of *Amanita phalloides* poisoning was based on the PSS (poisoning severity score) scale. Severe (high degree) poisoning was diagnosed in the case of increase in activity of ALT and AST enzymes exceeding the norm by 50 times (normal levels of ALT: 5–40 U/l, normal levels of AST: 5–40 U/l) or increase in activity of biochemical factors, such as clotting factors, ammonia and clinical symptoms of liver failure. Medium severity poisoning was diagnosed in the case of increase of activity of AST and ALT enzymes by 5 to 50 times above the norm (but without disturbances of biochemical factors such as clotting indicators and ammonia). In 12 hospitalised patients, in whom the level of amanitins in urine exceeded 5 ng/ml, additional treatment in the form of Legalon (Silibinin) was administered. In most cases, a concentration of amanitins in urine above 10 ng/ml was linked with diagnosis of severe phalloides syndrome. Due to progressive liver damage, three persons were referred to transplant centres for liver transplants. Two amongst the 28 treated patients died. The deaths related to persons who had been admitted to KT CM UJ a long time (exceeding 3 days) after consumption of mushrooms.

4. Discussion

Liquid chromatography and capillary electrophoresis enable determination of amatoxins and phallotoxins contained in poisonous species of mushrooms. The advantage of these methods is the possibility of differentiating between particular forms of amanitins and certain phallotoxins and also the low limit of detection (*LOD*). According to literature data, *LOD* values for amanitins are from 2 to 10 ng/ml for HPLC [7, 13, 28]; from 1.5 to 100 ng/ml for CE [3, 23, 24]; from

0.26 to 2.5 ng/ml for LC-MS and LC-MS-MS methods [9, 17]. Unfortunately the usefulness of the mentioned methods is limited due to the time-consuming nature of the procedures (the necessity to extract studied samples), and also the lack of access to specialised measuring apparatus.

The ELISA method used in the above work enabled summary determination of α - and β -amanitin subtypes. ELISA is a method that is available in many medical laboratories, does not require preliminary extraction of the studied material, is rapid and therefore very useful in diagnosis of patients. The cut-off value recommended by the producer is 1.5 ng/ml, which means that this is a method that is sufficiently sensitive to determine amanitin in urine.

Amanitins were detected in fruiting bodies of *Amanita phalloides*, amongst which the α , β and γ forms dominated [22, 27]. The ELISA method, which is specific only in relation to α - and β -amanitins, worked well in the diagnosis of patients poisoned by mushrooms. Lack of specificity in relation to γ -amanitin did not affect the usefulness of the applied method, and results of determinations correlated with medical diagnoses. Experience showed that mycological analyses were less reliable, did not allow the unambiguous ruling out or confirmation of consumption of poisonous species of mushrooms. Besides, examination of mushroom spores requires great experience and often verification by two people, which may lengthen the time of waiting for a result [14, 26]. In 3 cases in referring hospitals, stomach rinsings of patients poisoned by mushrooms were analysed for the presence of *Amanita* spores and a decision to refer patients to KT UJ CM was taken on the basis of positive results. Only in one case did verification of the mycological result on the basis of determination of amanitins and also the clinical course of the poisoning confirm a diagnosis of phalloides syndrome. However, mycological determination has considerable value when examining unconsumed mushrooms (fresh, dried and processed ones), which is helpful when diagnosing poisoning not only by cytotoxic mushrooms (*Amanita phalloides*, *Amanita virosa*, *Amanita verna*), but also by neurotoxic and hallucinogenic ones and ones that cause only gastric symptoms [14, 26].

Both the patient interview and the time of occurrence of first gastrointestinal symptoms have considerable significance in the diagnosis of phalloides syndrome. Mushrooms such as *Russula*, parasol mushrooms, field mushrooms and honey mushrooms have most frequently been confused with poisonous species of *Amanita*, which is confirmed by reports from other centres [14]. Another factor influencing prognosis was

the long latency period of intoxication (6 to 12 h). The lack of significant changes in biochemical parameters in this period could be misleading, and delaying implementation of toxicological tests could lead to making later interpretation of results more difficult. Some authors suggest limiting the time period within which it is useful to collect a urine sample for amanitin determination to 35 hours from the time of consumption of mushrooms [4, 11]. At the end of the second (24 h) day after consumption of mushrooms, determination of amanitin in urine by the ELISA method indeed ceased to be justifiable. Concentrations of amanitin in urine of patients in whom phalloides syndrome was diagnosed were higher the earlier that urine was collected for analysis. Ascertainment of the presence of amanitin in urine in all cases was equivalent to diagnosis of phalloides syndrome. However, application of the ELISA method to determination of amanitin in blood serum did not enable diagnosis of poisoning due to the very rapid elimination of toxins [10, 12].

Analysing retrospective data from the interview, the clinical course and toxicological determinations, it can be stated that determination of amanitins in urine by the ELISA method is a reliable test that enables prognosis of the course of poisoning. Results of determinations were taken into account when making decisions about undertaking treatment with Legalon, when it had significant importance, i.e. up to 48 hours from the moment of consumption of mushrooms. The prognosis usually depended on the moment of commencing specific treatment and was most beneficial in the case of commencing hospitalisation on the first or second day. Fatal poisonings usually concerned patients admitted on the third and following days from the moment of consuming *Amanita phalloides*.

5. Conclusions

1. The ELISA method is a suitable method for summary determination of subtypes α - and β -amanitin for the purposes of diagnosis of patients poisoned by mushrooms.
2. Mycological examination of stomach rinsings is a form of analysis that is burdened by high error and has limited diagnostic value.
3. Determination of amanitins in urine in a period up to 48 hours from consumption of mushrooms is reliable, allowing prognosis of the course of poisoning and indicating the usefulness of undertaken treatment.

References

1. Abuknesha R. A., Maragkou A., A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of beta-amanitin in biological fluids, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, 379, 853–860.
2. Bonnet M. S., Basson P. W., The toxicology of *Amanita phalloides*, *Homeopathy* 2002, 91, 249–254.
3. Bruggemann O., Meder M., Freitag R., Analysis of amatoxins alpha-amanitin and beta-amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection, *Journal of Chromatography A* 1996, 744, 167–176.
4. Butera R., Locatelli C., Cocchini T. [et al.], Diagnostics accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study, *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 2004, 42, 901–912.
5. Defendenti C., Bonacina E., Mauroni M. [et al.], Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine, *Forensic Sciences International* 1998, 92, 59–68.
6. Dorizzi R., Michelot D., Tagliaro F. [et al.], Methods for chromatographic determination of amanitins and related toxins in biological samples, *Journal of Chromatography* 1992, 580, 279–291.
7. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F. [et al.], Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues, *Toxicon* 1993, 31, 803–807.
8. Enjalbert F., Rapior S., Nougier-Soule J. [et al.], Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis, *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 2002, 40, 715–757.
9. Filigenzi M. S., Poppenga R. H., Tiwary A. K. [et al.], Determination of alpha-amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 2784–2790.
10. Fineschi V., Di Paolo M., Centini F., Histological criteria for diagnosis of amanita phalloides poisoning, *Journal of Forensic Sciences* 1996, 41, 429–432.
11. Ganzert M., Felgenhauer N., Zilker T., Indication of liver transplantation following amatoxin intoxication, *Journal of Hepatology* 2005, 42, 202–209.
12. Jaeger A., Jehl F., Flesch F. [et al.], Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 1993, 31, 63–80.
13. Jehl F., Gallion C., Birckel P. [et al.], Determination of alpha-amanitin and beta-amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Analytical Biochemistry* 1985, 149, 35–42.
14. Kapala M., Nowacka A., Kicka M. [et al.], Mushroom (fungi) poisonings investigated at the regional centre of acute poisoning, Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec, Poland, *Problems of Forensic Sciences* 2008, 75, 282–293.
15. Mas A., Mushrooms, amatoxins and the liver, *Journal of Hepatology* 2005, 42, 166–169.

16. Maurer H. H., Kraemer T., Ledvinka O. [et al.], Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis. Studies on the detection of clobenzorex and its metabolites within a systematic toxicological analysis procedure by GC-MS and by immunoassay and studies on the detection of alpha- and beta-amanitin in urine by atmospheric pressure ionization electrospray LC-MS, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 1997, 689, 81–89.
17. Maurer H. H., Schmitt C. J., Weber A. A. [et al.], Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2000, 748, 25–35.
18. Mcknight T. A., Mcknight K. B., Skeels M. C., Amatoxin and phallotoxin concentration in amanita bisporigera spores, *Mycologia* 2010, 102, 763–735.
19. Muraoka S., Fukamachi N., Mizumoto K. [et al.], Detection and identification of amanitins in the wood-rotting fungi *Galerina fasciculata* and *Galerina helvoliceps*, *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, 4207–4210.
20. Parant F., Peltier L., Lardet G. [et al.], Phalloidin syndrome: role of Elisa-based assay for the detection of alpha- and gamma-amanitins in urine. Preliminary results, *Acta Clinica Belgica. Supplementum* 2006, 1, 11–17.
21. Piqueras J., Hepatotoxic mushroom poisoning: diagnosis and management, *Mycopathologia* 1989, 105, 99–110.
22. Poisindex, Micromedex Health Care System v. 2.00, Thomson Micromedex 2010.
23. Rittgen J., Putz M., Pyell U., Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection, *Electrophoresis* 2008, 29, 2094–2100.
24. Roninson-Fuentes V. A., Jaime-Sanchez J. L., Garcia-Aguilar L. [et al.], Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 47, 913–917.
25. Satora L., Non-specific mushroom poisoning, *Veterinary and Human Toxicology* 2004, 46, 224.
26. Satora L., Goszcz H., Ciszowski K., Poisoning resulting from the ingestion of mushrooms in Krakow, *Przegląd Lekarski* 2005, 62, 394–396.
27. Stijve T., Seeger T., Determination of alpha-, beta-, and gamma-amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) secr. from various origin, *Zeitschrift für Naturforschung Section C. Biosciences* 1979, 34, 1133–1138.
28. Tagliaro F., Schiavon G., Bontempelli G. [et al.], Improved high-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of alpha-amanitin in human plasma based on its voltammetric study, *Journal of Chromatography* 1991, 563, 299–311.
29. Vetter J., Toxins of *Amanita phalloides*, *Toxicon* 1998, 36, 13–24.
30. West P. L., Lindgren J., Horowitz B. Z., *Amanita smithiana* mushroom ingestion: A case of delayed renal and literature review, *Journal of Medical Toxicology* 2009, 5, 32–38.

Corresponding author

Dr Ewa Gomółka
Pracownia Toksykologii Analitycznej
i Terapii Monitorowanej CM UJ
PL 31-826 Kraków
Osiedle Złotej Jesieni 1
e-mail: egomolka@cm-uj.krakow.pl

OCENA WARTOŚCI DIAGNOSTYCZNEJ OZNACZANIA AMANITYN ZA POMOCĄ METODY IMMUNOENZYMOŚORBECYJNEJ (ELISA)

1. Wstęp

Zatrucia grzybami leśnymi stanowią w Polsce w okresie letnio-jesiennym istotny problem [14, 25]. Z wielu gatunków grzybów trujących najgroźniejsze są: muchomor sromotnikowy (*Amanita phalloides*), wiosenny (*Amanita verna*) i jadowity (*Amanita virosa*). Zatrucie nimi obarczone jest dużą śmiertelnością, ponieważ objawy zatrucia występują późno, zazwyczaj gdy doszło już do nieodwracalnego uszkodzenia wątroby, a początkowe dolegliwości są zwykle niespecyficzne i przybierają postać nieżytu żołądkowo-jelitowego. Wymienione gatunki muchomorów zawierają amatoksyny (bicykliczne oktapeptydy, które szybko wchłaniają się z przewodu pokarmowego i powodują uszkodzenie komórek wątroby, nerek oraz trzustki), fallotoksyny (bicykliczne heptapeptydy, które słabo wchłaniają się z przewodu pokarmowego i działają drażniąco na błonę śluzową przewodu pokarmowego) oraz wirotoksyny (monocykliczne heptapeptydy o nieokreślonej toksyczności) [22]. Do amatoksyn zalicza się -, -, -, -, -amanitynę, amaninę, amaninamid, amanulinę, kwas amanulinowy i proamanulinę. Są to związki o masie cząsteczkowej ok. 900, z których najlepiej poznano -, -i -amanitynę. Ich wzory strukturalne przedstawia rycina 1 [15]. Obecność -, -, i -amanityny potwierdzono w 9 gatunkach *Amanita sp.* a także w 24 gatunkach *Lepiota sp.* oraz 9 gatunkach *Galerina species* [3, 7, 15, 19, 22, 23]. Procentowy udział -, -, -amanityny w owocniku *Amanita phalloides* wynosi odpowiednio 43%, 49% i 8% [27]. Zawartość amatoksyn w grzybach zależy od gatunku grzyba, warunków jego wzrostu (np. rodzaju gleby) i stopnia rozwoju owocnika (nieodjrzałe zawierają mniej toksyn) [7, 29]. Rozkład amatoksyn w grzybach jest nierównomierny. Najwięcej amanityn zawierają kapelusz, hymenofor i pierścień grzyba, natomiast trzon i pochwa zawierają głównie fallotoksyny [7].

Dawka toksyczna amanityn wynosi 5–15 mg, co odpowiada 1 owocnikowi *Amanita phalloides*, 15–20 owocnikom *Galerina species* lub 30 *Lepiota species*. Dawka śmiertelna amanityn dla osoby dorosłej wynosi ok. 0,1 mg/kg m.c. [15, 22].

Amanityny działają toksycznie na komórki narządów mięsnych przez wiązanie się z polimerazą RNA II, co prowadzi do upośledzenia syntezy białek i śmierci komórek [2, 12, 15, 30]. Amanityny wydalane są drogą nerkową i można je wykryć w moczu już po 3–4 h od zjedzenia muchomora; w krwi mogą być wykryte tylko w pierwszej dobie ze względu na krótki biologiczny

okres półtrwania $T_{1/2} = 2-3$ h [12]. Stężenia amanityn w płynach ustrojowych (surowica, mocz) zależy od czasu, jaki minął od spożycia grzybów do pobrania materiału.

Z powodu braku specyficznych objawów w początkowym okresie zatrucia grzybami, rozpoznanie zwykle opiera się na wywiadzie lekarskim i wynikach badań biochemicznych. Istotne są takie informacje, jak gatunek spożytych grzybów oraz czas, jaki minął od spożycia do wystąpienia pierwszych objawów. W pierwszej i na początku drugiej doby parametry biochemiczne (aminotransferaza alaninowa – ALT, aminotransferaza asparaginianowa – AST, bilirubina, amoniak, parametry krzepnięcia) zwykle nie odbiegają od normy, a ich narastanie następuje w miarę upływu czasu, korelując z pogarszającym się stanem klinicznym pacjenta. Wczesną diagnostykę różnicową umożliwiają badania toksykologiczne. W tym wypadku zlecana jest analiza mikologiczna wymiocin bądź popłuczyn żołądkowych w celu identyfikacji zarodników grzybów. Możliwe jest też oznaczenie amanityn w płynach ustrojowych [1, 23]. Amanityny można oznaczać metodami chromatograficznymi, do których należy wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [6, 7, 13, 18, 28], wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją elektrochemiczną (HPLC-ECD) [5], chromatografię cieczową z detekcją mas (LC-MS, LC-MS-MS) [9, 16, 17]; metodami elektroforezy kapilarniej (CE): elektroforeza kapilarna z detekcją mas (CE-MS) [23, 24], elektroforeza kapilarna z detekcją diodową (CE-DAD) [3] oraz metodami immunologicznymi: radioimmunologiczną (RIA) [3] i immunoenzymosorbcyjną (ELISA) [1, 20]. Chromatografia cieczowa i elektroforeza kapilarna umożliwiają oznaczanie -, -, -amanityn i niektórych fallotoksyn (falloidyna, fallacydyna) w płynach ustrojowych oraz w tkankach grzybów. Metody te są zwykle niedostępne w laboratoriach medycznych, a czasochłonność oznaczenia wynikająca z konieczności ekstrakcji materiału biologicznego utrudnia ich stosowanie w szybkiej diagnostyce ostrych zatruc. Metody immunologiczne (RIA, ELISA) umożliwiają oznaczanie - oraz -amanityny w płynach ustrojowych bez konieczności prowadzenia ekstrakcji. Metoda RIA opiera się na reakcji amanityn z przeciwciałami znakowanymi ¹²⁵I i z tego względu wykonywana jest tylko w laboratoriach przystosowanych do pracy z izotopami [15]. ELISA to metoda powszechnie stosowana w laboratoriach medycznych. W metodzie tej wykorzystana jest enzymatyczna reakcja amanityn, które na zasadzie kompetycji ze znakowanymi antygenami rywalizują o wiązania z przeciwciałami unieruchomionymi na podłożu płytki [1, 15].

Przydatność oznaczania amanityny ciągle jednak budzi wątpliwości. Literatura przedstawiająca doświadczenia ośrodków ostrych zatruc w Polsce w procesie diagnozowania pacjentów zatrutych grzybami dotyczy głównie identyfikacji zarodników grzybów [14, 25]. Jednak oznaczenie amanityny może okazać się niezwykle ważne w sytuacjach, gdy istnieje podejrzenie zatrucia amatoksynami muchomora sromotnikowego. Rokowanie pacjentów zależy od czasu, jaki minął od spożycia grzybów do rozpoczęcia hospitalizacji. Skrócenie czasu oczekiwania na diagnozę może wpłynąć na skuteczność leczenia, a opóźnienie rozpoczęcia terapii zwiększa ryzyko wystąpienia uszkodzeń narządowych i wiąże się z dużą śmiertelnością [14, 21, 30].

Celem pracy było określenie przydatności metody ELISA do oznaczania amanityny w procesie diagnozowania i leczenia pacjentów podejrzanych o zatrucie muchomorem sromotnikowym.

2. Materiał i metody

Przeanalizowano historie chorób pacjentów leczonych z powodu zatrucia grzybami w Klinice Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (KT CM UJ) oraz dane Pracowni Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (PTAiTM CM UJ) z lat 2007–2009. Materiał do oznaczeń amanityny stanowiły próby moczu i krwi pobrane przy przyjęciu pacjentów do szpitala.

Amanityny oznaczano metodą ELISA. Korzystano z odczynników firmy Bühlmann. Specyficzność metody wynosi: 100% dla -amanityny, 90% dla -amanityny oraz 0,1% dla -i -amanityny. Parametry walidacji metody badania moczu podane przez producenta testu: zakres kalibracji 1–100 ng/ml; czułość 0,22 ng/ml; precyzja: powtarzalność w serii 6,3%, powtarzalność między seriami 7,3%; odzysk 99,9%. Zgodnie z zaleceniem producenta testów, za wartość odcięcia przyjęto stężenie 1,5 ng/ml. Stężenia amanityny w zakresie 1,5–5 ng/ml interpretowano jako wyniki wątpliwe (do dalszej diagnostyki i obserwacji pacjenta). Wyniki amanityny powyżej 5 ng/ml interpretowano jako pozytywne (potwierdzenie spożycia trujących gatunków muchomora).

3. Wyniki

W latach 2007–2009 w PTAiTM CM UJ oznaczono amanityny u 55 pacjentów podejrzanych o zatrucie muchomorem sromotnikowym. W poszczególnych latach liczba pacjentów wynosiła: 2007 – 13, 2008 – 23, 2009 – 19. Na podstawie wywiadu, stanu klinicznego oraz wyników badań toksykologicznych (stężenie amanityny, identyfikacja zarodników grzybów) do KT CM UJ przyjęto

w tym okresie 28 chorych zatrutych grzybami. Troje pacjentów zostało przyjętych do KT CM UJ na podstawie pozytywnego wyniku badań mikologicznych wykonanych w szpitalach kierujących. U dwojga z nich oznaczenie amanityny oraz obserwacja kliniczna pozwoliły na wykluczenie zatrucia muchomorem sromotnikowym. Zgodnie z danymi uzyskanymi z wywiadu, w grupie hospitalizowanych najczęściej spożywanymi grzybami miały być gołąbki (*Russula species*) (46%), kanie (*Macrolepiota procera*) (25%), pieczarki polne (*Agaricus arvensis*) (7%), w pojedynczych przypadkach – opieńki (*Armillariella mellea*) i rydze (*Lactarius deliciosus*). W 4 przypadkach nie udało się ustalić gatunku grzybów, ale miały one hymenofor blaszkowaty. Dane uzyskane z wywiadu dotyczące rodzaju spożytych grzybów, informacje o czasie, jaki minął od spożycia grzybów do wykonania badań toksykologicznych, wyniki oznaczeń amanityny oraz ostateczne rozpoznanie przedstawiono w tabeli I.

U wszystkich pacjentów oznaczono amanityny w moczu, a u czworga pacjentów, którzy zgłosili się do szpitala w pierwszej dobie od spożycia grzybów, oznaczono dodatkowo amanityny w surowicy krwi. W 12 przypadkach (43%) wyniki oznaczenia amanityny w moczu były ujemne, w 1 przypadku wynik był wątpliwy (tu obserwacja kliniczna pozwoliła na wykluczenie zatrucia). W pozostałych 14 przypadkach (50%) obecność amanityny w stężeniu >5 ng/ml korelowała z rozpoznaniem zespołu sromotnikowego. Tylko w jednym przypadku, gdy oznaczenie wykonano w 8 dobie od spożycia grzybów, rozpoznano zespół sromotnikowy przy nieobecności amanityny w moczu. W jednym przypadku uzyskanie ujemnego wyniku oznaczenia wykluczyło zatrucie muchomorem sromotnikowym i wskazało na konieczność poszerzenia diagnostyki (rozpoznano botulizm).

Wyniki oznaczeń amanityny były najwyższe (od 10 do >100 ng/ml) u pacjentów zatrutych muchomorem sromotnikowym, od których mocz do badania pobrano w pierwszej dobie od spożycia grzybów. U pacjentów z rozpoznaniem zespołem sromotnikowym, a przyjętych w drugiej dobie, stężenia amanityny wahały się od 5,8 ng/ml do 54 ng/ml. W trzeciej i kolejnych dobach stężenia amanityny u pacjentów z zespołem sromotnikowym nie różniły się od poziomów stwierdzonych u chorych z innym rozpoznaniem (nieżyt, kamica żółciowa).

Nie wykazano przydatności klinicznej oznaczeń amanityny w surowicy krwi. Wszystkie wyniki oznaczeń amanityny w surowicy były negatywne, również u pacjentów z rozpoznaniem zespołem sromotnikowym ciężkiego stopnia (tabela I).

Ocenę stopnia ciężkości zatrucia muchomorem sromotnikowym oparto o skalę PSS (ang. poisoning severity score). Zatrucie stopnia ciężkiego rozpoznawano w przypadku wzrostu aktywności enzymów ALT i AST przekraczających 50-krotnie normę (norma ALT: 5–40 U/l, norma AST: 5–40 U/l) lub wzrostu aktywności bioche-

micznych czynników, takich jak czynniki krzepnięcia, amoniak i kliniczne objawy niewydolności wątroby. Zatrucie średniego stopnia ciężkości rozpoznawano w przypadku wzrostu aktywności enzymów AST i ALT od 5 do 50 razy powyżej normy (ale bez zaburzeń biochemicznych czynników, takich jak wskaźniki krzepnięcia i amoniak). U 12 hospitalizowanych pacjentów, u których poziom amanityn w moczu przekraczał 5 ng/ml, włączono leczenie w postaci infuzji Legalonu (Silibinininy). W większości przypadków stężenie amanityn w moczu powyżej 10 ng/ml łączyło się z rozpoznaniem ciężkiego zespołu sromotnikowego. Z uwagi na postępujące uszkodzenie wątroby, trzy osoby zostały skierowane do przeszczepu tego organu do ośrodków transplantologii. Dwoje spośród 28 leczonych pacjentów zmarło. Zgony dotyczyły osób, które zostały przyjęte do KT CM UJ po długim (przekraczającym 3 doby) czasie od spożycia grzybów.

4. Omówienie

Chromatografia cieczowa i elektroforeza kapilarna umożliwiają oznaczanie amatoksyn i fallotoksyn zawartych w trujących gatunkach grzybów. Zaletą tych metod jest możliwość rozróżnienia poszczególnych form amanityn i niektórych fallotoksyn oraz niska granica detekcji (*LOD*). Według danych literaturowych wartości *LOD* dla amanityn wynoszą od 2 do 10 ng/ml dla HPLC [7, 13, 28]; od 1,5 do 100 ng/ml dla CE [3, 23, 24]; od 0,26 do 2,5 ng/ml dla metod LC-MS i LC-MS-MS [9, 17]. Niestety przydatność wymienionych metod jest ograniczona ze względu na czasochłonność procedur (konieczność ekstrakcji z badanych prób), a także brak dostępu w szpitalach do specjalistycznej aparatury pomiarowej.

Zastosowana w powyższej pracy metoda ELISA pozwala na sumaryczne oznaczanie podtypów -i i -amanityny. ELISA jest metodą dostępną w wielu laboratoriach medycznych, nie wymaga wstępnej ekstrakcji materiału badanego, jest szybka i dlatego bardzo przydatna w diagnostyce pacjentów. Wartość odcięcia zalecana przez producenta wynosi 1,5 ng/ml, co oznacza, że jest to metoda wystarczająco czuła do oznaczania amanityn w moczu.

W owocnikach *Amanita phalloides* wykryto amanityny, wśród których dominują formy , i [22, 27]. Metoda ELISA, która wykazuje specyficzność tylko w stosunku do -i -amanityny dobrze sprawdziła się w diagnostyce pacjentów zatrutych grzybami. Brak specyficzności w stosunku do -amanityny nie wpłynęła na przydatność zastosowanej metody, a wyniki oznaczeń korelowały z rozpoznaniem lekarskim. Doświadczenie wykazało, że badania mikologiczne były mniej wiarygodne, nie pozwalały na jednoznaczne wykluczenie lub potwierdzenie spożycia trujących gatunków grzybów. Poza tym badanie zarodników grzybów wymaga dużego doświadczenia i często weryfikacji przez dwie osoby, co

może wpływać na wydłużenie czasu oczekiwania na wynik [14, 26]. W 3 przypadkach w szpitalach kierujących zbadano popłuczyny żołądkowe pacjentów zatrutych grzybami w kierunku obecności zarodników muchomor i decyzję o skierowaniu do KT UJ CM podjęto na podstawie wyników pozytywnych. Tylko w jednym przypadku weryfikacja wyniku mikologicznego w oparciu o oznaczenie amanityn, jak również przebieg kliniczny zatrucia, potwierdziła rozpoznanie zespołu sromotnikowego. Oznaczenie mikologiczne ma z kolei dużą wartość przy badaniu niespożytych grzybów (świeżych, suszonych, przetworzonych), co jest pomocne przy diagnozowaniu zatrucia nie tylko grzybami cytotoksycznymi (*Amanita phalloides*, *Amanita virosa*, *Amanita verna*), ale też neurotoksycznymi, halucynogennymi i wywołującymi jedynie objawy gastryczne [14, 26].

W rozpoznaniu zespołu sromotnikowego istotne znaczenie miały wywiad i czas wystąpienia pierwszych objawów żołądkowo-jelitowych. Grzyby takie, jak gołąbki, kanie, pieczarki polne i opieńki najczęściej były mylone z trującymi gatunkami muchomor, co potwierdzają również doniesienia z innych ośrodków [14]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na rokowanie był długi okres utajenia zatrucia (6 do 12 h). W tym czasie brak istotnych zmian parametrów biochemicznych mógł być mylący, a zwlekanie z wykonaniem badań toksykologicznych mogło prowadzić do utrudnienia późniejszej interpretacji wyników. Niektórzy autorzy sugerują ograniczenie czasu, w jakim celowe jest pobieranie moczu do oznaczania amanityn do 35 h od spożycia grzybów [4, 11]. Pod koniec drugiej doby od spożycia grzybów oznaczenie amanityn w moczu metodą ELISA rzeczywiście traciło zasadność. Stężenia amanityn w moczu pacjentów, u których rozpoznano zespół sromotnikowy, osiągały wartości tym wyższe, im wcześniej pobrano mocz do badania. Stwierdzenie obecności amanityn w moczu we wszystkich przypadkach było równoznaczne z rozpoznaniem zespołu sromotnikowego. Z kolei zastosowanie metody ELISA do oznaczenia amanityn w surowicy krwi nie umożliwiałoby rozpoznania zatrucia ze względu na bardzo szybką eliminację toksyn [10, 12].

Analizując retrospektywne dane z wywiadu, przebieg kliniczny i badania toksykologiczne, można stwierdzić, że oznaczenie amanityn w moczu metodą ELISA jest miarodajnym badaniem pozwalającym na prognozowanie przebiegu zatrucia. Wyniki oznaczeń były uwzględniane przy podejmowaniu decyzji o podjęciu leczenia Legalonem, gdy miało ono istotne znaczenie, to znaczy do 48 godzin od momentu spożycia grzybów. Rokowanie zazwyczaj zależało od chwili rozpoczęcia specyficznego leczenia i było najbardziej korzystne w przypadku początku hospitalizacji w pierwszej i drugiej dobie. Zatrucia śmiertelne zwykle dotyczyły pacjentów przyjętych w trzeciej i kolejnych dobach od momentu spożycia muchomor sromotnikowego.

5. Wnioski

1. Metoda ELISA jest odpowiednią metodą do sumarycznego oznaczania podtypów α - i β -amanityn dla potrzeb diagnostyki pacjentów zatrutych grzybami.
2. Badanie mikologiczne popłuczyn jest badaniem obarczonym dużym błędem i ma ograniczoną wartość diagnostyczną.
3. Oznaczenie amanityn w moczu w czasie do 48 godzin od spożycia grzybów jest miarodajnym badaniem pozwalającym na prognozowanie przebiegu zatrucia i wskazującym na celowość podjętego leczenia.