

Optische Aufheller – eine Ergänzung in der Diagnostik von Pilzvergiftungen?

PETRA MAYSER & PETER MAYSER

MAYSER P & MAYSER P (2022) Optical brighteners – a complement in the diagnosis of fungal poisoning? *Zeitschrift für Mykologie* 88/1:45-59

Abstract: Optical brighteners, a highly sensitive tool in the diagnostics of mycoses, can be also of value in the diagnostics of mushroom poisoning. Basidiospores of 72 species showed fluorescence depending on the color of the spore print. Hyaline spores were always positive. With the dark spored species the apiculus was mostly positive. All *Boletales* showed fluorescence. In case of mushroom poisoning optical brighteners might therefore be of value in the screening especially of heterogenous samples (i.e. fungal elements in vomit, gastric lavage).

Keywords: optical brighteners – fluorescence – diagnostics of mushroom poisoning

Zusammenfassung: Optische Aufheller, hochsensitiv in der Diagnostik von Mykosen, können auch in der Diagnostik von Pilzvergiftungen eingesetzt werden. Basidiosporen von 72 Arten fluoreszierten in Abhängigkeit von der Sporenpulverfarbe. Hyalinsporen zeigten alle Fluoreszenz. Auch bei den Dunkelsporen stellte sich meist der Apiculus dar, ferner waren alle untersuchten *Boletales* positiv. Optische Aufheller könnten sich daher auch gerade beim Screening von heterogenen Materialien eignen (z. B. Pilzbestandteile in Erbrochenem, Magenspülungen).

Schlüsselwörter: optische Aufheller – Fluoreszenz – Diagnostik von Pilzvergiftungen

Einleitung

Die Fluoreszenzfärbung mit optischen Aufhellern (optical brighteners, Weissmacher) aus der Gruppe der Diaminostilbene erlaubt eine schnelle, sensitive unkomplizierte Darstellung von Pilzelementen in klinischen Untersuchungsmaterialien (SCHRÖDER et al. 2006). Sie ermöglicht erste orientierende Hinweise auf das Vorliegen einer Mykose. Routinemäßig wird diese Methode in der mykologischen Diagnostik wie dem Direktpräparat („Nativpräparat“) und der Untersuchung von Punktaten, Lavagen oder Gewebeschnitten gerade auch in diagnostisch schwierigen Situationen eingesetzt (RÜCHEL & MARKGRAF 1993, RÜCHEL et al. 2004, MAYSER 2018). Eine artspezifische Zuordnung detektierter Pilzelemente ist aber nur in Ausnahmefälle möglich. Hier bedarf es vielmehr weiterführender Techniken wie Kultivierungsmethoden, Spezialfärbungen, immunhistochemischem Antikörpernachweis oder PCR-basierenden Methoden (RÜCHEL et al. 2004, ULLMANN et al. 2017).

Im Rahmen des sehr informativen Seminars „Giftpilze inkl. Krankenhausdiagnostik“ der Schwarzwälder Pilzlehrschau (Katrin Gilbert, Björn Wergen) stellte sich für uns die Frage, ob diese Methode auch in der Notfalldiagnostik von Pilzvergiftungen hilfreich sein könnte.

Anschriften der Autoren: Petra Mayser & Peter Mayser, Hofmannstr. 11, 35444 Biebertal. Korrespondenz: Peter Mayser, Hofmannstr. 11, 35444 Biebertal; p.mayser@t-online.de

Bei optischen Aufhellern handelt es sich um Diaminostilben-Verbindungen, deren erste bereits 1941 unter dem Namen Blankophor als Aufheller für die Papierindustrie und als Zusatz in Waschmitteln eingeführt wurde. Sie binden nicht-kovalent an β -glykosidisch verknüpfte Polysaccharide, die im Menschen nicht vorkommen, aber als Zellulose in Pflanzen („weißeres Papier, weißere Wäsche“) bzw. als Chitin sowie Glukan in Pilzen nachweisbar sind.

Die semispezifische Bindung an die Zellwand von Pilzen wurde bereits Anfang der 1960er Jahre beschrieben (DARKEN 1962). Die Eignung der Aufheller für die mykologische Diagnostik wurde erst 1984 publiziert (HOLLÄNDER et al. 1984, HAGEAGE & HARRINGTON 1984) und zwar wiederum für Blankophor sowie das verwandte Calcofluor Weiss. Später fand auch der Aufheller Uvitex (Fungiquel) diagnostische Verwendung (KOCH et al. 1988).

Üblicherweise erfolgt die Anregung der Aufheller im langwelligen UV-Bereich bei Wellenlängen von 365–395 nm. Die in Folge abgestrahlte blau-weiße Fluoreszenz hat ihr Intensitätsoptimum im sichtbaren Bereich oberhalb 420nm Wellenlänge (blau-grün). Optisch aktiv sind die Aufheller nur in ihrer trans-Konfiguration, die durch eine Bindung an β -Glykoside wie Chitin und Mannan stabilisiert wird. Wenn der Aufheller ungebunden in wässriger Lösung vorliegt, führt ultraviolettes Licht sehr schnell zu einer irreversiblen Isomerisierung in die optisch inaktive cis-Konfiguration. In einer UV-belichteten Probe heben sich somit eventuell vorhandene Pilzelemente sensitiv und kontrastreich gegen den schwarzen Hintergrund ab. Der Effekt zeigt ferner keine zeitabhängige Abschwächung („Fading“) und die Substanz kann durch UV-Bestrahlung wiederholt zur Fluoreszenz angeregt werden.

Material und Methoden

Entsprechend des diesjährigen (2021) regionalen Fundaufkommens wurden von häufigen Gift- und Speisepilzen frische Sporenabwurfpräparate hergestellt.

Sporen wurden auf einen Objektträger übertragen, mit einem Tropfen der selbst hergestellten Fluoreszenzlösung (Tabelle 1) versetzt und mit einem Deckglas (18x18mm) abgedeckt. Ggf. überschießende Flüssigkeit wurden mit Saugpapier entfernt.

Tabelle 1: Rezeptur zur Eigenherstellung der Fluoreszenzlösung

- 3 mg Blankophor BBU 250 % (Farben-Bayer)¹
- 9,5 ml doppelt destilliertes Wasser (Aqua bidest.)
- 0,5 ml DMSO

Gebrauchslösung in lichtgeschützter Tropfflasche aufbewahren. Bei Lagerung im Kühlschrank wenigstens ein halbes Jahr stabil.

¹ Nur für den in-vitro Gebrauch – Sicherheitshinweise beachten; Gebrauchs- und Sicherheitshinweise für handelsübliche Fertigprodukte mit gleichem Einsatzgebiet finden sich beispielsweise unter <https://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/mykoval/> oder unter <http://fungiquel-a.com> (Abruf jeweils 11.12.2021).

Unmittelbar darauf erfolgte die Beurteilung mit einem Hund BX300 Durchlichtstereomikroskop mit einem nachträglich angebauten Hund LED-Fluoreszenz-Illuminator Myko (Anregungswellenlänge 365nm, Fluoreszenz blau-weiß) im Hellfeld-Durchlicht sowie im Fluoreszenzlicht bei 100-, 500-, 630- und 1000-facher Vergrößerung. Variierende Überblendungen zwischen Hellfeld und Fluoreszenz sind dabei möglich. Die Fotodokumentation erfolgte mit einer Nikon 4500 Digitalkamera über einen Fototubus. Am Illuminator lässt sich die Intensität der Anregung mittels eines Drehknopfes regulieren, um Überbelichtungen durch zu starke Fluoreszenz zu vermeiden. Da gleiche Bildausschnitte im sichtbaren, im UV-Licht sowie bei Überblendungen durch Fotobearbeitung der Abbildungen hergestellt wurden, kann die exakte Vergrößerung bei den Bildern nicht angegeben werden. Ein einblendbarer Maßstab stand nicht zur Verfügung. Die Ausgangsvergrößerung betrug jeweils $\times 1000$.

Die Beurteilung der Fluoreszenz erfolgte semiquantitativ. Sehr stark bedeutet, dass trotz geringstmöglicher Anregung durch den Illuminator die Fluoreszenz eine Überbelichtung zeigte (Corona-Phänomene um die Strukturen; Bsp. Abb. 1). Schwach bedeutet, dass die Konturen bei höchster Anregung gerade noch erkennbar waren. Der Apiculus war dann meist noch positiv, wenn nicht, wurde es in den Ergebnissen (Tabellen 2-7) gesondert erwähnt (Bsp. Abb. 7).

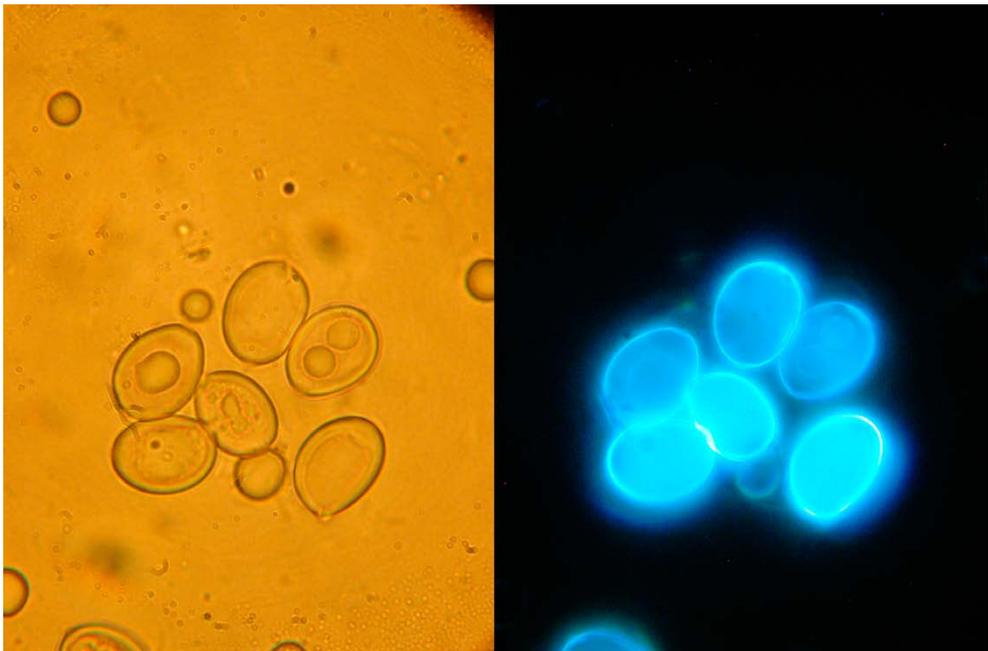


Abb. 1: Sporen von *Macrolepiota procera*, sehr starke Fluoreszenz mit Halo bei geringst möglicher Anregung. Im Hellfeld sichtbare Luftblasen werden in der Fluoreszenz nicht dargestellt.

Tabelle 2: Fluoreszenz von Hyalin-/Weißsporen

Spezies	Ergebnis	besonderes
<i>Amanita citrina</i> Pers.	positiv	Apiculus stärker
<i>Amanita excelsa</i> (Fr.) Bertill.	positiv	Apiculus stärker
<i>Amanita phalloides</i> (Vaill. ex Fr.) Link	positiv	Apiculus stärker
<i>Amanita rubescens</i> Pers.	positiv	Apiculus stärker
<i>Amanita strobiliformis</i> (Paulet ex Vittad.) Bertill.	positiv	Apiculus stärker
<i>Amanita fulva</i> Fr.	positiv	Apiculus stärker
<i>Amanita vaginata</i> (Bull.) Lam.	positiv	Apiculus stärker
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm.	positiv	Apiculus stärker
<i>Armillaria ostoyae</i> (Romagn.) Herink	positiv	Apiculus stärker
<i>Calocybe gambosa</i> (Fr.) Donk	positiv	Apiculus stärker
<i>Clitocybe costata</i> Kühner & Romagn.	positiv	Apiculus stärker
<i>Clitocybe odora</i> (Bull.) P. Kumm.	positiv	Apiculus stärker
<i>Gymnopus dryophilus</i> (Bull.) Murill	positiv	Apiculus stärker
<i>Hygrocybe conica</i> (Schaeff.) P. Kumm.	positiv	Apiculus stärker
<i>Hygrophorus hypothejus</i> (Fr.) Fr.	positiv	Apiculus stärker
<i>Infundibulicybe gibba</i> (Pers.) Harmaja	positiv	Apiculus stärker
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.) Cooke	stark positiv	Apiculus stärker
<i>Lepiota clypeolaria</i> (Bull.) P. Kumm.	stark positiv	unterschiedl. intensiv
<i>Lepiota cristata</i> (Bolton) P. Kumm.	stark positiv	unterschiedl. intensiv
<i>Leucoagaricus leucothites</i> (Vittad.) Wasser	stark positiv	
<i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Singer	stark positiv	
<i>Marasmius oreades</i> (Bolton) Fr.	positiv	Apiculus stärker
<i>Mycena pura</i> (Pers.) P. Kumm.	schwach positiv	Apiculus stärker
<i>Mycetinis alliaceus</i> (Jacq.) Earle ex A.W. Wilson & Desjardin	positiv	Apiculus stärker
<i>Mycetinis prasiomus</i> (Fr.) R.H. Petersen	positiv	Apiculus stärker
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	positiv	Apiculus stärker
<i>Tricholoma sulphureum</i> (Bull.) P. Kumm.	positiv	Apiculus stärker

Tabelle 3: Fluoreszenz von Rosasporen

Spezies	Ergebnis	besonderes
<i>Clitopilus prunulus</i> (Scop.) P. Kumm.	negativ	Apiculus positiv
<i>Entoloma clypeatum</i> (L.) P. Kumm.	negativ	
<i>Entoloma lividoalbum</i> (Kühner & Romagn.) Kubička	negativ	wenige Sporen positiv
<i>Pluteus cervinus</i> (Schaeff.) P. Kumm.	negativ	wenige Sporen positiv
<i>Pluteus salicinus</i> (Pers.) P. Kumm.	negativ	wenige Sporen positiv
<i>Volvopluteus gloiocephalus</i> (DC.) Vizzini, Contu & Justo	negativ	wenige Sporen positiv

Tabelle 4: Fluoreszenz von Braunsporen

Spezies	Ergebnis	besonderes
<i>Cortinarius purpureus</i> (Bull.) Bidaud, Moënne-Locc. & Reumaux	negativ	Apiculus stärker
<i>Galerina marginata</i> (Batsch) Kühner	nur wenige positiv	Apiculus stärker
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull.) Quéf.	uneinheitlich 50/50	Apiculus stärker
<i>Inocybe fraudans</i> (Britzelm.) Sacch.	negativ	Apiculus ohne Fluoreszenz
<i>Kuehneromyces mutabilis</i> (Schaeff.) Singer & A.H.Sm.	schwach	Apiculus stärker
<i>Pseudosperma rimosum</i> (Bull.) Matheny & Esteve-Rav.	negativ	Apiculus ohne Fluoreszenz

Tabelle 5: Fluoreszenz von Schwarzsporen

Spezies	Ergebnis	besonderes
<i>Agaricus arvensis</i> Schaeff.	Negativ	Apiculus ohne Fluoreszenz
<i>Agaricus campestris</i> L.	Negativ	nur wenige Sporen positiv
<i>Agaricus xanthodermus</i> Genev.	Negativ	nur wenige Sporen positiv, Apiculus stärker
<i>Coprinopsis atramentaria</i> (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo	Negativ	Apiculus ohne Fluoreszenz
<i>Hypholoma capnoides</i> (Fr.) P. Kumm.	Negativ	nur wenige Sporen positiv, Apiculus stärker
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds.) P. Kumm.	negativ	nur wenige Sporen positiv, Apiculus stärker, Keimporus nachweisbar

Tabelle 6: Fluoreszenz von *Russulaceae*

Spezies	Sporenpulverfarbe	Ergebnis
<i>Russula cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr.	weiß	positiv
<i>Russula densifolia</i> Secr. ex Gillet	weiß	positiv
<i>Russula rosea</i> Pers.	weiß	positiv
<i>Russula ochroleuca</i> Fr.	weiß	positiv
<i>Russula vesca</i> Fr.	weiß	positiv
<i>Russula exalbicans</i> (Pers.) Melzer & Zvára	creme	positiv
<i>Russula violeipes</i> Quéf.	creme	positiv
<i>Russula carpini</i> R. Girard & Heinem.	dotter	positiv, einzelne Sporen stärker
<i>Russula integra</i> (L.) Fr.	dotter	positiv, einzelne Sporen stärker
<i>Russula olivacea</i> (Schaeff.) Fr.	dotter	positiv
<i>Russula risigallina</i> (Batsch) Sacc.	dotter	schwach positiv

<i>Lactarius blennius</i> (Fr.) Fr.	hellocker	positiv
<i>Lactarius circellatus</i> Fr.	blalocker	schwach positiv
<i>Lactarius deliciosus</i> L. (Gray)	creme	schwach positiv
<i>Lactarius fuliginosus</i> (Fr.) Fr.	blalocker	schwach positiv
<i>Lactarius pyrogalus</i> (Bull.) Fr.	hellocker	schwach positiv
<i>Lactifluus piperatus</i> (L.) Roussel	weiß	stark positiv
<i>Lactifluus volemus</i> (Fr.) Kuntze	creme weiß	stark positiv

Tabelle 7: Fluoreszenz von *Boletales*

Spezies	Ergebnis	besonderes
<i>Boletus reticulatus</i> Schaeff.	positiv	Apiculus ohne Fluoreszenz
<i>Gyroporus castaneus</i> (Bull.) Quél.	stark positiv	
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.	schwach positiv	Apiculus stärker
<i>Strobilomyces strobilaceus</i> (Scop.) Berk.	schwach positiv	Apiculus ohne Fluoreszenz
<i>Suillus grevillei</i> (Klotsch) Singer	positiv	Apiculus stärker
<i>Suillellus luridus</i> (Schaeff.) Murrill	positiv	Apiculus ohne Fluoreszenz
<i>Tapinella atrotomentosa</i> (Batsch) Šutara	Positiv	Apiculus stärker
<i>Xerocomellus chrysenteron</i> (Bull) Šutara	positiv	Apiculus stärker
<i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Quél.	positiv	Apiculus stärker

Ergebnisse

Mit der beschriebenen Methodik konnte eine Fluoreszenz von Sporen nachgewiesen werden. Es ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede vorrangig in Abhängigkeit von der Sporenpulverfarbe. Alle untersuchten Hyalin-/ Weißsporer zeigten eine deutliche Fluoreszenz in unterschiedlicher Stärke (Tabelle 2). Bei den untersuchten *Lepiota/Macrolepiota* Spezies sowie bei *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke und *Leucoagaricus leucothites* (Vittad.) Wasser war die Fluoreszenz so stark, dass zur Fotodokumentation nur die geringst mögliche Anregung verwendet werden konnte (Abb. 1). Dunkelsporer zeigten keine Fluoreszenz (Tabellen 3-5). Es fanden sich bei einigen Arten aber Fluoreszenz-positive Sporen in unterschiedlichem Ausmaß – einige wenige (Abb. 2,3) bis in nahezu 50 % der Sporen (*Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quél.; Abb. 4). Die Ursachen für diese Beobachtung sind vielschichtig: defekte Sporen (Abb. 9), geringer oder unpigmentierte Sporen („Albinos“) (Abb. 3) oder ungeklärt wie im Falle von *Entoloma lividoalbum* (Kühner & Romagn.) Kubička (Abb. 2), *Hebeloma crustuliniforme* (Abb. 4) oder *Russula carpini* R. Girard & Heinem. (Abb. 6). Da nur Sporenabwurfpräparate verwendet wurden, scheidet eine Sporenenreife unserer Meinung nach als Erklärung aus.

Ein fluoreszierender Apiculus konnte mit Ausnahme der untersuchten *Inocybe-/Pseudosperma*-Funde und von *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo auch bei Dunkelsporern nachgewiesen werden (Abb. 5). Bei den Hyalinsporern

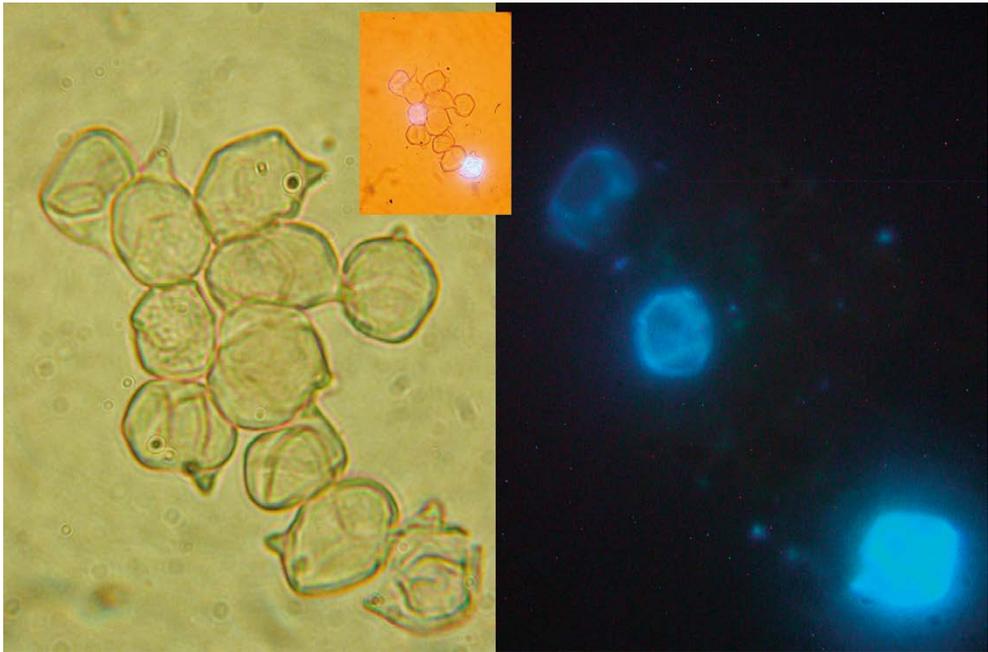


Abb. 2: Sporen von *Entoloma lividoalbum* – einige Sporen zeigen vollständige Fluoreszenz, bei anderen ist nur der Apiculus erkennbar, kleines Bild stellt die Überblendung dar.

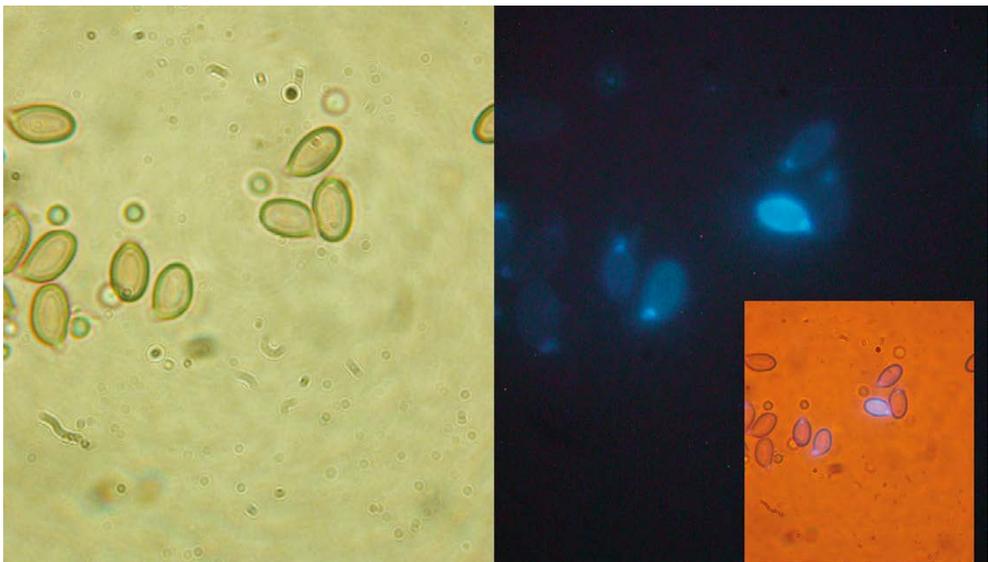


Abb. 3: Sporen von *Agaricus xanthodermus* Genev. – einige wenige Sporen positiv; der Apiculus stellt sich aber auch bei den sonst nicht fluoreszierenden Sporen dar.

zeigte ebenso wie bei den *Russulaceae* der Apiculus meist die stärkste Fluoreszenz (Tabelle 6; Abb. 6). Gut sichtbar wird dies auch an den blass-ockeren Sporen von *Lactarius fuliginosus* (Fr.) Fr. (Abb. 7). Hier kommt auch die Ornamentierung zur Dar-

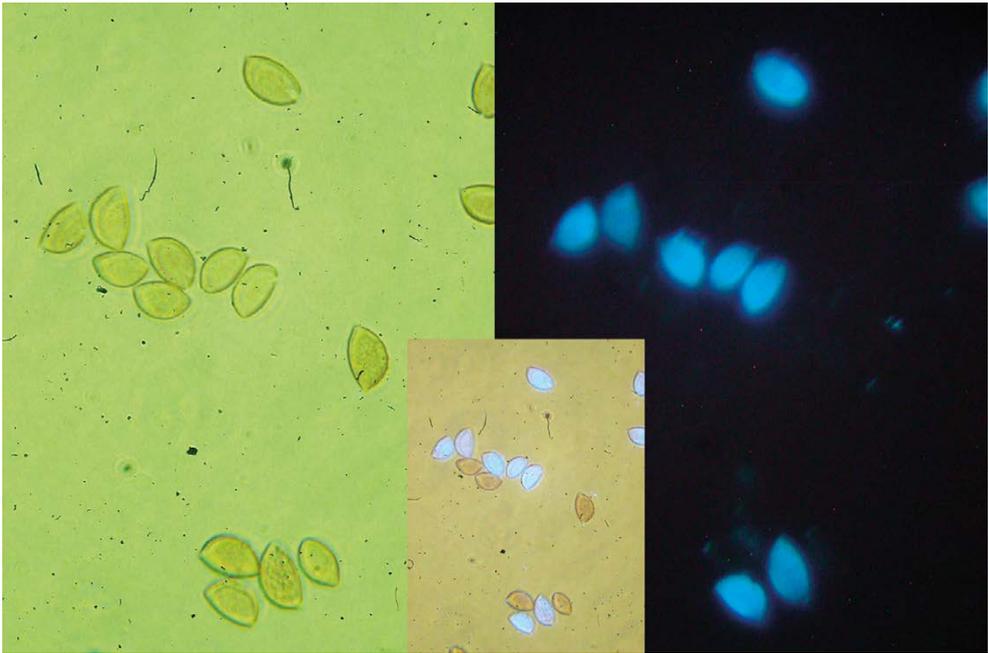


Abb. 4: Sporen von *Hebeloma crustuliniforme*; etwa ausgeglichenes Verhältnis von fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Sporen

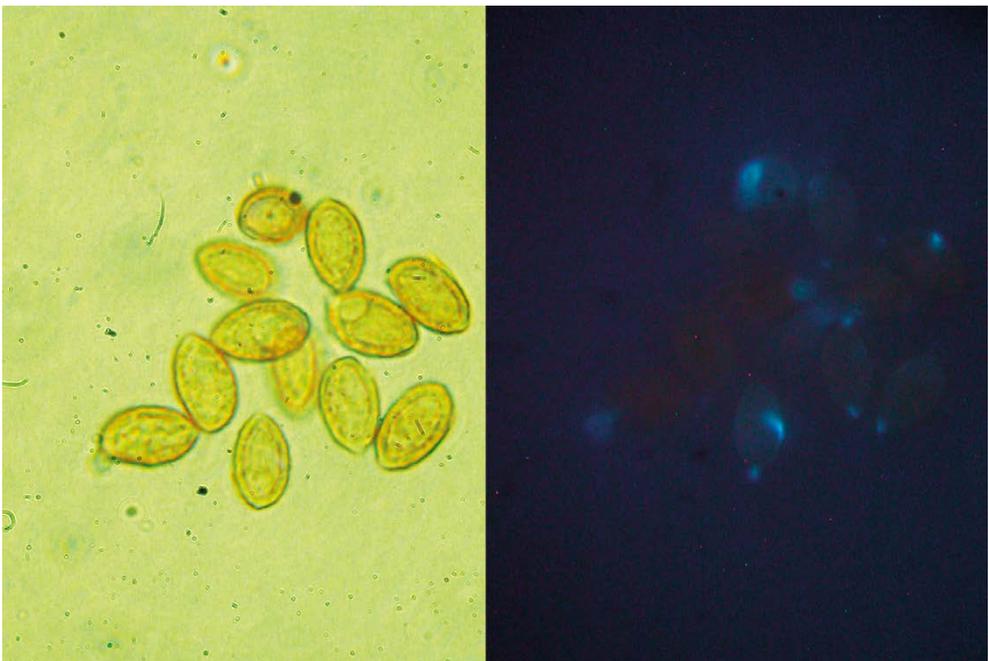


Abb. 5: *Galerina marginata* (Batsch) Kühner – nicht fluoreszierende Sporen neben Sporen mit erkennbarem Apiculus

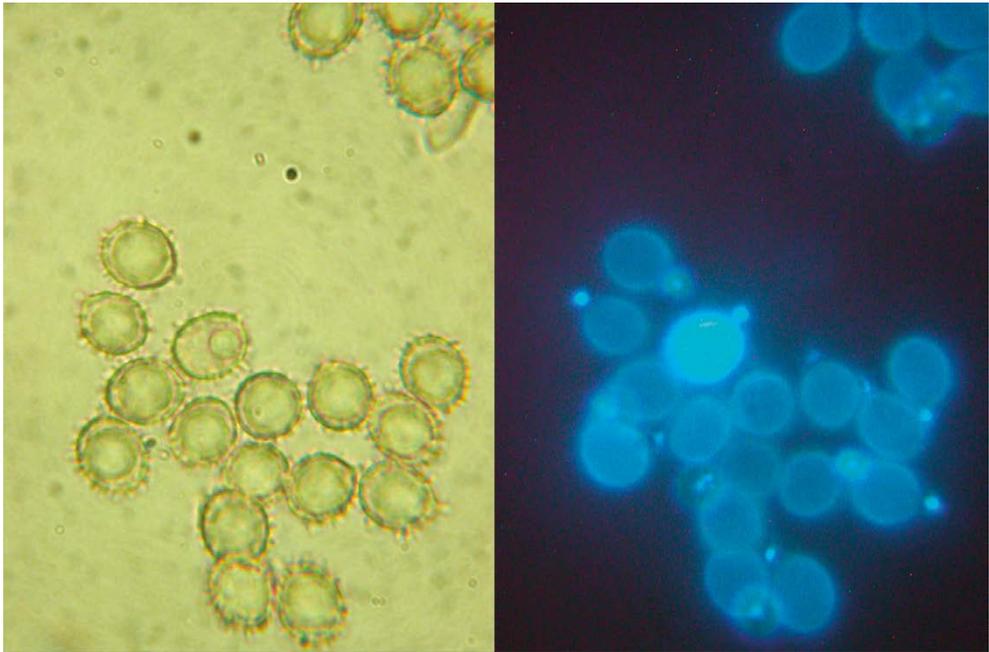


Abb. 6: *Russula carpini* – deutlich fluoreszierende Apiculi, eine Spore stärker fluoreszierend, keine Darstellung der Ornamentierung in der Fluoreszenz

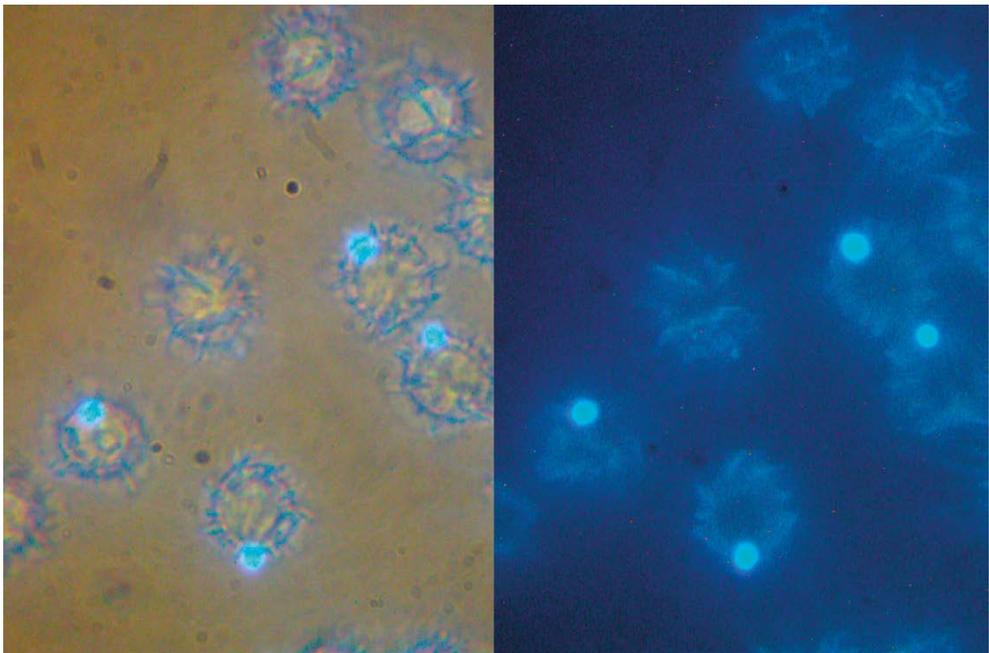


Abb. 7: *Lactarius fuliginosus* – schwache Fluoreszenz bei deutlich dargestellten Apiculi. Ornamentierung angedeutet erkennbar

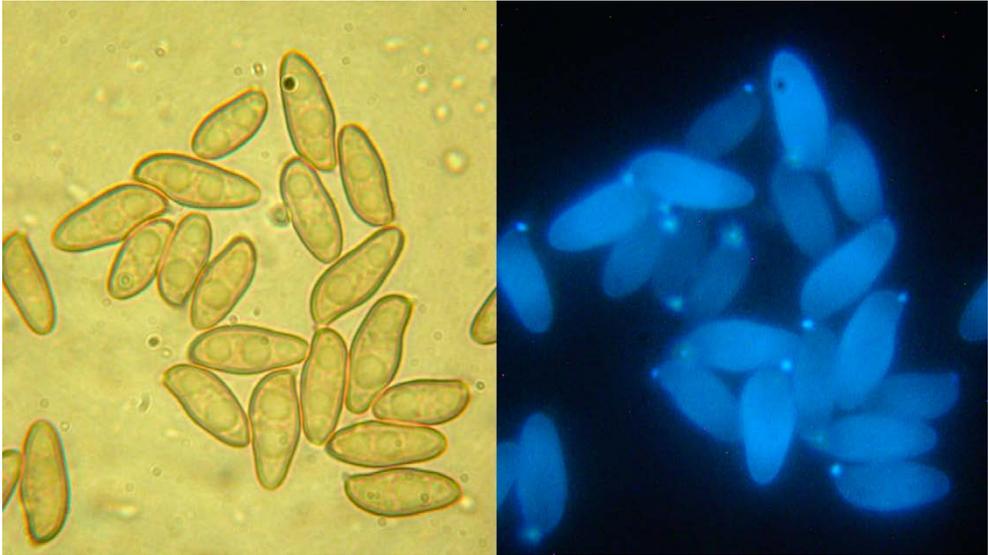


Abb. 8: *Xerocomellus chrysenteron* (Bull.) Šutara – fluoreszierende Sporen mit deutlich erkennbaren Apiculi

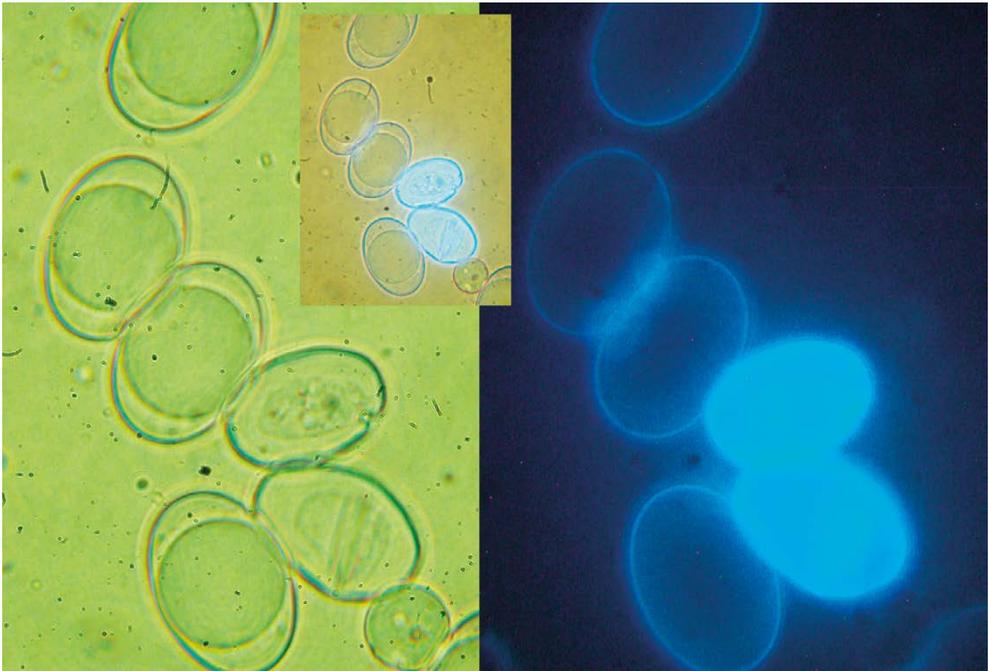


Abb. 9: *Helvella crispa* – offensichtlich defekte Sporen mit stärkerer Fluoreszenz

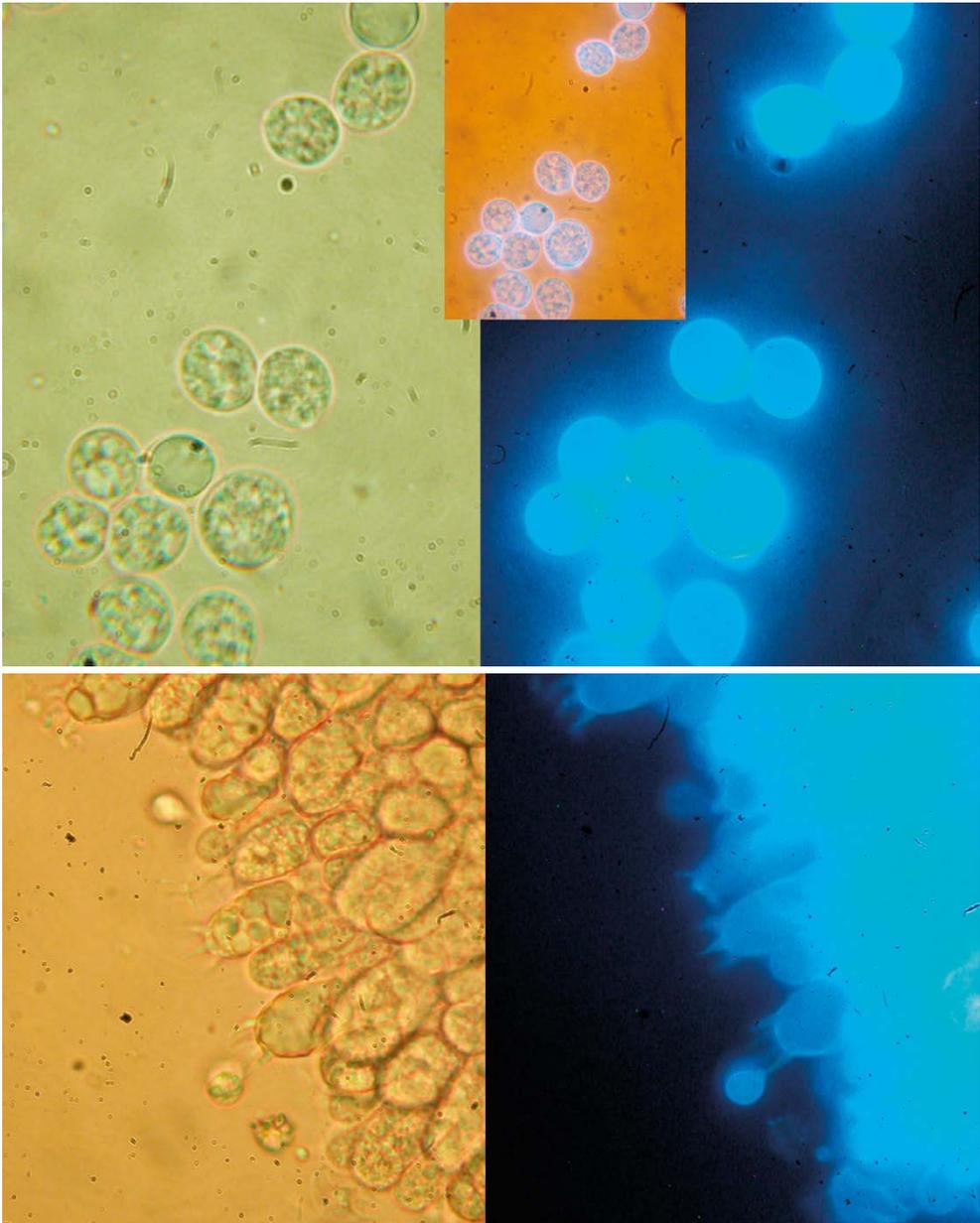


Abb. 10: a) oben, *Amanita phalloides* – deutlich fluoreszierende Sporen, b) unten, nach 30 minütigem Kochen eines Hutes und Herstellen eines Zupfpräparates – Basidien mit noch anhaftender Spore (x600)

stellung, die bei den stärker fluoreszierenden Sporen nicht mehr sichtbar ist (Abb. 6). Unter den untersuchten Dottersporern zeigte *Russula risigallina* (Batsch) Sacc. eine nur schwache Fluoreszenz (Tabelle 6). Auch unter den Milchlingen fanden sich einige schwächer fluoreszierende Arten. Bisher haben wir aber nur wenige Fruchtkörper untersucht. Ob es sich bei diesen Beobachtungen um artspezifische Merkmale oder um Variationen innerhalb einer Art handelt, soll durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

Trotz der dunkleren Sporenpulverfarbe zeigte alle untersuchten *Boletales*-Sporen homogene Fluoreszenz (Tabelle 7; beispielhaft Abb. 8) – sehr stark bei dem Blassporröhrling *Gyroporus castaneus* (Bull.) Quél. und am geringsten bei *Strobilomyces strobilaceus* (Scop.) Berk. Auch hier scheint somit eine Abhängigkeit der erzielbaren Fluoreszenzintensität von der Stärke der Pigmentierung der Sporen zu bestehen. Auch die Sporen des zu den *Boletales* zählenden *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. fluoreszierten. Alle untersuchten Leistlinge (*Cantharellus pallens* Pilát, *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers., *Craterellus tubaeformis* (Fr.) Quél.) zeigten ebenfalls deutliche Fluoreszenz mit prominentem Apiculus. Erste Erfahrung mit Ascomyceten zeigten eine Fluoreszenz von Sporen von *Peziza vesiculosa* Bull. sowie von *Helvella crispa* (Scop.) Fr. mit jeweils nachweisbarer Varianz in der Intensität einzelner Sporen (Abb. 9).

Einfluss von Kochen auf die Fluoreszenz.

Da es sich im Rahmen der Krankenhausdiagnostik von Pilzvergiftungen nicht selten um gekochtes Material handelt, wurde an dem klinisch besonders bedeutsamen *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link sowohl Sporenmaterial als auch Zupfpräparate von 30 Minuten in Wasser sprudelnd gekochten frischen Fruchtkörpern untersucht. Sporen aus dem Sporenabwurfpräparat zeigten eine deutliche und homogene Fluoreszenz (Abb. 10a). Dies fand sich ebenso in dem gekochten Pilzmaterial (Abb. 10b).

Beurteilung der Jodreaktion

Mit Fluoreszenzlösung behandelte Sporenabwurfpräparate wurden nur in Einzelfällen mit Melzer's Reagenz-Lösung überfärbt. Ein bereits gefärbtes, stark fluoreszierendes Präparat von *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer zeigte nach Überfärbung durch Melzer's Reagenz eine gut sichtbare dextrinoide Reaktion. Amyloide Reaktionen (untersucht an *Amanita phalloides* und *Amanita citrina* Pers.) waren nicht eindeutig zu erkennen, so dass weitere systematische Untersuchungen erfolgen müssen. Zunächst sollten daher besser zwei getrennte Präparate angelegt werden.

Pflanzliches Material

Die Fluoreszenzfärbung mit optischen Aufhellern ist ebenso bei pflanzlichem Zellulose-haltigem Material möglich. Fluoreszierende Pflanzenzellen können aber aufgrund der Größe und der Struktur abgegrenzt werden, ebenso wie im allgemeinen pflanzliche Sporen/Pollen.

Diskussion

Die Fluoreszenzuntersuchung unter Verwendung optischer Aufheller ist eine sensitive und rasch durchzuführende Methode in der Diagnostik von Mykosen. Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, ihren möglichen Einsatz in der Notfalldiagnostik von Pilzvergiftungen zu überprüfen. Die Sporenanalyse stellt hier einen wichtigen Schritt dar (FLAMMER & FLAMMER 2014). Sie kann aus Frischmaterial/Rüstresten, Kochresten, Konserven, Trockenmaterial sowie aus Magensaft, Erbrochenem und Stuhl erfolgen.

In unserer orientierenden Untersuchung konnte an Sporenabwurfpräparaten von einigen ausgewählten Speise- und Giftpilzen eine diagnostisch verwertbare Fluoreszenz nach Anwendung des optischen Aufhellers Blankophor BBU 250 % nachgewiesen werden, und zwar weitestgehend in Abhängigkeit von der Sporenpulverfarbe. Alle untersuchten Hyalinsporen zeigten Fluoreszenz, teils in unterschiedlicher Stärke, während bei Dunkelsporen sich oft nur der Apiculus darstellte. Bemerkenswerterweise fanden sich bei vielen Dunkelsporen einzelne fluoreszierende Sporen in unterschiedlichem Ausmaß. Alle untersuchten *Boletales* Sporen zeigten Fluoreszenz.

Die aus den bisherigen Ergebnissen ermittelten Vor- und Nachteile der Fluoreszenzdiagnostik mit optischen Aufhellern in der Diagnostik von Pilzvergiftungen werden im Folgenden zusammengefasst und diskutiert. Einschränkend wurden die Untersuchungen nur an wenigen Spezies mit wenigen differentiellen Fruchtkörpern erhoben, so dass die Ergebnisse und Schlussfolgerungen als vorläufig zu bewerten sind.

Als positiv zu werten sind:

- Hoch sensitives, einfaches Verfahren, welches die Detektion von Pilzelementen auch in heterogenen Materialien (Erbrochenem, Magenspülungen) ermöglicht
- Zusatz von Lauge anstelle von doppelt dest. Wasser (Aqua bidest.) möglich, um die Freisetzung in komplexen Materialien zu erhöhen. Hierzu veränderte Rezeptur (Tabelle 1 – Ersatz von Aqua bidest. durch NaOH): 3 mg Blankophor BBU 250 % (Farben-Bayer); 9,5 ml NaOH 0,5 M; 0,5 ml DMSO
- Hohe Sensitivität bei Hyalinsporen, insbesondere auch bei *Amanita*-Arten
- Vorangegangenes Kochen der Pilzelemente ohne Einfluss
- Gattungsdiagnosen anhand typischer Sporenformen und -merkmale möglich
- Aufgrund von hoher Sensitivität Suchfunktion in der Übersichtsvergrößerung möglich
- Luftblasen und Fetttropfen fluoreszieren nicht. Sie sind in der Überblendung zwischen Hellfeld und Fluoreszenz gut zu differenzieren. Dieses Phänomen ergänzt das Waschen der Fragmente mit heißem Wasser und/oder Spülmittel in einem Teesieb zur Reduktion vorhandener Fette und Öle.
- Auch Tramastrukturen werden dargestellt.

Als negativ oder einschränkend sind zu werten:

- Es ist ein Fluoreszenzmikroskop möglichst in Kombination mit einem Durchlichtmikroskop erforderlich. Dieses ist aber oft in Krankenhäusern vorhanden. Der von uns verwendete LED-Fluoreszenz-Illuminator Myko der Fa. Hund (Neupreis etwa 1900 €) ist nur an Hund-Mikroskopen nachrüstbar. Durch Einsatz der LED-Fluoreszenz anstelle von Quecksilberhochdrucklampen ist die Fluoreszenzmikroskopie aber preiswerter und leichter handhabbar geworden (unter anderem keine problematischen Zündvorgänge, keine Abkühlphasen, kein Hitzeschutz). Günstigere Lösungen scheinen denkbar.
- Eingeschränkte Diagnostik von Dunkelsporern. Hier sind aber meist der *Apiculus* und/oder einige Basidiosporen positiv. Interessanterweise sind aber auch alle bisher getesteten *Boletales*-Sporen positiv.
- Feinstrukturen der Sporen bzw. Ornamentierung nicht gut darstellbar. Sie können in der Fluoreszenzanregung überstrahlt oder nicht gefärbt sein. Durch Beurteilung im Hellfeld oder in der Überblendtechnik Problembeseitigung möglich. Die Fluoreszenz dient damit zunächst zum Auffinden der Strukturen mit einer weiteren Beurteilung im Hellfeld.
- Bislang unklar, ob Überfärbungen z. B. mit Melzer's Reagenz zur Bestimmung der Jodreaktion am gleichen Präparat möglichst sind.
- Pflanzenmaterialien lassen sich ebenso in der Fluoreszenzfärbung mit optischen Aufhellern darstellen. Pflanzenzellen können aber aufgrund der Größe und der Struktur von Hyphenzellen abgegrenzt werden, ebenso wie im allgemeinen pflanzliche Sporen/Pollen.

Zusammenfassend stellen Untersuchungen mit optischen Aufhellern eine hoch sensitive und bewährte Methode in der Diagnostik von Mykosen dar. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass sie auch in der Diagnostik von Pilzvergiftungen gerade auch in Kombination mit der Hellfeldmikroskopie hilfreich sein können. Weitere Untersuchungen zur Einschätzung von Möglichkeiten und von Grenzen sollten durchgeführt werden.

Stellungnahme

Die Autoren versichern, dass keine speziellen Genehmigungen für die Durchführung der Arbeit notwendig waren. Die Arbeit wurde aus den Mitteln der Autoren finanziert.

Danksagung

Für Unterstützung bei der Beschaffung und Bestimmung der untersuchten Pilze möchten wir insbesondere Felix Hampe, Wolfgang Schößler und Harald Zühlsdorf herzlich danken. Ferner danken wir Katrin Gilbert und Björn Wergen von der Schwarzwälder Pilzlehrschau für den exzellenten Kurs „Giftpilze incl. Krankenhausdiagnostik“ im Juni 2021.

Literatur

- DARKEN MA (1962). Absorption and transport of fluorescent brighteners by microorganisms. *Appl Microbiol* **10**: 387–393.
- FLAMMER R, FLAMMER T (2014) *Mykologische Notfalldiagnostik*. 44S. Eigenverlag
- HAGEAGE GJ, HARRINGTON BJ (1984) Use of calcofluor white in clinical mycology. *Lab Med* **15**: 109–112.
- HOLLÄNDER H, KEILIG W, BAUER J, ROTHEMUND E (1984) A reliable fluorescent stain for fungi in tissue sections and clinical specimens. *Mycopathologia* **88**: 131–134.
- KOCH Y, KOCH HA, BRAUN DG (1988) *Mykosen-Atlas*. Berlin: Grosse Verlag
- MAYSER P (2018) *Mykosen*; in Braun-Falco's *Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Hrsg. G. Plewig, T. Ruzicka, R. Kaufmann, M. Hertl. Springer Verlag. 7. Aufl.; S. 261-297.
- RÜCHEL R, MARKGRAF S (1993) Rapid microscopical diagnosis of deep-seated mycoses following maceration of fresh specimens and staining with optical brighteners. *Mycoses* **36**(7-8): 239-242.
- RÜCHEL R, DELLMANN A, SCHAFFRINSKI M, DONHUIJSEN K (2004) Fungus detection--a simple method. Screening with optical brighteners. *Pathologie* **25**(3): 235-237.
- SCHROEDER J, SCHAFFRINSKI M, RÜCHEL R (2006) Optical brighteners in fungal diagnostics. *Mycoses* **49** Suppl 2: 14-7.
- ULLMANN AJ, AGUADO JM, ARIKAN-AKDAĞLI S et al. (2018) Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection* **24**: Suppl 1: e1-e38.

Petra Mayser

ist Diplom-Biologin und Hobby-Imkerin.

Peter Mayser

ist Facharzt für Dermatologie und Allergologie und hat sich über ein dermatomykologisches Thema habilitiert. Neben seiner klinischen Tätigkeit leitete er langjährig das mykologische Labor der Hautklinik Giessen.

Wir teilen unser Hobby „Mykologie“ und sind seit 2019 Mitglieder der DGFm, seit Oktober 2021 auch PSV.





Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der **DGfM**.

www.dgfm-ev.de

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
(Name der Hefreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 2022

Band/Volume: [88_2022](#)

Autor(en)/Author(s): Mayser Petra, Mayser Peter

Artikel/Article: [Optische Aufheller – eine Ergänzung in der Diagnostik von Pilzvergiftungen? 45-59](#)