

# PAGINE DI MICOLOGIA



## ATTI DEL 6° CONVEGNO INTERNAZIONALE DI MICOTOSSICOLOGIA

Perugia 23-24 Novembre 2018  
prima parte

Associazione Micologica Bresadola  
Centro Studi Micologici  
Anno 2020 - 41

Comitato di Gestione:



Direttore: Carlo Papetti

A.M.B. Fondazione A.M.B. - Fondazione

Centro Studi Micologici  
P.O. Box n° 292 - IT - 36100 VICENZA

Segretario: Mario Manuzzato  
Bibliotecario: Mario Mariotto  
Curatore dell'Erbario: Gianfranco  
Medardi Rapporti con il C.S.N.:  
Emanuele Campo

C.S.m.

Vicedirettore: Gianfranco Gasparini

Associazione Micologica Bresadola - via A. Volta, 46 - IT 38123 Trento.

www.ambresadola.it - E-mail: amb@ambresadola.it



## 6° Convegno Internazionale di Micotossicologia

I Funghi:  
sicurezza alimentare, alimenti, integratori

Associazione Micologica Bresadola "Fondazione  
Centro Studi Micologici"

Commissione Micotossicologia  
6° Convegno Internazionale di  
Micotossicologia

23-24 novembre 2018 Hotel Quattro Torri - Via Corcianese, 260 - Perugia

SEGRETERIA SCIENTIFICA

PAGINE DI MICOLOGIA

K. Kob - Gruppo AMB di Bolzano E-mail: karl@kob.bz.it

O. Tani - Gruppo AMB di Cesena E-mail:

tanoscar@gmail.com

N. Sitta - Gruppo AMB di Pergine Valsugana (TN) E-

mail: nicolasitta@libero.it P.

Davoli

E-mail: paolo-davoli@libero.it

G. Antenhofer

E-mail: gerald.antenhofer@sabes.it

O. Petrini E-mail:

orlando@petrininet.ch

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

G. Visentin - Segretario AMB E-mail: givisentin53@gmail.com C.

Papetti - Direttore Centro Studi

Micologici dell'AMB E-mail:

carlo.papetti51@gmail.com

COMMISSIONE MICOTOSSICOLOGIA CSM-AMB

K. Kob - E-mail: karl@kob.bz.it O. Tani - E-mail:

oscar.tani@libero.it N. Sitta - E-mail:

nicolasitta@libero.it P. Davoli - E-mail: paolo-

davoli@libero.it G. Visentin - E-mail:

givisentin53@gmail.com

## 6° Convegno Internazionale di Micotossicologia la commestibilità dei funghi: miti e malintesi

DeniS r BenjaMin B.Sc., M.B., B.Ch.  
Research Associate, Botanical Research Institute of Texas, Fort Worth, Texas,  
USA 700 University Dr, Fort Worth, TX 76107

(traduzione di Paolo Davoli)

### Riassunto

La maggior parte delle nostre conoscenze sulla commestibilità e sulla tossicità dei funghi si basa su osservazioni aneddotiche limitate e spesso insufficientemente documentate. Esistono pochi studi approfonditi e sistematici che hanno preso in esame questi aspetti in modo formale. Attraverso i “social media” e le moderne tecnologie d’informazione al giorno d’oggi la disinformazione si diffonde rapidamente e una volta che entra a far parte della mitologia consolidata risulta poi difficile modificare atteggiamenti e convinzioni. La comunità micologica dovrebbe stare in guardia per evitare la diffusione di informazioni ambigue e dovrebbe esaminare in maniera critica tutti i dati relativi ad intossicazioni da funghi: identificazione accurata della specie responsabile, informazioni dettagliate su habitat, substrato e clima, e una valutazione critica dei rapporti clinici e delle relative conclusioni. Generalizzazioni senza riserve e politiche decisionali in materia di commestibilità dei funghi non dovrebbero basarsi su informazioni limitate o parziali.

Il numero di persone che si dedicano alla raccolta di funghi spontanei a scopo alimentare e terapeutico negli Stati Uniti è cresciuto rapidamente negli ultimi decenni. I miti e i malintesi riguardo la commestibilità e la tossicità dei funghi si originano a partire dalla fonte di informazioni che un neofita riceve inizialmente e che poi si rafforza nel tempo.

Nelle nazioni europee con una tradizione consolidata di raccolta dei funghi a scopo alimentare la maggior parte delle informazioni sul riconoscimento dei funghi sono fornite da familiari e amici: quali specie sono commestibili, quali evitare e come prepararle o conservarle. In alcune nazioni anche le farmacie forniscono assistenza nel riconoscimento dei funghi. Sebbene i familiari possano rappresentare la fonte principale di informazioni, questa può essere superata o influenzata da articoli sulla stampa o su altri mezzi d’informazione, così come da parte di società e organizzazioni micologiche locali. Tutte queste rappresentano potenziali fonti di disinformazione.

Negli Stati Uniti, invece, la maggior parte dei nuovi cercatori di funghi sono neofiti che vivono in città, con poche conoscenze di biologia, ecologia forestale o discipline scientifiche di base.

Sono parte di un movimento “new age” che desidera tornare alla natura sia per nutrirsi che per curarsi. Si tratta di persone che hanno scarsa capacità di valutare criticamente le informazioni che ricevono da amici, “social media”, articoli di riviste, libri, video e internet. La maggior parte delle volte tali informazioni sono accettate alla lettera. Una piccola percentuale di loro si iscrive a società micologiche e frequenta magari qualche lezione di base per principianti sul riconoscimento dei funghi. Ma oltre a questo essi si affidano ai tanti siti web e ai gruppi dedicati ai funghi su “social media” come Facebook, Snapchat e Instagram. Ed è proprio qui dove i ciechi fanno da guida ad altri ciechi.

Il problema è accentuato dal fatto che molti di questi siti online, comprese fonti che sono generalmente considerate affidabili, riportano informazioni sbagliate. Ad esempio l’Encyclopedia Britannica, una fonte di informazioni generalista molto stimata, riportava la seguente affermazione a proposito di *Amanita muscaria* (tutti i termini sottolineati corrispondono a informazioni errate):

«Il consumo di *Amanita muscaria*, che contiene muscarina e altri alcaloidi tossici, è presto seguito da nausea, vomito, diarrea, salivazione eccessiva, sudorazione, lacrimazione, respirazione rallentata e difficoltosa, pupille dilatate, eccitabilità».

In effetti in questa specie si trovano tracce di muscarina, ma i composti responsabili della tossicità di *A. muscaria* sono il muscimolo e l’acido ibotenico. Gli autori della frase sopra citata stanno in realtà descrivendo l’intossicazione muscarinica e non la sindrome inebriante o panterinica causata da *A. muscaria* e *A. pantherina*.

Questo è soltanto uno dei numerosi esempi di informazione di scarsa qualità. La gente e molti giornalisti si affidano a queste fonti e continuano così a perpetuare informazioni incomplete o sbagliate. Le società e i gruppi micologici negli Stati Uniti hanno sia siti web che “newsletters”, gestiti da volontari, alcuni dei quali hanno una conoscenza limitata dei funghi e ne sanno ancor meno di tossicologia. A causa della facilità del copia/incolla, un articolo può essere facilmente diffuso in tutta la nazione. La frase seguente è esemplificativa di un’affermazione non verificata sperimentalmente, apparsa sulla newsletter della Puget Sound Mycological Society (Spore Prints Nov 2016) «... dove il numero di esemplari di *Amanita phalloides* è molto abbondante e l’annaffiatura dei prati è eccessiva, le tossine fungine si sono infiltrate nei torrenti vicini e si sono rese responsabili dell’intossicazione di parecchi cani». Questa frase è stata copiata da una pubblicazione nota come Vancouver Seed Bank, pubblicata nel novembre 2013: non vi era riportato alcun riferimento bibliografico né alcun dato scientifico a supporto di tale affermazione.

Un secondo aspetto importante legato al consumo dei funghi spontanei è che l’atteggiamento nei confronti della loro commestibilità è semplicemente dualistico: i

funghi spontanei sono considerati o commestibili o tossici. Questo approccio è diverso da quello che si applica invece a quasi tutti gli altri alimenti, che contengono tutti sostanze che sono potenzialmente tossiche se consumati in abbondanza, o se non conservati, immagazzinati o preparati in modo appropriato. Questa semplice classificazione in ‘buono o cattivo’ che viene utilizzata per i funghi è comoda, ma non riflette tutte le sfumature legate alla commestibilità e all’ampia variabilità sia del fungo (specie, habitat, stagione e substrato di crescita, preparazione, ecc.), sia della reazione individuale della persona che lo consuma, dovuta a differenze genetiche, di digestione, di metabolismo e a molte altre caratteristiche individuali incognite.

Alcune delle convinzioni errate più comuni negli Stati Uniti sono:

- a. *Coprinus comatus* e bevande alcoliche
- b. Spugnone e bevande alcoliche
- c. Le spugnone sono innocue
- d. Le spugnone (*Morchella* spp.) e *Verpa bohemica* contengono monometilidrazina
- e. *Verpa bohemica* è tossica
- f. *Laetiporus sulphureus* e specie affini sono tutti commestibili
- g. Tutti i polipori sono sicuri da consumare e hanno valore terapeutico
- h. *Tricholoma equestre* (= *T. flavovirens*) negli Stati Uniti è tossico
- i. *Pleurocybella porrigens* è tossica
- j. Tutti i boleti a pori rossi o viranti al blu sono tossici
- k. Il cardo mariano (silimarina) è un antidoto efficace per le intossicazioni da amatossine

### **Origine della disinformazione**

Non è sempre possibile risalire all’affermazione originale che ha generato la disinformazione, anche se in alcuni casi sembra esserci un chiaro riferimento o un’associazione evidente.

#### **a. *Coprinus comatus* e bevande alcoliche**

La convinzione che si debba evitare l’assunzione di bevande alcoliche durante il consumo di un pasto a base di *Coprinus comatus* sembra rappresentare un esempio tipico di ‘colpevolezza per associazione’. In passato la comune *Coprinopsis atramentaria* veniva infatti ascritta al genere *Coprinus* ed era ben noto causare una reazione avversa se consumata in associazione con bevande alcoliche, a causa della presenza di coprina e dell’attività tipo-disulfiram di questa sostanza. Alcuni insistono ancora nel raggruppare queste due specie diverse come se in un qualche modo condividessero la stessa chimica. Ancora più singolari sono affermazioni del tipo «I funghi che contengono coprina possono causare dipendenza se assunti in presenza di bevande alcoliche» (jo et al., 2014). Forse è vero l’esatto contrario. Nessuno vorrebbe infatti sperimentare per una seconda volta le conseguenze del consumo congiunto di

bevande alcoliche e *Coprinopsis atramentaria*. Di certo non esistono prove della presenza di coprina in *C. comatus*.

#### **b. Spugnole e bevande alcoliche**

Esiste una convinzione diffusa che non si dovrebbero associare bevande alcoliche e spugnole nello stesso pasto. Questa affermazione è riportata sui siti web di alcune società micologiche e compare in una serie di altri siti web di argomento micologico. Sembra che tale associazione tra spugnole e bevande alcoliche abbia avuto origine da un breve e singolo resoconto aneddótico pubblicato su *Mycologia* (GroveS, 1964). Esistono altri resoconti aneddóticos dello stesso tipo, ma non sembrano essere più comuni di qualsiasi idiosincrasia a molti altri alimenti, talvolta associata a bevande alcoliche. Tuttavia questa associazione, sempre che esista, sembra essere priva di alcuna base scientifica sistematica.

#### **c. Le spugnole sono innocue**

Siccome le spugnole sono molto apprezzate e ricercate, e sono considerate un eccellente fungo commestibile, molti raccoglitori e consumatori alle prime armi non sanno che le spugnole crude possono provocare disturbi gastrointestinali molto gravi, o possono indurre una serie di altri sintomi gastrointestinali o neurologici anche se ben cotte (PfaB et al., 2008; SaviuC et al., 2010; BenjaMin, 2015).

#### **d. *Morchella* e *Verpa bohemica* contengono monometilidrazina o giromitrina**

L'origine di questo mito non è chiara, anche se compare in un libro a firma di un importante micologo. La gente dovrebbe sapere che la maggior parte dei libri non sempre viene sottoposta ad un controllo editoriale serio, sistematico o attento: spesso dipende dalla casa editrice e dal redattore. E ora che molti libri sono pubblicati a spese dell'autore, la revisione editoriale può mancare del tutto. Esiste almeno una pubblicazione scientifica che ha dimostrato l'assenza di giromitrina nelle spugnole (anDary et al., 1985).

#### **e. Le *Verpa* sono tossiche**

A quanto pare questa convinzione deriva da una breve nota riportata molti anni fa dal Dr. Alexander Smith, micologo americano famoso e molto stimato, che manifestò deboli sintomi neurologici a seguito di un pasto a base di *Verpa bohemica*. L'affermazione che *Verpa bohemica* è tossica si trova ripetuta in molte guide micologiche da campo. Tuttavia, questo fungo viene tuttora largamente consumato senza problemi da molte persone (Davoli & Sitta, 2015).

#### **f. *Laetiporus sulphureus* e specie affini sono tutti commestibili**

Molte persone consumano *L. sulphureus* e specie affini senza problemi, sebbene fino al 20% dei consumatori manifestino disturbi gastrointestinali da deboli a moderati. Ciò può essere dovuto a sensibilità individuale, cottura insufficiente, confusione con note specie tossiche come *L. huronensis* e *L. conifericola* (BeuG et al., 2006). Bisognerebbe avvertire il pubblico di tali eventualità. Malgrado ciò, un gran numero di siti web

continua ad informare i propri lettori che *L. sulphureus* è perfettamente sicuro da consumare per chiunque.

**g. Tutti i polipori sono sicuri da consumare**

La diffusione della convinzione comune a proposito del valore e dell'efficacia di alcuni funghi per tutta una serie di scopi terapeutici ha portato all'utilizzo indiscriminato di qualsiasi poliporo, nonostante la mancanza pressoché totale di informazioni chimiche o cliniche per la maggior parte di essi. Sebbene moltissimi polipori siano probabilmente innocui, alcune specie sono certamente tossiche, come *Hapalopilus nidulans* (Azzolina et al., 2011, Villa et al., 2013).

**h. *Tricholoma equestre* (= *T. flavovirens*) è tossico**

Il primo resoconto di casi di raddomiolisi a seguito di pasti abbondanti di *Tricholoma equestre* in una regione della Francia pubblicato sulla prestigiosa rivista medica *New England Journal of Medicine* (BeDry et al., 2001) ha portato a una condanna pressoché immediata di questo fungo non solo da parte delle società micologiche, ma anche delle autorità governative in diverse nazioni europee (Peintner et al., 2013). Ciò è avvenuto a dispetto di secoli di consumo sicuro di questa specie e nonostante il fatto che nel lavoro originale siano rimasti molti aspetti da chiarire. Ci sono stati in seguito diversi casi in Polonia (Chodorowski et al., 2003; Chodorowski et al., 2004; Chodorowski et al., 2005; Nieminen et al., 2006; Nieminen et al., 2008; Sein Anand & Chwaluk, 2010; Chwaluk, 2013), tuttavia alcuni hanno messo in discussione la (presunta) tossicità di questo fungo. Negli Stati Uniti non è mai stato riportato alcun caso di intossicazione da questa specie e lo status di commestibilità e/o tossicità di questo fungo rimane da chiarire. Viene ancora consumato in molte nazioni europee come la Spagna, e anche negli Stati Uniti (Benjamin, 2016, Rzymyski & Klimaszyk, 2018). È stata anche avanzata l'ipotesi che la specie negli Stati Uniti possa non essere la stessa di quella europea.

**i. *Pleurocybella porrigens* è tossica**

I primi resoconti dal Giappone sulla potenziale tossicità di questo fungo hanno messo in allarme molte società micologiche che hanno consigliato ai raccoglitori di non consumarlo. Tuttavia le circostanze in cui la tossicità di questa specie si è manifestata in Giappone sono state davvero uniche e specifiche, in quanto tutti gli intossicati erano anziani con patologie renali preesistenti (Kato et al., 2004; Gejyo et al., 2005, Kurokawa et al., 2005; Kuwabara et al., 2005; Nishizawa, 2005; Obara et al., 2005). Molte domande rimangono tuttora aperte, compresa l'identificazione della tossina e il suo meccanismo di azione. Nessun caso è stato riportato in Nord America o in Europa.

**j. Tutti i boleti a pori rossi o viranti al blu sono tossici**

La convinzione che qualsiasi boleto a pori rossi o virante al blu sia tossico è molto diffusa negli Stati Uniti. Sebbene molti boleti con queste caratteristiche siano chiaramente non commestibili a causa del loro sapore amaro, o francamente tossici come *Rubroboletus eastwoodiae* e *R. satanas*, altri sono perfettamente commestibili. Questo fatto è ben noto in Europa, ma non è ancora ampiamente riconosciuto negli Stati

Uniti. Le società micologiche negli Stati Uniti sono piuttosto conservatrici nel dare consigli sulla commestibilità dei funghi. Ciò riflette probabilmente un'eccessiva prudenza da parte delle società micologiche americane e la paura di contenziosi legali nel caso in cui un loro membro manifestasse una reazione avversa dopo aver consumato un boleto di questo tipo.

**k. Il cardo mariano (silimarina) è un antidoto efficace per le intossicazioni da amatossine**

Sebbene estratti di cardo mariano (silimarina) [che contengono silibinina e altri flavolignani, NdT] siano stati utilizzati nel trattamento di pazienti con gravi intossicazioni da amatossine sia in Europa che negli Stati Uniti, nessuno studio controllato scrupoloso ne ha confermato in maniera conclusiva l'efficacia e l'utilizzo appropriato. Il problema di tali affermazioni a proposito di antidoti, soprattutto da parte dei giornalisti o dei mezzi di informazione, è che creano l'impressione che esista una cura specifica e facilmente disponibile, tanto da indurre a prestare minore attenzione al corretto riconoscimento dei funghi. Sono tuttora in corso ricerche per individuare quali pazienti traggano beneficio da questo agente specifico, e su tempi e dosi della sua somministrazione. Esiste anche la convinzione che qualsiasi preparato a base di cardo mariano per somministrazione orale comprato in farmacia o nel negozio di prodotti biologici locale sia efficace, quando invece il solo preparato che ha mostrato qualche beneficio è la sostanza somministrata per via intravenosa.

### Conclusioni

Esistono numerose modalità con cui la gente acquisisce informazioni sulla commestibilità dei funghi, specialmente coloro che provengono da culture che non hanno una tradizione di raccolta consolidata a scopo alimentare. L'affidabilità delle informazioni è spesso discutibile e nell'ambiente odierno dei "social media" elettronici la disinformazione si diffonde rapidamente, favorendo lo sviluppo di miti e malintesi. Alcuni funghi vengono dichiarati tossici sulla base di prove inconsistenti, mentre altri che sono perfettamente commestibili per la maggior parte delle persone dopo opportuno riconoscimento e preparazione sono invece trascurati. D'altro canto, molti dei cosiddetti funghi commestibili possono provocare effetti negativi in alcuni individui. Da solo questo fatto non è sufficiente per dichiarare un fungo come tossico per tutti. Né il semplice ritrovamento di una molecola tossica in un fungo dovrebbe implicare automaticamente che quella specie venga catalogata come tossica. Come osservato da Paracelso già nel XVI secolo, "Il veleno si trova ovunque, e nulla è senza veleno. È il dosaggio che lo rende veleno o cura." I gruppi e le organizzazioni micologiche amatoriali non dovrebbero aggiungere altra confusione. Consigliamo loro di valutare criticamente i nuovi proclami e i resoconti aneddotici di seconda mano, e li incoraggiamo a vigilare maggiormente sulle modalità con cui esaminano e diffondono

le informazioni sulla commestibilità dei funghi spontanei e sui loro eventuali effetti negativi.

## **Mushroom Edibility: Myths and misunderstandings**

### **l'applicazione della chiave di René Flammer come strumento di valutazione della pericolosità di un caso di intossicazione da funghi**

Gerald antenhofer

Comprensorio Sanitario di Bressanone, Servizio per l'Igiene e la Sanità Pubblica,  
via Dante, 51 - IT 39042 Bressanone (BZ) - E-mail: gerald.antenhofer@sabes.it

Una mattina di agosto del 2017 ho ricevuto una chiamata dal vicino ospedale: due persone si erano ammalate dopo un pasto a base di funghi e la notte si erano recate al pronto soccorso. Primi sintomi: vomito e diarrea. Latenza: tre ore. Visto che erano avanzati resti del pasto, mi è stata chiesta una determinazione dei funghi.

Prima valutazione del potenziale pericolo di avvelenamento da funghi secondo la chiave di René Flammer (2014):

A causa dei primi sintomi di “vomito e diarrea” e del tempo di latenza di “3 ore”, le seguenti sindromi di avvelenamento potevano essere classificate come orientative:

- Sindrome muscarinica;
- Sindrome paxillica;
- Sindrome gastrointestinale precoce;
- Sindrome di indigestione;
- Allergia da funghi.

Tenendo sempre presente che i sintomi di diarrea/vomito dopo l'ingestione di funghi sono sospetto di grave avvelenamento da funghi, anche con tempi di latenza brevi (<4 ore), fino a prova contraria.

#### **Ispezione macroscopica dei funghi sequestrati:**

Quattro cappelli, preparati in una impanatura, potevano essere identificati come *Agaricus sp.* Il colore lamellare scuro intenso e le lamelle parzialmente sciolte erano segni evidenti di deterioramento.

#### **Intervista pazienti:**

I due pazienti erano lavoratori ospiti provenienti dalla Slovacchia. Secondo le loro stesse dichiarazioni i funghi a lamelle di colore marrone con cappello bianco sono stati raccolti come presunti ombrelloni, *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer. Né durante la raccolta dei funghi, né durante la preparazione, sono state rilevate caratteristiche particolari, come una colorazione gialla al contatto oppure un odore o sapore sgradevole.

**Analisi delle spore:**

Marroni, da ellissoidali a largamente ellissoidali, lisce, a parete spessa, senza poro germinativo,  $5-6 \times 3-4 \mu\text{m}$ .

**Esito complessivo:**

In base alle indagini effettuate una cosiddetta sindrome da indigestione, causata da *Agaricus* sp. avariato, oppure una sindrome gastrointestinale precoce, causata da champignon tossici, era la causa evidente della malattia in entrambi i pazienti. A questo proposito è opportuno sottolineare quanto segue:

Il pasto di funghi in comune, così come la comparsa comune dei primi sintomi dopo circa tre ore con disturbi gastrointestinali.

Gli *Agaricus* sp. analizzati mostravano evidenti segni di deterioramento.

Le caratteristiche delle spore corrispondevano anche a quelle di specie tossiche come *Agaricus xanthodermus* Genev.

Un'analisi del DNA del 2018 dei residui di funghi ha supportato la specie *Agaricus impudicus* (Rea) Pilát; tale fungo è considerato commestibile.

**Discussione**

L'utilizzo della chiave secondo René Flammer 2014 come strumento di valutazione della pericolosità di intossicazione da funghi, sulla base dei primi sintomi e del tempo di latenza, consente una rapida e approssimativa presunta assegnazione ad una delle sindromi di intossicazione.

Tuttavia, la demarcazione delle singole sindromi è in parte artificiale, perché la natura spesso resiste al tentativo di ordinare le cose.

Pertanto, le transizioni e le eccezioni devono essere sempre prese in considerazione.

**Bibliografia**

Flammer R. - 2014: *Giftpilze*. Aarau und München.

**Trattazione delle sindromi funzionali a breve latenza  
(muscarinica, panterinica, allucinogena, coprinica e paxillica)  
e della sindrome gastrointestinale causate dalle principali specie  
a tossicità costante**

**discussion of functional syndromes with short latent period  
(muscarinic, pantherine, hallucinogenic, coprinus and paxillus syndromes) and  
gastrointestinal syndrome caused by the main species with constant toxicity**

Mirko Illice

Via Montechiaro, 12 - I 40037 Sasso Marconi (BO) - E-mail: m.illice@ausl.bologna.it (\*)

(\*) Ispettorato micologico dell'AUSL di Bologna

**RIASSUNTO**

Vengono descritte le sindromi tossiche a breve latenza, con particolare riferimento alle specie responsabili.

**ABSTRACT**

This work describes the main toxic syndromes with short latent period and the fungal species that cause them.

**Introduzione**

Molte specie fungine causano sindromi a breve latenza, per definizione caratterizzate dalla comparsa di sintomi a meno di 6 ore dal consumo. Per essere precisi, la latenza di queste sindromi è spesso notevolmente inferiore alle 6 ore, ma questo limite serve in realtà a differenziarle in modo netto e pratico da quelle, più gravi, a lunga latenza (maggiore di 6 ore). L'approccio clinico basato su questa distinzione è valido nella maggior parte dei casi, anche se può presentare alcuni punti critici, come, per esempio, nell'eventualità del consumo contemporaneo di specie a latenza lunga e a latenza breve. Generalmente le specie che hanno una tossicità a breve latenza non provocano la morte del paziente, salvo situazioni di particolare vulnerabilità della persona colpita (in particolare per l'età avanzata o per gravi patologie predisponenti).

Di seguito vengono sinteticamente illustrate le sindromi a latenza inferiore alle 6 ore e le principali specie fungine che le provocano.

## SINDROME MUSCARINICA

### **Sostanze responsabili**

La principale sostanza responsabile di questa sindrome è la muscarina che, identificata per la prima volta nel 1869 in *Amanita muscaria* (dalla quale prende il nome), è però presente in misura decisamente superiore in diverse altre specie.

### **Meccanismo d'azione, latenza e sintomi**

La muscarina agisce sul sistema nervoso mimando l'azione dell'acetilcolina, neurotrasmettitore deputato alla trasmissione nervosa sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico. L'intossicazione si presenta da 15 minuti a 3 ore dopo il pasto con sudorazione, lacrimazione, disturbi gastrointestinali, affanno, difficoltà respiratoria, ipotensione arteriosa, bradicardia.

### **Terapia**

Si interviene solitamente con gastrolusi, reidratazione e atropina, antagonista dell'acetilcolina per i recettori muscarinici, che funge da antidoto.

#### Principali specie responsabili

*Clitocybe* bianche (*C. dealbata*, *C. rivulosa*, *C. phyllophila*, *C. candicans* ecc.), *Inocybe* (*I. rimosa*, *I. patoullardi*, *I. praetervisa* ecc.), *Mycena* (*M. pura*, *M. rosea*, *M. pelianthina*).



*Clitocybe rivulosa* (Foto M. Illice)



*Inocybe rimosa*



*Mycena pura* (Foto M. Illice)

### Considerazioni

Poiché le specie implicate sono in genere poco carnose e poco appariscenti, non è molto frequente imbattersi in questo tipo di sindrome. L'errore più facile è la confusione che può avvenire durante la raccolta di piccole specie praticole eduli, in particolare *Marasmius oreades*.

## SINDROME PANTERINICA

### **Sostanze responsabili**

Sono costituite dall'acido ibotenico e dal muscimolo, sostanze chimiche correlate: il primo è precursore del secondo, ritenuto 5 volte più attivo.

### **Meccanismo d'azione, latenza e sintomi**

Queste sostanze agiscono sul sistema nervoso centrale provocando, dopo un periodo che va dai 15 minuti alle 3 ore dal consumo dei funghi, vertigini, vista annebbiata, stato confusionale e allucinazioni, seguite da stanchezza e sonno e, spesso, accompagnati o anticipati da nausea e vomito.

### **Terapia**

Sono costituite dalla gastrolusi, dalla somministrazione di carbone attivo o di solfato di magnesio e dalla reidratazione; in casi estremi possono essere usati sedativi.

### **Specie responsabili**

*Amanita muscaria* e *A. pantherina*; forse anche *A. gemmata*.

### **Considerazioni**

Non sono intossicazioni frequenti, in quanto le *Amanita* con verruche (in particolare *A. muscaria*) sono diffusamente conosciute, nel nostro Paese, come tossiche (e spesso ritenute anche più pericolose di quanto non siano effettivamente). Esemplari di *A. muscaria* che abbiano perso le verruche o la sua varietà aureola vengono talvolta confusi con la commestibile *A. caesarea* e perciò raccolti e consumati anche crudi. A volte *A. muscaria* viene assunta intenzionalmente per indurre effetti psicotropi; alcuni anni fa, sull'appennino modenese, si è verificata un'intossicazione per assunzione di *A. pantherina* scambiata per *A. muscaria*.



*Amanita muscaria* (Foto M. Illice)



*Amanita pantherina*

### Un'esperienza diretta

Al fine di portare al 6° Convegno Internazionale di Micotossicologia un'esperienza originale relativamente a una specie i cui effetti sono ampiamente (e spesso aneddoticamente) descritti in bibliografia (ed anche per soddisfare un'annosa curiosità personale), ho pensato di sperimentare in prima persona gli effetti dell'ingestione di *Amanita muscaria*.

Venerdì 16/11/2018, alle ore 17.10, ho dunque ingerito una porzione di cappello di *A. muscaria* del peso di 16 grammi, preventivamente lavato con acqua corrente, affettato e condito con olio extra vergine di oliva e sale. Attorno alle 18.00 ho avvertito un senso di spossatezza cui si è aggiunta, alle 19.10, una sensazione di “testa pesante” e un leggero senso di nausea al pensiero di consumare la restante porzione di cappello, alla quale ho dunque rinunciato. Alle 20.00 circa tutti questi sintomi erano scomparsi e mi sono sentito di nuovo in forma, al punto che ho deciso di cenare ... con una pizza al salame piccante. La mia esperienza non ha compreso alcun effetto allucinatorio.

Il giorno successivo, 17/11/2018, il collega Renato Todeschini, che avevo coinvolto, ha svolto una seconda parte della nostra esperienza, utilizzando esemplari provenienti dalla medesima località. Ha preparato 5 cappelli di *A. muscaria* del peso di 10, 22, 28, 36 e 40 grammi, per un totale di 136 grammi. Li ha lavati e tagliati e posti a bollire per 10 minuti, poi ha filtrato e raccolto il liquido di cottura. Successivamente li ha accuratamente lavati in un colapasta al fine di eliminare i restanti residui liquidi, poi li ha conditi con aglio, olio di oliva e sale prima di completare la cottura per altri 20 minuti. Li ha successivamente consumati in tre fasi: dapprima in quantità corrispondente a 10 grammi di prodotto fresco iniziale, poi (dopo 4 ore) in quantità corrispondente a 20 grammi, infine (dopo 17 ore) in quantità corrispondente a 105 grammi. Il sapore dei funghi risultava sempre gradevole e non ha mai avvertito alcun sintomo. Dopo altre 6 ore, previa bollitura a bagnomaria per ulteriori 10 minuti, ha in parte consumato il liquido di bollitura che aveva precedentemente raccolto, dapprima in quantità corrispondente a quella ricavata da circa 15 grammi di carpoforo, poi, dopo altre 18 ore, in quantità doppia. Anche in seguito a tali assunzioni non ha registrato alcun tipo di effetto.

Dalle nostre combinate esperienze possiamo ricavare, con molta semplicità, quanto segue:

1) gli esemplari da noi raccolti, nelle quantità consumate, erano dotati di scarsa tossicità e non procuravano effetti allucinatori;

2) cuocendoli ed eliminando l'acqua di cottura risultavano privi di tossicità, sempre nel limite delle quantità consumate;

3) il liquido di cottura risultava altresì, ancora una volta nel limite delle quantità assunte, privo di propria tossicità, evidenziando che l'eventuale inattivazione delle tossine era probabilmente dovuta più alla prolungata esposizione ad alte temperature che non alla loro idrosolubilità.

Non commentiamo ulteriormente queste semplici esperienze personali, ricordando solo che la velenosità di questa specie dipende non solo dalle quantità ingerite, ma, probabilmente, da molti altri fattori: luogo di crescita, stagione, maturità dei carpofori, varie parti anatomiche degli stessi, forme e varietà in cui si presenta. Eventuali nostri imitatori valutino che potrebbero essere meno fortunati di noi!

## SINDROME ALLUCINOGENA

### **Sostanze responsabili**

Sono rappresentate, in particolare, dalla psilocibina e dalla psilocina; la prima viene rapidamente defosforilata, una volta ingerita, a psilocina, con effetti psichedelici.

### **Meccanismo d'azione, latenza e sintomi**

La psilocina agisce sul sistema nervoso centrale mimando l'azione della serotonina e della dopamina, neurotrasmettitori del sistema nervoso. Gli effetti si manifestano mediamente dai 15 ai 45 minuti dall'assunzione dei funghi con vertigini, stordimento, alterazioni sensoriali, euforia, angoscia e sopore. I sintomi cessano generalmente in modo spontaneo dopo 6-12 ore.

### **Terapia**

Può essere utile sia la gastrolisi che l'uso di carbone attivo e, nei casi più gravi, di sedativi.

### **Specie responsabili**

Sono responsabili alcune *Psilocybe* italiane spontanee (*P. semilanceata* e *P. serbica*) e altre coltivate (*P. cyanescens*, *P. cubensis* ecc.). In bibliografia sono indicate come contenenti psilocibina numerose altre specie fungine, alcune delle quali, in realtà, potrebbero anche non provocare la sindrome, dato che il principio attivo è presente in esse in bassa quantità; tra queste specie vi sono *Pluteus salicinus*, diversi *Panaeolus*, *Gymnopilus junonius*, *Inocybe corydalina*, *Stropharia semiglobata* ecc.



*Psilocybe serbica* (Foto M. Illice)



*Psilocybe semilanceata*

### **Considerazioni**

La presenza di elevate concentrazioni di psilocibina si evidenzia con colorazioni verdi-azzurrognole del carpoforo alla manipolazione o con l'invecchiamento. Di solito queste intossicazioni sono "volontarie", in quanto chi ingerisce questi funghi lo fa per alterare il proprio stato di coscienza, utilizzandoli come sostanza stupefacente. Il

consumo accidentale è invece improbabile, in quanto i carpofori sono spesso di aspetto inconsueto (per dimensioni, forma e colori) e quindi suscitano un naturale sospetto nel raccoglitore. Anche l'habitat di crescita di *P. semilanceata* (la specie spontanea probabilmente più diffusa in Italia), ovvero i prati-pascoli montani, non sono un ambiente di abituale raccolta a scopo alimentare ed anche per questo motivo la confusione con specie eduli è piuttosto difficile.

#### SINDROME GASTROINTESTINALE

##### **Sostanze responsabili**

Benché alcune delle sostanze implicate (ad esempio, fenolo, bolesatina, terpeni e loro derivati, derivati antrachinonici ecc.) siano state identificate, la maggior parte non è ancora nota. Anche per molte di quelle conosciute non si è ancora bene compreso il meccanismo d'azione ed i reali effetti prodotti dall'ingestione dei funghi che le contengono.

##### **Meccanismo d'azione, latenza e sintomi**

Le sostanze presenti in questi funghi determinano, in generale, irritazione delle mucose gastrointestinali, nausea, dolori addominali, vomito, diarrea, a volte sudorazione e lacrimazione, che compaiono da 30 minuti a 4 ore (talvolta 6 ore) dall'ingestione.



*Entoloma sinuatum*



*Omphalotus olearius* (Foto M. Illice)



*Agaricus xanthodermus*



*Tricholoma pardinum*

(Foto M. Illice)



*Boletus satanas*



*Ramaria pallida*

(Foto M. Illice)



*Scleroderma citrinum*



*Russula sanguinea*

(Foto M. Illice)



*Lactarius torminosus*

## **Terapia**

Sempre efficaci sono la gastrolusi, l'utilizzo del carbone attivo e una adeguata reidratazione dei malati.

## **Specie responsabili**

Sono molto numerose: tra le più frequentemente coinvolte vi sono *Entoloma sinuatum*, *Omphalotus olearius*, *Agaricus* della Sezione *Xanthodermatei*, *Tricholoma pardinum*, *Rubroboletus satanas* (*Boletus satanas*), *Hypholoma fasciculare*, diverse specie di *Ramaria*, *Scleroderma*, *Russula* e *Lactarius*.

## **Considerazioni**

È questa, sicuramente, la più frequente sindrome fungina, in particolare provocata dalle prime quattro specie sopra elencate. *E. sinuatum* viene sovente confuso con *Clitocybe nebularis* e sono del parere che l'attuale cattiva "fama" di quest'ultima, per quello che riguarda la sua presunta tossicità, potrebbe in parte essere dovuta ad intossicazioni causate da *E. sinuatum* per le quali non sono forse stati svolti accertamenti microscopici o non era presente alcun tipo di reperto e ci si è basati esclusivamente sulle dichiarazioni del paziente. In realtà la particolare forma ed il colore delle spore di *Entoloma* renderebbero relativamente semplice l'individuazione della presenza, se non della specie, almeno di questo Genere nei residui di pasto consumato (anche nell'aspirato gastrico).

*O. olearius* viene invece di solito raccolto soprattutto quando cresce ad esemplari singoli e non direttamente dai tronchi, credendolo *Cantharellus cibarius*.

Gli *Agaricus* della Sezione *Xanthodermatei* (in particolare *A. xanthodermus*) vengono abbondantemente raccolti e consumati da persone che considerano indistintamente commestibili tutte le specie bianche del Genere *Agaricus* (prataioli); peraltro la tossicità delle specie di questo gruppo presenta variabili non ancora ben definite, in quanto conosciamo persone che hanno consumato più volte *A. xanthodermus* della stessa stazione di crescita senza accusare disturbi.

*T. pardinum* in particolare nel Nord Italia, viene probabilmente scambiato con i *Tricholoma* grigi commestibili o raccolto in quanto carnoso e di odore gradevole.

## SINDROME COPRINICA

### **Sostanze responsabili**

L'unica sostanza responsabile di questa sindrome è la coprina.

### **Meccanismo d'azione, latenza e sintomi**

Il meccanismo d'azione consiste nel blocco dell'aldeide deidrogenasi, enzima che catalizza la trasformazione dell'acetaldeide (derivato dell'etanolo) in acetato, con conseguente accumulo di acetaldeide, responsabile dei sintomi, nell'organismo.

L'intossicazione si presenta dopo 15-60 minuti dal consumo di alcol che accompagna il pasto a base del fungo e si manifesta con rossore cutaneo, eritemi

(soprattutto al viso e al torace), vampate di calore, nausea, cefalea ed ipotensione arteriosa; ulteriori assunzioni di alcool possono riprodurre i sintomi per un certo periodo. L'effetto è simile a quello prodotto dal farmaco Antabuse (il cui principio attivo è il disulfiram) utilizzato nella cura dell'alcolismo. I sintomi scompaiono spontaneamente nel giro di alcune ore.

**Terapia**

È sufficiente un semplice monitoraggio clinico soprattutto nei cardiopatici, con eventuale trattamento terapeutico solo in caso di necessità.

**Specie responsabili**

*Coprinus atramentarius* (*Coprinopsis atramentaria*) (e altri *Coprinus*?)

**Considerazioni**

Il bassissimo contenuto in coprina di altre specie del Genere *Coprinus*, spesso anche poco interessanti per il consumatore per l'esiguità e il veloce deterioramento, rende molto improbabile il loro coinvolgimento in queste intossicazioni.

SINDROME PAXILLICA

**Sostanze responsabili**

Non sono ancora note.



*Coprinopsis atramentaria*

(Foto M. Illice)



*Paxillus involutus*

(Foto M. Illice)

#### **Meccanismo d'azione, latenza e sintomi**

L'assunzione ripetuta dei funghi porta allo sviluppo di anticorpi che coinvolgono i globuli rossi con formazione di coaguli circolatori e possibile crisi emolitica. I sintomi compaiono alla distanza di 1-3 ore dall'ultimo pasto e si manifestano con dolori addominali, diarrea, anemia con affaticamento, emoglobinuria, dolori renali e shock, nei casi più gravi fino alla morte.

#### **Terapia**

Risultano utili la gastrolisi, l'uso del carbone attivo ed eventualmente la separazione del plasma ed eventuali trasfusioni ematiche.

#### **Specie responsabili**

*Paxillus involutus* e altri *Paxillus* di recente istituzione macroscopicamente molto simili e, per analogia, anche *P. rubicundulus* e *P. atrotomentosus* (*Tapinella atrotomentosa*).

#### **Considerazioni**

*P. involutus* (in realtà si pensa sia una specie "collettiva") è stato ritenuto a lungo commestibile, ma, in considerazione dell'aspetto sordido e del viraggio intenso, raramente è stato considerato con favore dai raccoglitori occasionali; persone più esperte lo hanno comunque saltuariamente consumato senza problemi. Forse, come per

altri funghi, occorre raggiungere un limite “soglia” affinché si manifesti la sindrome, ed anche la predisposizione individuale potrebbe giocare un ruolo determinante.

## BIBLIOGRAFIA

- Assisi f., S. Balestreri & r. Galli - 2010: *Funghi velenosi*. Dalla Natura Editore.
- Attili G. - 2018: *Micologia professionale*. Consultata in ottobre 2018 da [www.micologiaprofessionale.it](http://www.micologiaprofessionale.it)
- AA.VV. - 1999: *Atti del 1° Convegno Internazionale di Micotossicologia*. Pagine di micologia, Vol. 11.
- AA.VV. - 2002: *Atti del 2° Convegno Internazionale di Micotossicologia*. Pagine di micologia, Vol. 17.
- AA.VV. - 2006: *Atti del 3° Convegno Internazionale di Micotossicologia*. Pagine di micologia, Vol. 25.
- AA.VV. - 2013: *Atti del 4° Convegno Internazionale di Micotossicologia*. Pagine di micologia.
- AA.VV. Ausl Bologna - 2014: *Atlante dei funghi velenosi* della provincia di Bologna. Consultato in ottobre 2018 da [https://www.ausl.bologna.it/asl-bologna/dipartimenti-territoriali-1/dipartimento-di-sanita-pubblica/copy\\_of\\_isp/ian/copy\\_of\\_igiene-degli-alimenti/funghi/atlante-funghi-velen-prov-Bologna/atlante-deifunghivelenosi-della-provincia-di](https://www.ausl.bologna.it/asl-bologna/dipartimenti-territoriali-1/dipartimento-di-sanita-pubblica/copy_of_isp/ian/copy_of_igiene-degli-alimenti/funghi/atlante-funghi-velen-prov-Bologna/atlante-deifunghivelenosi-della-provincia-di).
- D'ANTUONO G. & r. TOMASI - 1988: *I funghi velenosi- Tossicologia micologica, terapia clinica*. Edagricole. Bologna
- FOLLESA P. - 2009: *Manuale Tecnico Pratico per indagini su campioni fungini*. A.M.B. Fondazione Centro Studi Micologici A.M.B. Trento.
- PELLE G. - 2007: *Funghi velenosi e sindromi tossiche*. Bacchetta Editore. Albenga.
- WIKIPEDIA, L'ENCICLOPEDIA LIBERA. Consultata in ottobre 2018 da <http://it.wikipedia.org/>.

# **La collegialità nel trattamento delle intossicazioni da funghi: luci e ombre**

<sup>1</sup>FRANCESCA ASSISI, <sup>1</sup>MAURIZIO BISSOLI, <sup>1</sup>FRANCESCA DAVANZO, <sup>1</sup>VALERIA DIMASI, <sup>1</sup>MARCELLO FERRUZZI,  
<sup>1</sup>JOHANNE GEORGATOS, <sup>1</sup>ELISA MALAVASI, <sup>1</sup>ILARIA REBUTTI, <sup>1</sup>ANGELO TRAVAGLIA, <sup>2</sup>PAOLO SEVERGNINI,  
<sup>1</sup>FABRIZIO SESANA, <sup>1</sup>ANDREA STELLA, <sup>1</sup>GIOVANNI MILANESE, <sup>1</sup>PAOLA MORO

## **Riassunto**

Nelle intossicazioni da funghi, è difficile eseguire una comparazione critica degli strumenti diagnostici.

In questo studio retrospettivo sono state analizzate 4.198 richieste di consulenza per ingestione di funghi pervenute al Centro Antiveleni di Milano (CAV) nel periodo 01/01/2012- 31/12/2017. Sono stati identificati i casi sintomatici (n= 3.377) e da questi è stato estrapolato un campione di 2.549 pazienti, relativi all'ingestione di funghi non controllati.

La diagnosi d'intossicazione da amatossine (184 casi) è stata fatta per l'evoluzione clinica e/o il dosaggio dell'amanitina urinaria; tra questi, sette pazienti sono deceduti e sette trapiantati: la mortalità è stata del 3.8%.

È stata valutata sia la compliance dell'Ospedale nel far eseguire l'esame micologico indicato dal medico CAV su residui del pasto o di vomito, sia la disponibilità e fattibilità dell'esame: è risultato che, il riconoscimento micologico effettuato rispetto al numero d'indagini consigliate, è stato comunicato al CAV solo nel 44.22% dei casi.

Il dosaggio dell'amanitina urinaria è stato un dato molto disomogeneo nella realtà italiana.

L'assenza di un Registro Nazionale e la mancanza di coordinamento tra gli attori (CAV, Ispettorati Micologici e Istituzioni) non consente l'uso di dati omogenei per eseguire un confronto critico tra strumenti diagnostici/terapeutici e una corretta valutazione statistica micotossicologica.

Nelle intossicazioni fungine, si rimarca la necessità di un coordinamento nazionale degli interventi e di un maggior scambio d'informazioni tra Tossicologo, Medico di Pronto Soccorso e Micologo, al fine di migliorare l'approccio diagnostico e gli interventi terapeutici.

## **Teamwork effectiveness factors in the management of Mushrooms poisonings: lights and shadows**

### **Abstract**

The surveillance and the management of mushroom poisoning exhibit various critical aspects. We analyzed 4,198 requests for ingestion of mushrooms handled by the PCC of Milan in the period 01/01 / 2012- 31/12/2017; among the symptomatic cases (n= 3.377), 2.549 were related to the ingestion of uncontrolled wild mushrooms.

An amanitin poisoning based on clinical symptoms, blood tests and/or the detection of amatoxins in urine was diagnosed in 184 cases: seven patients with acute liver failure died and seven were transplanted. The MPCC received a feedback by the Hospitals about the execution of the mycological exam, suggested by the toxicologist only in 44.22% of cases.

Nationwide availability of urine test for detection of amatoxins appears to be uneven in Italy. The absence of a National Registry and the lack of coordination among the actors (PCC, Mycological Inspectorates and Institutions) do not allow the use of homogeneous data to carry out a critical comparison of diagnostic and therapeutic tools and a statistic evaluation more responding to the national toxicological reality.

---

<sup>1</sup> Centro Antiveleni di Milano - <sup>1</sup>Poison Control Centre Milan (MPCC) Niguarda Cà Granda Hospital, Italy

<sup>2</sup> Univ. Degli studi dell'Insubria- Dipartimento Biotecnologie e Scienze della Vita - <sup>2</sup>Department of Biotechnologies and Sciences of Life, Insubria University, Como-Varese, Italy

The study highlights the need for a better and greater exchange of information among the toxicologist, the emergency departments and mycologist, in order to improve the diagnostic and therapeutic interventions in mushroom intoxications.

## INTRODUZIONE

Il CAV di Milano, ogni anno, gestisce circa un migliaio di richieste di consulenze riguardanti le intossicazioni da funghi, questo dato però non rispecchia la reale entità del problema, che resta per la maggior parte sommersa.

Infatti, il numero dei pazienti conteggiati nella nostra casistica, non corrisponde al reale numero dei pazienti intossicati a livello nazionale, sia perché non sono tutti gestiti direttamente da questo CAV, sia per la mancanza di rilevazione statistica accurata da parte di un organismo competente che accentri tutte le segnalazioni.

Le manifestazioni cliniche, associate all'ingestione di funghi velenosi o non commestibili, sono varie e in rapporto con la specie fungina implicata; anche l'ingestione di funghi considerati eduli (*Armillaria mellea*, *Boletus edulis* ecc.), di solito consumati crudi o in quantità elevate, possono determinare gastroenteriti che richiedono l'intervento medico.

Lo schema del tempo di latenza nella comparsa di sintomi, in caso d'ingestione di funghi non controllati, può aiutare a inquadrare il problema: si presume che una latenza da 30 minuti a 6 ore dall'ingestione, non comporti danni d'organo di particolare gravità; invece, una latenza maggiore alle 6 ore è da considerare potenzialmente pericolosa e può determinare un'alta incidenza di mortalità.

Ovviamente, la contemporanea ingestione di diverse specie fungine, comporta la presenza di manifestazioni cliniche miste e una breve latenza può mascherare una ben più pericolosa intossicazione, che darà disturbi successivamente, oltre le canoniche 6 ore.

Il Centro Antiveneni di Milano usa un protocollo di trattamento, per le sospette intossicazioni da funghi non controllati, che prevede la decontaminazione con lavanda gastrica (GL) e carbone in polvere.

Nelle intossicazioni con latenza superiore alle 6 ore, oltre alla decontaminazione (GL, carbone a dosaggio ripetuto), si somministra un'iperidratazione (1L/10 kg di peso), fino al ripristino di una normale volemia e non fa uso di sostanze antidotiche; inoltre, segue con molta attenzione l'evoluzione clinica, valutando la terapia più idonea al singolo caso.

Per una diagnosi accurata il CAV si avvale del dosaggio dell'amanitina urinaria e del controllo micologico da effettuare su residui cotti/crudi e materiale biologico (vomito, aspirato gastrico).

Il dosaggio dell'amanitina urinaria non è ancora possibile in molte regioni, per cui non sempre è disponibile il dato di laboratorio.

L'intervento del micologo, dopo l'ingestione di funghi non controllati, è sempre consigliato indipendentemente dalla latenza dei sintomi, a patto che ci siano residui da analizzare; spesso però, l'esecuzione di questo intervento è resa difficoltosa oltre per la mancanza di residui, per la mancanza di un servizio micologico strutturato e capillare.

## OBIETTIVI

I primi interventi sulle intossicazioni da funghi negli anni novanta, erano effettuati da un solo Ispettorato Micologico, quello di Milano, i campioni arrivavano in aereo da tutta l'Italia; solo pochissime persone erano capaci di analizzare residui freschi/cotti (con relativi metodi colorimetrici e microscopici) ed erano in grado di dare risposte sulle specie coinvolte nelle intossicazioni.

Negli ultimi anni si è costruita una maggior presenza, in ogni regione italiana, di figure professionali attente e addestrate ad affrontare tematiche micotossicologiche, anche sul territorio di competenza.

Ci siamo prefissati l'obiettivo di verificare la fattibilità di questo prezioso strumento diagnostico con le relative criticità e l'impatto dello stesso sulla terapia in acuto.

Invece, per quanto riguarda il dosaggio dell'amanitina urinaria, pur essendo cambiata la metodica, che non necessita più di personale specializzato, non si riesce a farla eseguire in modo omogeneo.

Infatti, non tutte le regioni hanno laboratori attrezzati per la sua esecuzione ed è per questo motivo che, pur essendo un dato di laboratorio importantissimo, in questo contesto non sarà presa in considerazione.

## MATERIALI E METODI

Le richieste di consulenza al CAV di Milano, provengono sia da fuori ospedale, sia da una struttura ospedaliera e sono documentate su un supporto informatico che consente la raccolta dei dati

anagrafici del paziente, la città di provenienza della chiamata, il recapito telefonico del chiamante, il reparto e il medico chiamante.

I dati riguardanti il campione Extraospedaliero, oltre alle notizie anagrafiche riguardanti età e sesso, sono: la provenienza e la tipologia dei funghi consumati, il tipo di cottura; il tempo intercorso tra ingestione e comparsa dei sintomi (<6/>6 di ore); il numero di commensali coinvolti e quanti sintomatici; il tipo di disturbi e la loro durata.

Per il campione Ospedale i dati rilevati sono sovrapponibili a quelli raccolti per l'extraospedaliero, con più una raccolta dati sul tipo di sintomatologia (gastroenterica, neurologica, ecc.) e la sua entità.

È stata valutata la gravità dell'intossicazione in base alla presenza o meno di danno a carico di organi vitali, alla durata del ricovero e all'evoluzione (remissione/trapianto/decesso).

Inoltre, per questo lavoro, è stato verificato l'eventuale contatto con un micologo per il riconoscimento dei residui e, se sì, quali specie erano coinvolte nell'intossicazione; oltre all'eventuale dosaggio dell'amanitina.

Dal 1-01-2012 al 31-12-2017 al Centro Antiveneni di Milano sono pervenute 4.198 richieste di consulenza per intossicazione da funghi, provenienti da tutte le regioni italiane; abbiamo selezionato un campione di 3.377 soggetti con sintomatologia secondaria all'ingestione di funghi; le restanti 821 richieste riguardano richiami di casi precedenti o informazioni in merito al problema funghi.

Tutti hanno presentato sintomatologia gastroenterica e/o sintomi sindromici specifici (Sindrome Anticolinergica, Colinergica, ecc.), in rapporto alla specie fungina ingerita, tali da richiedere l'intervento di un sanitario e/o il ricovero ospedaliero.

In base alla tipologia della latenza dei sintomi, rispetto all'ingestione, sono stati suddivisi in 2 gruppi a BREVE (<6 ore) e LUNGA LATENZA (>6 ore).

Da questi 3.377 pazienti è stato estrapolato un campione costituito da casi con sintomatologia determinata dall'ingestione di pasto a base di funghi non controllati, costituito da 2.549 soggetti, suddivisi in due gruppi, secondo la provenienza della richiesta di consulenza: Extraospedale e Ospedale.

Per entrambi è stato preso in esame il numero di controlli micologici suggeriti dal CAV e per quelli ospedalieri è stato valutato il numero di casi in cui il micologo è effettivamente intervenuto e quali specie fungine sono state riconosciute come causa dei disturbi.

Nella maggior parte delle intossicazioni a lunga latenza, data la mancanza di residui, non si riesce ad avere un riscontro micologico se non in casi eccezionali; perciò la diagnosi è di solito posta per la positività del dosaggio dell'amanitina urinaria (quando fattibile) e/o per l'evoluzione clinica (epatiti secondarie a ingestione di funghi non controllati).

## RISULTATI

Dall'analisi dei risultati, la provenienza delle chiamate è stata statisticamente più rilevante per la regione Lombardia, ma le richieste sono pervenute da tutta l'Italia (Grafico 1, v. pag. seg.).

Su un campione complessivo di 4.198 richieste di consulenza, 3.377 erano riferite a pazienti con sintomi clinici dovuti all'ingestione di funghi, anche controllati.

La contemporanea presenza accertata di 1.755 altri commensali, con sintomi clinici per la stessa chiamata, fa aumentare il numero dei soggetti con sintomatologia seguiti dal CAV a 5.132 (tab. 1, v. pag. seg.).

La provenienza delle richieste di consulenza, per i casi clinici, è stata prevalentemente ospedaliera, infatti, 2.324 pazienti (68.81%) erano arrivati in Pronto Soccorso di propria iniziativa, mentre in 1.053 casi (31.18 %) la richiesta di assistenza proveniva da privati cittadini, Medici di base o di Guardia Medica.

In questi ultimi casi, il 51.66% (544) è stato inviato dal Medico CAV, in un Pronto Soccorso, mentre i restanti sono stati affidati al medico curante.

Da ciò si dimostra che, la serietà dei disturbi provocati nella maggior parte dei casi dall'ingestione di funghi non controllati, ha richiesto un intervento medico ospedaliero, rispetto a un trattamento sintomatico domiciliare.

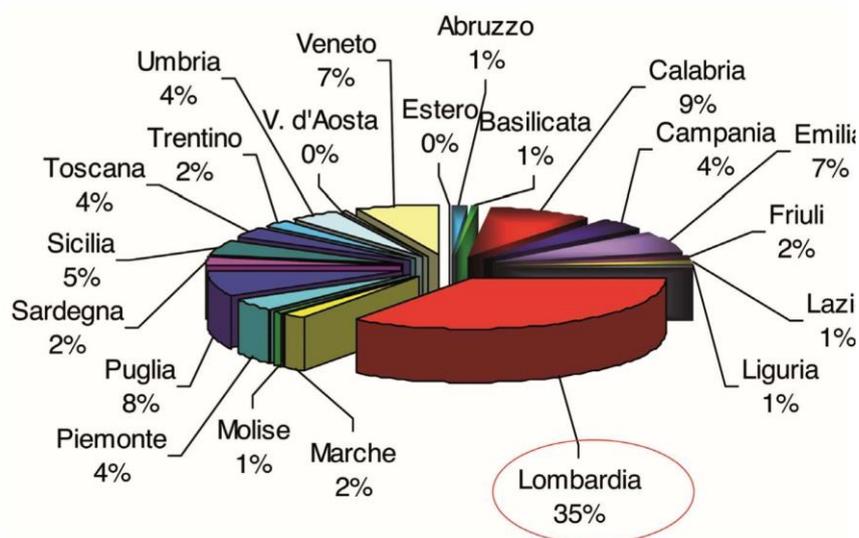


Grafico 1) Intossicazioni da funghi: Regioni di provenienza

ANNI	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Tot
<b>TOTALI CHIAMATE</b>	930	780	705	696	619	468	4.198
<b>INFORMAZIONI/RICHIAMI</b>	189	133	151	129	122	97	821
<b>CASI CLINICI</b>	741	647	554	567	497	371	3.377
<b>Commensali sintomatici (q.r.)</b>	382	319	234	318	273	229	1.755
<b>Tot. Pazienti intossicati</b>	1.123	966	788	885	770	600	5.132
<b>BREVI LATENZE</b>	488	456	371	372	325	248	2.260
<b>LUNGHE LATENZE</b>	138	130	106	126	108	68	676
<b>Sintomi non correlati</b>	51	30	35	43	43	34	236
<b>Ingestione bambini</b>	64	31	42	26	18	21	202
<b>DECESSI</b>	1	2	2	1	0	1	7
<b>TRAPIANTI</b>	2	0	2	2	1	0	7

Tab. 1) intossicazioni da funghi CAV Milano

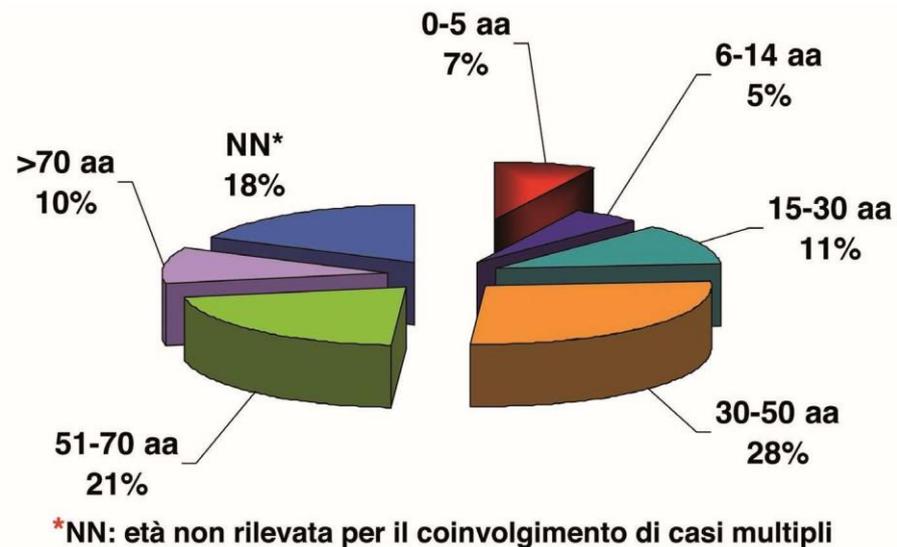


Grafico 2) Intossicazioni da funghi: Fasce d'età

Riguardo all'età dei soggetti coinvolti (Grafico 2), la fascia di età più coinvolta è, ovviamente quella media (30-50 aa), il dato più interessante è rappresentato dalle fasce estreme: età minima 8 mesi e massima 95 anni.

I bambini da 0 a 5 anni rappresentano il 7% delle intossicazioni (o sospette tali in caso d'ingestione di funghetti) anche se, la maggior parte, ha presentato disturbi per ingestione sia di funghi controllati, sia non controllati.

La maggior parte delle consulenze riguardava pazienti che hanno avuto bisogno d'intervento del medico, per intossicazione secondaria all'ingestione di funghi; in alcuni casi i sintomi sono stati molto importanti (>6 episodi di vomito e diarrea).

Nel gruppo dei 3.377 pazienti, con sintomi dopo l'ingestione sia di funghi non controllati, sia controllati, l'esame micologico effettuato, prevalentemente nei casi d'ingestione di funghi non controllati, ha consentito di individuare la specie fungina responsabile, nella maggioranza dei casi. Nelle ingestioni con più specie fungine è stata data rilevanza alla specie più tossica individuata.

Nella tabella 2 sono stati riportati tutti i casi con sintomatologia riferita sia all'ingestione di funghi provenienti da supermercato o ingeriti in un esercizio pubblico, sia quelli provenienti da raccolta individuale e ingeriti senza previo controllo micologico.

Abbiamo conteggiato tutti i pazienti sintomatici coinvolti nell'intossicazione, anche i commensali (quando noti); la maggior parte di questi pazienti ha avuto solo sintomatologia tipica della specie fungina ingerita (sindrome), altri sintomatologia gastrointestinale.

#### **Pazienti con sintomatologia sindromica:**

27 casi i cui sintomi erano allucinazioni, dovute all'ingestione di *Amanita muscaria* e funghi allucinogeni nn;

12 pazienti hanno presentato sintomi anticolinergici per aver consumato *Amanita pantherina*;

70 soggetti hanno avuto sintomi colinergici per ingestione di *Inocybe* e *Clitocybe* bianche.

Hanno sviluppato insufficienza renale per ingestione di *Cortinarius orellanus* 1 paziente e 5 per ingestione di *Amanita proxima*.

Pazienti con sintomatologia prevalentemente gastroenterica:

42 casi per ingestione di *Clitocybe nebularis*;

98 pazienti per ingestione di *Entoloma lividum*;

98 soggetti per ingestione di *Omphalotus olearius*;

Sintomi gastrointestinali (a volte con latenza > alle 6 ore) in 254 pazienti per ingestione di *Armillaria mellea* e in 377 per ingestione di *Boletus* gruppo *edulis*; queste ultime due specie erano implicate in casi clinici dopo ingestione di singola specie, sia nell'ingestione di funghi controllati, sia nei non controllati; ovviamente, nelle ingestioni miste non sono state conteggiate ed è stato dato peso alla specie non commestibile (vedi tab. 2).

<b>ANNI</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>TOT.</b>
<b>CASI CLINICI</b>	<b>741</b>	<b>647</b>	<b>554</b>	<b>567</b>	<b>497</b>	<b>371</b>	<b>3.377</b>
<b>AGENTI</b>							
<b>FUNGHI CONTROLLATI (NN)</b>	<b>162</b>	<b>171</b>	<b>129</b>	<b>122</b>	<b>124</b>	<b>120</b>	<b>828</b>
<b>FUNGHI NON CONTROLLATI</b>	<b>515</b>	<b>445</b>	<b>383</b>	<b>419</b>	<b>355</b>	<b>230</b>	<b>2.347</b>
<b>FUNGHI NN (ingestione accidentale bambini)</b>	<b>64</b>	<b>31</b>	<b>42</b>	<b>26</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>202</b>
<b>Sp. FUNGINE RICONOSCIUTE DA MICOLOGO (N° pazienti certi)</b>							
<b>A. MUSCARIA/ ALLUCINOGENI</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>27</b>
<b>AMANITA PANTHERINA</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12</b>
<b>FUNGHI CON AMATOSSINE</b>	<b>57</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>31</b>	<b>20</b>	<b>13</b>	<b>184</b>
<b>CLITOCYBE NEBULARIS</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>42</b>
<b>INOCYBE/ CLITOCYBE</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>70</b>
<b>CORTINARIUS ORELLANUS</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>ENTOLOMA LIVIDUM</b>	<b>31</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>98</b>
<b>ARMILLARIA MELLEA</b>	<b>84</b>	<b>47</b>	<b>13</b>	<b>25</b>	<b>39</b>	<b>46</b>	<b>254</b>
<b>BOLETUS GRUPPO EDULIS</b>	<b>69</b>	<b>73</b>	<b>52</b>	<b>73</b>	<b>49</b>	<b>61</b>	<b>377</b>
<b>OMPHALOTUS OLEARIUS</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>23</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>98</b>
<b>A. PROXIMA</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

Tab. 2) N° di pazienti intossicati da specie fungine riconosciute su residui

I pazienti in cui è stata posta diagnosi certa d'intossicazioni da amatossine o per riconoscimento micologico e/o amanitina urinaria positiva, o per quadro clinico sviluppato (insufficienza epatica di grado variabile), sono stati 184.

A tutti è stato applicato il protocollo CAV Milano che prevede: lavanda gastrica, somministrazione di carbone vegetale attivato a dosi ripetute e ripristino delle perdite di acqua e sali verificatesi per i numerosi episodi di vomito e diarrea.

I pazienti che in questo gruppo sono deceduti sono stati 7 (3.8%), per la maggior parte, sono arrivati alle cure specifiche con notevole ritardo; in altri 7 casi è stato necessario sottoporli al trapianto di fegato: la maggior parte dei pazienti con evoluzione sfavorevole, erano pazienti anziani e/o trattati tardivamente (2/4 giorni dall'ingestione).

Un caso si è presentato in ospedale dopo addirittura 7 giorni dalla prima ingestione di funghi non controllati, dichiarando che, nonostante la comparsa di vomito e diarrea, ha continuato a consumarne per giorni, fino a quello prima del ricovero: ovviamente, era già in atto un'epatite gravissima che l'ha portato al decesso poche ore dopo il ricovero.

Tutti gli altri pazienti intossicati da amatossine, cui è stato applicato il protocollo in modo tempestivo, sono stati dimessi dopo circa 7/10 giorni dall'ingresso in ospedale.

Tutti i pazienti con manifestazioni sindromiche sono stati sottoposti a decontaminazione con lavanda gastrica (nelle ingestioni recenti o con marcati episodi di vomito), somministrazione di carbone in polvere e terapia sintomatica.

Da questi 3.377 pazienti è stato estrapolato un campione di soggetti con sintomatologia determinata dall'ingestione di pasto a base di funghi non controllati (2.347 soggetti sia adulti, sia bambini) cui abbiamo aggiunto 202 bambini che hanno ingerito funghi non noti (per esempio funghetti nel prato dell'asilo) in tutto 2.549 casi (78.48%).

I restanti 828 casi sono pazienti con problematiche cliniche secondarie all'ingestione di funghi controllati come *Boletus* gruppo *edulis*, *Armillaria mellea*, oppure funghi acquistati al supermercato o consumati in pubblico esercizio.

L'estrapolazione di questo campione ha lo scopo di valutare l'intervento del micologo nel riconoscimento delle specie fungine responsabili di eventi tossici, con particolare attenzione all'ambiente ospedaliero.

Dei 2.549 pazienti che hanno ingerito solo funghi non controllati, in 1.921 si sono recati in ospedale spontaneamente, invece 637 hanno chiamato prima il CAV.

Il medico che ha valutato questi ultimi, in base alla provenienza dei funghi, al tipo di preparazione, alla latenza e alla gravità dei sintomi, ha inviato 412 pazienti (64.67%) in ospedale, con richiesta di valutazione medica e micologica (Grafico 3).

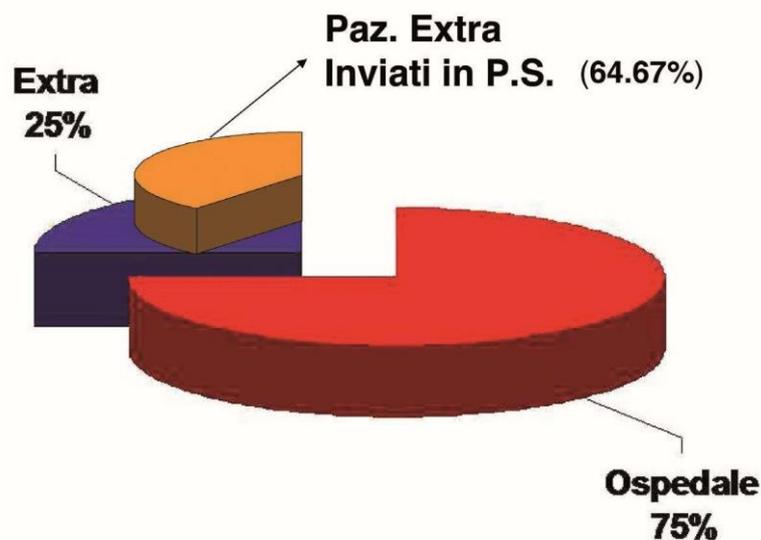


Grafico 3) Funghi non controllati: provenienza

Nei restanti 225 casi è stata consigliata valutazione del medico di base e in 22 casi, un controllo micologico.

L'obiettivo del nostro studio è la compliance dell'Ospedale nell'eseguire l'esame micologico, per cui abbiamo preso in considerazione solo i 1.921 pazienti afferiti direttamente in PS.

Il medico del CAV, ha consigliato all'ospedale chiamante, ovviamente se erano presenti residui, di eseguire un esame micologico in 952 casi.

Di queste richieste abbiamo una corrispondenza per 421 casi (44.22%) in cui è stato effettuato l'esame micologico.

Analizzando i dati si è riscontrato che durante la valutazione micologica sono stati riconosciuti 23 generi di funghi differenti, ovviamente sono state segnalate solo le specie più tossiche e più corrispondenti al quadro clinico, per ogni singolo intervento micologico; in caso d'ingestioni miste (commestibile/non commestibile) è stata conteggiata solo la specie tossica/velenosa.

In solo 34 interventi è stato possibile riconoscere *Amanita phalloides* e/o lepiotine di piccola taglia (il 18.47% delle intossicazioni da amatossine), 30 *Entoloma sinuatum*, 34, 18 *Agaricus xantodermus*, 18 *Lactarius* sp., solo per citarne alcune.

Il numero di casi con problematiche cliniche in cui sono state riconosciute specie commestibili (*Boletus* gruppo *edulis*, *Armillaria mellea*, *Macrolepiota procera*, ecc), ovviamente erano ingestioni di una singola specie fungina.

In 90 casi non è stato possibile il riconoscimento dettagliato della specie fungina coinvolta, ma il micologo è comunque riuscito a escludere la presenza di funghi velenosi mortali, perciò si è potuto dedurre che il problema clinico poteva essere gestito in sicurezza, con la decontaminazione, se necessaria e farmaci sintomatici (Tab. 3).

Ovviamente, più preciso e attento è l'esame micologico, maggiori sono le certezze sulla tossicità o meno dei funghi responsabili.

Per una corretta diagnosi è fondamentale determinare tutte le specie fungine responsabili delle intossicazioni, nel nostro studio è stato possibile solo in alcuni casi e questo sia perché mancavano residui fungini utili per un approfondito esame micologico, sia per l'assenza di un micologo in grado di gestire le problematiche riguardanti i campioni provenienti da un'intossicazione.

Riguardo all'amanitina urinaria, come già detto, è stata troppo disomogenea, i laboratori in grado di dosarla sono sparsi nelle varie regioni e spesso non utilizzabili durante la notte o nei fine settimana.

Per razionalizzare la spesa, per esempio il laboratorio di Niguarda, dosa tutte le amanitine che riceve entro le 15.00, rimandando al giorno dopo, quelle che arrivano in ritardo, dal lunedì al sabato: perciò le intossicazioni del fine settimana hanno come unica possibilità diagnostica, oltre la clinica, la valutazione dei residui fungini da parte del Micologo.

La maggior parte delle ASSL ha istituito un periodo di reperibilità micologica, concentrato nel periodo agosto/novembre o primi di dicembre.

SPECIE FUNGINE RICONOSCIUTE DA MICOLOGO IN CORSO D'INTOSSICAZIONE (N.B. NELLE INTOSSICAZIONI MISTE È STATO SEGNALATO SOLO LA SPECIE PERICOLOSA)							
ANNI CASI CLINICI	2012	2013	2014	2015	2016	2017	TOT.
	741	647	554	567	497	371	3.377
FUNGHI NON CONTROLLATI	579	476	425	445	373	252	2.549
							Tot.
AMATOSSINE (A. phalloides e simili)	10	5	3	3	11	2	34
A. MUSCARIA/ALLUCINOGENI	3	0	1	0	0	1	5
AMANITA PANTHERINA	3	1	1	0	0	0	5
A. OVOIDEA	0	0	2	0	0	0	2
A. PROXIMA	1	0	1	2	0	0	4
AGARICUS XANTHODERMA	4	1	2	3	3	5	18
ARMILLARIA MELLEA	20	11	2	8	10	18	69
BOLETUS GRUPPO EDULIS	3	4	4	11	13	8	43
BOLETUS SATANAS	0	0	1	1	0	0	2
CLITOCYBE NEBULARIS	3	0	3	1	1	1	9
CLITOCYBE/ INOCYBE	2	2	2	5	0	0	11
COPRINUS	0	0	0	0	1	0	1
ENTOLOMA LIVIDUM	6	4	4	9	3	4	30
GYROMITRA E.	0	0	1	0	0	0	1
LACTARIUS S.p	0	3	2	4	7	0	16
MACROLEPIOTA PROCERA	7	2	2	1	2	1	15
OMPHALOTUS OLEARIUS	9	1	8	6	4	6	34
PANAEOLUS F.	0	0	1	0	2	1	4
PLEUROTUS	0	0	0	0	1	1	2
RAMARIA FORMOSA	0	0	1	3	2	1	7
RUSSULA EMETICA	3	1	5	3	1	0	13
SCLERODERMA CITRINUM	1	0	1	1	0	0	3
TRICHOLOMA PARDINUM	2	1	0	2	0	2	7
FUNGHI NN / NON MORTALI	27	8	21	8	15	7	90
TOT	104	44	68	71	76	58	421

Tab. 3: Numero di interventi micologici

Tab. 3) Numero di interventi micologici

## DISCUSSIONE

Determinare con esattezza la specie coinvolta nelle intossicazioni, è estremamente importante, purtroppo, non sempre la rilevazione delle specie fungine è documentata e/o documentabile (spesso non è disponibile un micologo per la valutazione dei campioni biologici, dei residui freschi o cotti di funghi).

È stato importantissimo il riconoscimento da parte del Micologo della/e specie fungina responsabile, soprattutto nelle intossicazioni a lunga latenza, che a volte si può avere anche con l'ingestione di funghi non mortali come *Omphalotus olearius* o *Armillaria mellea*.

Ovviamente le lunghe latenze, in assenza di certezze sulla specie fungina ingerita e in assenza di dosaggio amanitina urinaria, sono trattate come se fossero intossicazioni da amatossine fino a circa 48 ore dopo l'ingestione, quando gli indici di necrosi epatica normali ne escludono la presenza (si rammenta che dopo 2 giorni, AST e ALT aumentano in modo esponenziale nelle intossicazioni da amatossine).

Tutti i pazienti con riconoscimento certo delle specie fungine implicate negli episodi d'intossicazione, sono stati dimessi entro le 24 ore dall'ingestione e/o alla cessazione dei disturbi.

Nel 2006, il CAV di Milano ha svolto uno studio con follow-up, su 343 pazienti: seppur un campione molto più contenuto rispetto a quello considerato in questo studio (2.537), è comunque utile per fare delle constatazioni interessanti.

### **Luca**

Analizzando la provenienza delle chiamate per i 3.377 pazienti, abbiamo notato che è cambiato l'approccio del cittadino nei confronti del CAV che è stato consultato nel 33.15% dei casi (rammentiamo che, di questi circa il 64.67% è stato inviato in P.S. per la gravità della sintomatologia), contro il 15.6% del 2006.

È cambiato anche l'approccio medico/micologico: negli ultimi 10 anni, infatti, il dato dei micologici eseguiti nel campione di 1.921 pazienti ospedalizzati con clinica dovuta a funghi non controllati, è stato del 44.22% rispetto a quanto consigliato dal medico CAV mentre, nel 2006 era del 32% ; ovviamente, sarebbe auspicabile una maggior adesione.

Anche i medici, sia del territorio, sia ospedalieri hanno maggior conoscenza del problema fungino e si sono ridotti i casi di pazienti con problemi clinici determinati dall'ingestione di funghi non controllati, trattati come per una sindrome influenzale.

I medici deputati al trattamento delle intossicazioni, nella maggior parte dei casi, hanno seguito il trattamento suggerito dal CAV, ma i richiami non sono stati regolari; per seguire i pazienti gravemente intossicati, è stato fatto regolare follow-up dai medici del CAV.

### **Ombre**

Ci sono ancora alcune sacche di "resistenza" all'utilizzo dell'esame micologico, con classica risposta: «Ma qui il micologo non c'è», per fortuna, la maggior parte degli ospedali invece, conosce questa professionalità e spesso richiede la consulenza al CAV con esame micologico già effettuato (questo non è proprio l'ideale se, per l'esame micologico che ha ovviamente dei tempi minimi di esecuzione, si aspetta a eseguire la decontaminazione).

Di fatto esistono alcune variabili che vanno considerate, per cui si spera che il nostro dato del 44.22%, sia più consistente:

Purtroppo non sempre il risultato dell'analisi micologica è comunicato al CAV dal medico di PS, soprattutto se le specie fungine sono risultate poco pericolose, oppure perché il micologo riferisce quali sintomi possono dare e questo basta a tranquillizzare il curante.

Sarebbe utile che il micologo si accertasse della comunicazione al CAV, cui dovrebbe sempre e comunque rimandare; a mio giudizio si dovrebbe esimere da esprimere giudizi clinici: se non certo dell'esecuzione dell'esame non dovrebbe "consigliare di fare dosaggio amanitina" oppure di "ricoverare il paziente", ma riferire semplicemente l'inadeguatezza del campione e lasciare al tossicologo la responsabilità sul trattamento più idoneo da applicare.

Si ribadisce l'accuratezza dell'esame micologico, non si può fare diagnosi di intossicazione falloidea solo perché nel campo, dove è stata fatta la raccolta, ci sono anche loro. Se un micologo non è in grado di riconoscere le specie fungine velenose, è utile ammetterlo e far intervenire chi ha più esperienza. Inoltre sarebbe utile che si approfondisse, in sede di acquisizione dell'attestato di micologo, maggior dimestichezza con le indagini, anche microscopiche, da eseguire in caso d'intossicazione.

Il dosaggio dell'amanitina urinaria è ancora troppo poco eseguito, bisognerebbe che almeno gli ospedali più importanti di un determinato territorio, si attrezzassero all'esecuzione dell'esame stesso, visto soprattutto la semplicità attuale della sua esecuzione.

Purtroppo la mancanza d'interazione dei vari CAV, non consente spesso una gestione univoca del singolo paziente, perché il medico chiamante fa riferimento o al centro con cui ha più riscontro, oppure, per le attese telefoniche, preferisce rivolgersi al primo disponibile. Milano, di solito rimanda al primo CAV consultato per non interferire sulla terapia impostata, ma se ci fosse uno scambio d'informazioni, si potrebbe evitare il sovrapporsi e l'epidemiologia corrisponderebbe in modo preciso ai reali pazienti, che, in questo modo non sarebbero contattati due volte.

Ovviamente questo sarebbe comunque superato se le Istituzioni (Ministero della Salute, ISS, Regioni, ASL) avessero maggior interesse per l'argomento funghi, con tutte le implicazioni per la prevenzione, indispensabile per non dover ancora sentir parlare d'interesse famiglie decimate da morti e trapianti, solo perché chi dovrebbe fare informazione, non è in grado di raggiungere il cittadino.

## CONCLUSIONI

Nelle intossicazioni da funghi le indagini diagnostiche da eseguire sono numerose e complesse, prevedono la collaborazione di più centri specializzati, la cui attivazione è decisa dal medico del Centro Antiveneni, quando interpellato, secondo uno schema protocollato.

La disponibilità degli strumenti diagnostici, come l'esame micologico, che è stato possibile solo in alcuni casi (44.22%), dovrebbe essere migliorata e soprattutto sarebbe auspicabile una maggior comunicazione tra i vari attori che si occupano dell'intossicazione da funghi.

Il micologo, esaminando i resti del pasto o del vomito, fornisce al medico le informazioni necessarie per impostare una terapia mirata, riducendo i tempi dell'ospedalizzazione.

Il limite del dosaggio dell'amanitina urinaria, è legato all'assenza del servizio durante le notti e i festivi e, soprattutto, al fatto che non tutti gli ospedali sono in grado di garantire l'esecuzione della metodica; in alcuni casi di dosaggio tardivo o con risultato incerto è indispensabile seguire attentamente l'evoluzione del quadro clinico, non tenendo conto del valore numerico dell'indagine.

Dalla statistica del Centro Antiveneni di Milano, s'intuisce quanto importante sia il problema delle intossicazioni fungine che resta ancora un potenziale rischio, soprattutto per le persone anziane e i bambini. Anche se negli ultimi anni la percentuale di decessi è scesa al nostro 3.8% (sarebbe sicuramente più bassa se i pazienti arrivassero alla cura più idonea nel più breve tempo possibile), resta ancora molto da fare per evitare queste evoluzioni infauste.

È di fondamentale importanza che il clinico riconosca con tempestività i diversi quadri sintomatici (ancor prima del riconoscimento micologico e degli esiti degli esami bio-umoral): la tempestività del trattamento è il reale "salvavita" in caso d'intossicazioni da amatossine.

La difficile quantificazione dell'entità del problema, rende ardua ogni statistica epidemiologica, infatti, i casi segnalati al Centro Antiveneni di Milano, sono solo una minima parte dei casi reali, per cui è auspicabile una rilevazione epidemiologica più capillare.

È necessario organizzare una rete informatizzata presso una struttura centrale che consenta la raccolta dati, con possibile identificazione del paziente, magari segnalato da due diversi centri.

È auspicabile un ulteriore miglioramento nei rapporti tra i vari soggetti chiamati a gestire le intossicazioni da funghi, come già detto tutti facciamo parte di un sistema, perché funzioni gli attori devono dialogare e scambiare le informazioni. Solo in questo modo si può chiudere il cerchio e consentire la massima efficacia delle azioni diagnostico/terapeutiche nell'interesse primario della collettività. Si auspica maggior sensibilità da parte delle Istituzioni deputate alla tutela della Salute Pubblica, al fine di rendere meno drammatico il consumo di una prelibatezza così diffusa nella nostra cucina, come i funghi: l'unione fa la forza! Piccoli rivoli sparsi, non sono un fiume, ma se i rivoli confluiscono in un fiume, allora la forza dell'acqua cambia!

## BIBLIOGRAFIA

- Assisi F., T. Della Puppa, F. Davanzo, A. Cernuschi, G. Chiesa, C.M. Morosini, F. Bestetti & P. Moro - 2009: Le intossicazioni da funghi in Italia: problematiche diagnostiche e terapeutiche. Atti del 4° Convegno Internazionale di Micotossicologia- Trento. Pagine di Micologia 32: 9-20.
- Assisi F., L. Settimi, M. Bissoli, R. Borghini, T. Della Puppa, V. Dimasi, M. Ferruzzi, P. A. Moro, J. Georgatos, I. Rebutti, A. Travaglia, P. Severgnini, F. Sesana, G. Milanese & F. Davanzo - 2014: Surveillance of mushroom-related poisonings in Italy. XXXIV International Congress of the EAPCCT, Brussels: 385-386.
- Assisi F., S. Balestreri & R. Galli - 2008: Funghi velenosi. Tossicologia, Speciografia e Prevenzione. Edizioni dalla Natura. Milano.
- Brandenburg W.E. & K.J. Ward - 2018: Mushroom poisoning epidemiology in the United States. Mycologia 31: 1-5 .Diaz J.H. 2018: Amatoxin-Containing Mushroom Poisonings: Species, Toxidromes, Treatments, and Outcomes. Wilderness Environ Med. 29 (1): 111-118. Epub 2018 Jan 8.
- Enjalbert F., S. Rapior, J. Nougulier-Soule, S. Guillon, N. Amoreaux & C. Cabot - 2002: Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. J Toxicol Clin Toxicol 40 (6): 715-757.
- Schenk-Jaeger K.M., C. Rauber-Lüthy, M. Bodmer, H. Kupferschmid, G.A. Kullak-Ublick & A. Cesch - 2012: Mushroom poisoning: a study on circumstances of exposure and patterns of toxicity. Eur J Intern Med. 23 (4): 85-91.
- Tong T.C., M. Hernandez, W.H. Richardson, D.P. Betten, M. Favata, R.H. Riffenburgh, R.F. Clark & D.A. Tanen - 2007: Comparative treatment of alpha-amanitin poisoning with N-acetylcysteine, benzylpenicillin, cimetidine, thioctic acid, and silybin in a murine model. Ann Emerg Med. 50 (3): 282-8.
- Trakulsrichai S., C. Sriapha, A. Tongpoo, U. Udomsubayakul, S. Wongvisavakorn, S. Srisuma & W. Wanankul - 2017: Clinical characteristics and outcome of toxicity from Amanita mushroom poisoning. Int J Gen Med. 10: 395-400.
- Zilker T., M. Ganzert & N. Felgenhauer - 2005: Indication of liver transplantation following amatoxin intoxication. J Hepatol. 42 (2): 202-9.

## Criticità, usanze e ricerca scientifica per il miglioramento della qualità e della gestione delle intossicazioni da funghi nel territorio pugliese

Leonardo Pennisi & Anna Lepore  
Centro Antiveleni di Puglia, Az. osp.-univ. OO.RR. Foggia

### Introduzione

La raccolta e il consumo di funghi eduli è una realtà oramai consolidata sul Gargano, sul Subappennino Dauno e tutto il territorio pugliese, forte della presenza di diverse specie.

L'insediamento antropico negli anni ha lasciato poco spazio a quelle che erano zone di fioritura fungina, fatta eccezione dei polmoni verdi della Puglia come il Parco Nazionale del Gargano ricco di diverse specie alcune delle quali uniche per zona e territorio.

In diverse occasioni i cercatori di funghi occasionali, oltre ai boschi, estendono le loro ricerche in aree che possono essere soggette ad inquinamento ambientale o raccolgono funghi in zone e in situazioni dove la presenza di agenti patogeni può essere alta e varia, a ciò va aggiunta, il più delle volte, la scarsa conoscenza di specie eduli e le usanze popolari che spesso prevedono il consumo di funghi crudi diventando cause di intossicazione.

Sulla base e tipologia delle intossicazioni da funghi registrate annualmente, è stato realizzato un progetto di ricerca del Centro Antiveleni di Puglia in collaborazione con l'Ente Parco Nazionale del Gargano e l'Università di Foggia con lo scopo di evidenziare quale sia la maggior causa di intossicazione da funghi sul territorio regionale pugliese e nel contempo valorizzare e tutelare le specie fungine tipiche della Puglia e lo stesso territorio.

### Obiettivi

Il Centro Antiveleni di Puglia, Azienda osp.-univ. OO.RR. Foggia, nel 2012 in occasione del 5° Convegno Internazionale di Micotossicologia, ha lanciato un'allerta inerente a casi di

esposizione/intossicazione da funghi eduli ricollegando il tutto a usanze popolari, solo per alcune zone garganiche, di consumare funghi eduli crudi.

In questi anni, le attività di sorveglianza in ambito micotossicologico del Centro Antiveleni di Puglia dell’Az. osp.-univ. OO.RR. Foggia si sono concretizzate con la realizzazione di un progetto di ricerca fatto in collaborazione con il Parco Nazionale del Gargano e l’Università degli Studi di Foggia- Facoltà Agraria- e con l’attivazione, presso i laboratori aziendali, del dosaggio delle amanitine urinarie.

Anno 2008	2
Anno 2009	7
Anno 2010	8
Anno 2011	5
Anno 2012	6
Anno 2013	32
Anno 2014	60
Anno 2015	52
Anno 2016	43
Anno 2017	35
Anno 2018 (settembre 2018)	19

Lo scopo del progetto è stato quello di dimostrare che in alcuni contesti i funghi possono presentare cariche batteriche importanti e che il consumo crudo è alla base di un'altissima probabilità di intossicazione. Inoltre la presenza di metalli pesanti nei funghi raccolti a ridosso di grosse arterie stradali e/o in prossimità di centri abitati è indice di scarsa qualità e di possibile esposizione pericolosa / intossicazione.

Tali presupposti hanno permesso, nell'ambito di realizzazione del progetto, di delineare delle zone dove è sconsigliata la raccolta dei funghi e delle zone dove la raccolta è consentita.

Inoltre le azioni di sensibilizzazione, fatte negli anni, hanno permesso di ridurre le intossicazioni da funghi eduli consumati crudi. Ad oggi, però, rimangono alte le esposizioni pericolosi/intossicazioni da funghi tossici/velenosi dovute ad errore umano durante la raccolta.

## BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. - 1989: *Evaluation of certain food additives and contaminants*. Tirthy-Thrd Report of Joint FAO/WHO, Expert Committee on food Additives. WHO Technical Report Series, 776, WHO, Geneve: 28-31.
- AA.VV. - 2018: *Statistiche intossicazioni da funghi*, Centro Antiveneni Foggia anni 2008-2018.
- Bargagli R. - 1986: *Accumulo di mercurio nei funghi eduli ed eventuali implicazioni per i consumatori*. Micol. Ital. 1: 23-29.
- Goyer R.A. - 1985: *Toxic effects of metals*. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poison, 3rd ed., C.D. Klaassen, M.O. Amdur and Doull, Eds, Macmillian Publishing Co. New York: 582-6352.
- Riganti V. & A. Brandone - 1984: *Sulla concentrazione di alcuni metallipesanti in funghi naturali e coltivati del genere Agaricus*. Rass. Chimi. 1: 25-23.
- Settimi L., F. Davanzo, E. Urbani, F. Giordano & L. Coss a - 2012: *Sistema informativo Nazionale per la sorveglianza delle esposizioni pericolose e delle intossicazioni a casi rilevati nel 2012*. Rapporti ISTISAN 16: 22.

## **I test per la ricerca delle amanitine: analisi delle criticità tecnico-diagnostico-cliniche, interpretazione dei risultati e corretta indicazione prescrittiva**

MONICA FONTANARI

Coordinatore Tecnico di Laboratorio Biomedico e Micologo, Laboratorio di Patologia Clinica, Settore di Tossicologia - Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento - Biomedical Laboratory Technician and Mycologist, Clinical Pathology Laboratory, Toxicology Sector HealthCare Service of Trento

### **RIASSUNTO**

La ricerca delle amanitine, tossine esogene potenzialmente mortali per l'uomo e per molte specie animali, ha da sempre rappresentato un interesse primario in ambito micotossicologico. Benché in passato si siano sviluppate varie metodologie di ricerca e pubblicati numerosi articoli scientifici sull'argomento, la progressione bio-tecnologica, in questo ambito, non si è evoluta come lo è stato per altre tossine esogene, non fungine, che vengono determinate in laboratorio in modo rapido e accurato.

Nei casi di micetismo i test più comunemente noti e utilizzati ad oggi per la ricerca delle amanitine, sono essenzialmente due.

Il test qualitativo di Wieland-Meixner, applicabile a residui fungini, ha conosciuto un momento di grande apprezzamento scientifico nella seconda metà del XX secolo per poi essere, di fatto, scarsamente utilizzato dai micologi che lo considerano non affidabile, causa scorretta applicazione metodologica. Questo test, se procedurato in modo corretto e quando se ne conoscano le effettive finalità, scopi, sensibilità e specificità analitica, può essere un valido aiuto per il micologo impegnato a coadiuvare il team sanitario che ha in carico un paziente con presunta intossicazione da funghi.

Il test immunoenzimatico Amanitin-ELISA (Enzime-Linked Immunosorbent Assay) è un test diagnostico in vitro (IVD) eseguito da personale di laboratorio specializzato a cui segue un referto medico. Il test, eseguito su prescrizione medica, su sospetto caso di micetismo, ricerca le alfa e gamma amanitine su urine, siero o plasma umani, in concentrazione espressa in nanogrammi. La corretta appropriatezza prescrittiva, la conoscenza delle criticità metodologiche e diagnostiche nonché la corretta interpretazione dei risultati del test stesso, forniscono al clinico la miglior efficacia diagnostica a supporto di un rapido intervento terapeutico per sindrome falloidea o, se negativo, la possibilità di dimettere il paziente che manifesti sintomatologia lieve o regredita e parametri nella norma.

## **Tests for the research of amanitines: analysis of technical-diagnostic-clinical critical issues, results interpretation and correct prescriptive indication**

### **ABSTRACT**

Tests for the research of amanitines: analysis of technical-diagnostic-clinical critical issues, results interpretation and correct prescriptive indication

Amanitins research - exogenous toxins which are potentially deadly for humans and for many animal species - has always represented a primary interest in the mycotoxicological field.

Although in the past various research methodologies have been developed and numerous scientific articles have been published on the subject, the bio-technological progression in this field has not evolved as it has for other exogenous not-fungal toxins, which can be determined in laboratory quickly and accurately.

In clinical cases of mycetism, the most commonly known and used tests for the research of amanitines are two.

The qualitative test of Wieland-Meixner, relevant to fungal residues, was very popular between scientists during the second half of the twentieth century, but it's been lately scarcely used by Mycologists, who consider it unreliable due to its incorrect methodological application.

This test, if performed correctly and when its aims, sensitivity and analytical specificity are known, can be helpful for the Mycologist when involved in assisting the health team responsible for a patient with presumed fungal intoxication.

The Amanitin-ELISA enzyme immunoassay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) is a diagnostic test in vitro (IVD) performed by specialised laboratory team and must be followed by a medical report. The test, performed by prescription, on a suspected case of mycetism, searches for alpha and gamma amanitines on human urine, serum or plasma, in a concentration expressed in nanograms.

The proper prescription appropriateness, the knowledge of methodological and diagnostic critical issues, as well as the correct interpretation of the tests' results itself, provide the clinician with the best diagnostic efficacy, to support a quick therapeutic intervention on phalloides syndrome poisoning or, if negative, the possibility to discharged the patient who manifests mild or regressed symptoms and normal parameters.

## **Appropriatezza prescrittiva test diagnostico Amanitin-ELISA per la ricerca e il dosaggio delle amanitine su urina, siero e plasma**

### **Definizioni**

**Appropriatezza prescrittiva:** in medicina, con il termine “appropriatezza”, si definisce un intervento sanitario (preventivo, diagnostico, terapeutico, riabilitativo ecc.) correlato al bisogno del paziente, fornito nei modi e nei tempi adeguati, sulla base di standard riconosciuti, con un bilancio positivo tra benefici, rischi e costi (SNN Linee Guida 2000). In diagnostica di laboratorio «appropriato è quel test il cui risultato fornisca una risposta al quesito clinico e metta in grado di prendere una decisione o intraprendere un’azione» (PriCe 2003).

**Plasma:** parte liquida del sangue in cui non è presente la parte corpuscolata (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine). Si può recuperare il plasma, per esempio, da un campione in provetta utilizzato per l’esame emocromocitometrico.

**Siero:** parte liquida del sangue (plasma) priva dei fattori della coagulazione e della parte corpuscolata (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine). Si può recuperare il siero, per esempio, da un campione in provetta utilizzato per gli esami di biochimica clinica.

**Clearance e creatinina.** La clearance esprime la capacità dell’organismo di espellere le sostanze di rifiuto sia endogene che esogene, ovvero, è la quantità di sangue che viene depurata da tale sostanza nell’unità di tempo (1 minuto) dal rene. La creatinina è un prodotto di degradazione della creatina (proteina del tessuto muscolare). Il valore della creatininemia (concentrazione della creatinina nel sangue) viene utilizzato come indice di riferimento della funzionalità renale. Quando una molecola (es. amanitina) ha una clearance misurabile vicina a quella della creatinina significa che viene eliminata dall’organismo in tempi rapidi e riassorbita a livello renale solamente in minime quantità.

**Cut-off:** è quel risultato di un test che ha valore decisionale e discrimina tra un campione positivo e un campione negativo o dubbio. Esso viene solitamente individuato in base allo studio della ROC-Analisi, basato sull’evidenza statistica dei veri/falsi-positivi/negativi, considerando un numero elevato di casi e l’efficacia diagnostica del valore assunto.

### **Premessa**

Il test immunoenzimatico Amanitin-ELISA è un dispositivo medico-diagnostico in vitro (IVD) per la ricerca delle ALFA E GAMMA amanitine su campioni biologici umani: urine, siero o plasma acui segue un referto medico. La prescrizione di questo test compete al medico e la sua esecuzione e validazione a personale sanitario di laboratorio formato e professionalmente competente.

**Metodo di indagine:** il test Amanitin-ELISA (Enzime-Linked Immunosorbent Assay) è un immunodosaggio diretto competitivo in fase eterogenea. Il segnale rilevato è inversamente proporzionale alla concentrazione di amanitina, la quale viene espressa in nanogrammi/ml.

Specifiche di qualità dichiarate dal produttore del test Amanitin-ELISA

**Sensibilità analitica:** 0.22 ng/ml, ovvero la minima concentrazione di alfa e gamma-amanitine che il metodo rileva rispetto all'assenza delle stesse.

**Specificità:** a-amanitina 100.0 %, ovvero è la capacità del metodo di rilevare in modo specifico l'alfa-amanitina. L'anticorpo policlonale di coniglio anti-aamanitina utilizzato, rileva anche la a-amanitina con specificità pari al 90.0 %, mentre, non sono rilevabili la a-amanitina (specificità dello 0.1 %) e le falloidine.

**Limite di quantificazione:** LoQ (Limit of Quantification): 1.5 ng/ml

**Linearità del metodo:** da 1.5 ng/ml a 20.0 ng/ml (Butera 2004).

L'accuratezza delle analisi dipende sia dalla metodica validata dal produttore, secondo specifiche di qualità, sia dalla conoscenza ed esperienza del laboratorista che esegue il test analitico e ne interpreta il risultato tenendo conto delle criticità metodologiche, delle caratteristiche di performance del dosaggio stesso e confrontando il risultato ottenuto con la clinica del paziente.

Al fine di agevolare l'utilizzo pratico delle indicazioni prescrittive relative a questo test, si propone lo schema seguente che è stato elaborato basandosi sugli studi pubblicati in merito all'efficacia diagnostica del test AmanitinELISA stesso (Butera, 2004), le evidenze descritte da numerosi Autori sul decorso della sindrome falloidea nei casi di micetismo e l'esperienza maturata dal Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale Santa Chiara di Trento, nel corso di questi ultimi ventitré anni di attività diagnostica delle amanitine, su campioni biologici prelevati da pazienti intossicati da funghi.

Seguiranno alcune argomentazioni a supporto delle indicazioni riassuntive riportate nel suddetto schema.

**INDICAZIONI APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA, DI CAMPIONAMENTO E  
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST AMANITIN-ELISA  
PER LA RICERCA DELLE AMANITINE SU CAMPIONI BIOLOGICI UMANI**

Per **quali pazienti** intossicati è appropriato richiedere il test amanitine,  
prelevando un campione di **URINE** estemporanee:

- **PAZIENTI CON LATENZA DEI SINTOMI GASTROINTESTINALI MAGGIORE DI (4)-6 ORE.** Un paziente intossicato da amanitine arriva generalmente in Pronto Soccorso tra le 10-24 ore dal pasto di funghi.
- **PAZIENTI ASINTOMATICI** dove il micologo abbia già confermato l'ingestione di specie contenenti amanitine.

Per **quali pazienti** intossicati è appropriato richiedere il test amanitine,  
prelevando un campione di **SIERO**: latenza inferiore alle 6 ore

- **PAZIENTI ASINTOMATICI** dove il micologo abbia già confermato l'ingestione di specie contenenti amanitine e siano trascorse meno di 6 ore dal pasto di funghi.
- **PAZIENTI PEDIATRICI: CON LATENZA DEI SINTOMI GASTROINTESTINALI MINORE DI 6 ORE** (criticità del rapporto DOSE-PESO).

Per **quali pazienti** intossicati **NON è appropriato** richiedere il test amanitine:

- **PAZIENTI CHE NON MANIFESTINO SINTOMI GASTROINTESTINALI MA CHE MANIFESTINO ALTRI SINTOMI o NESSUN SINTOMO** (esclusi casi in cui il micologo abbia già confermato l'ingestione di specie contenenti amanitine)

**CHE TIPO di campione biologico e QUANDO** è appropriato prelevarlo?

- **URINA:** è il campione biologico più idoneo.  
È appropriato prelevare il campione di **URINA DALLE 6 ALLE 36 ORE DAL PASTO DI FUNGHI, PRIMA DELLA REIDRATAZIONE e/o DELLA DIURESI FORZATA.**

Quando un paziente viene reidratato, necessariamente anche la concentrazione delle amanitine nelle urine viene diluita e il test potrebbe non rilevarle o dare un risultato in concentrazione non significativa, tanto da essere sottovalutato e dato per negativo. Ciò tuttavia anche se il paziente fosse già sottoposto a idratazione o a diuresi forzata, inviare comunque il campione in laboratorio, segnalando che il paziente stesso è stato reidratato prima del prelievo del campione.

Inoltre, si deve sempre segnalare al laboratorio quando un campione sia stato prelevato oltre le 36 ore, indicando il tempo trascorso tra il pasto di funghi e il prelievo del campione stesso.

- **SIERO** (oppure PLASMA): **sotto le 6 ore di latenza dei sintomi**

NB: se non fosse possibile prelevare un campione di urina (per es. se paziente non urina), recuperare uno dei campioni (siero oppure plasma, raramente si recuperano urine) già inviati in regime di urgenza al laboratorio dell'ospedale che ha in carico il paziente e inviarli al laboratorio di riferimento che esegue il test per la ricerca delle amanitine.

#### **Quanti campioni inviare al laboratorio analisi**

- Tra le 6 e 36 ore dal pasto è sufficiente **UN UNICO CAMPIONE** di urina, prelevato prima dell'eventuale idratazione e/o diuresi forzata. È sufficiente **1 ml di urina**.

#### **Conservazione del campione e trasporto**

- Il test prescrive che il campione venga refrigerato (2-8 °C) al fine di limitare la crescita batterica nelle urine. Le amanitine sono comunque tossine (proteine) molto stabili, che non si degradano a temperatura ambiente.

#### **Quali amanitine si testano e come si misura la concentrazione nei campioni biologici testati:**

- Si ricercano le **ALFA e GAMMA-AMANITINE**. Il test non rileva le BETA-amanitine e le altre amanitine. La concentrazione delle amanitine è espressa in nanogrammi su 1 ml di urine (**ng/ml**).

#### **Tempo analitico e postanalitico di risposta: TAT (TurnAround Time)**

- 2 ore dall'arrivo del campione in laboratorio alla refertazione del risultato. I tempi preanalitici (prelievo e trasporto) vanno aggiunti al TAT. Al fine di ridurre i tempi di trasporto, non sempre immediatamente disponibile, si può valutare di far pervenire il campione in laboratorio da parte di parenti o conoscenti dell'intossicato.

#### **Quante volte ripetere il test amanitine**

- Se il campione viene prelevato tra la sesta e la trentaseiesima ora e risulta negativo, di norma non occorre ripeterlo.  
Si ripete in seconda giornata per pazienti già positivi, su indicazione del protocollo terapeutico del C.A.V., al fine di sospendere la diuresi forzata quando la concentrazione nelle urine risulti molto bassa o assente.

**Refertazione e interpretazione dei risultati del test Amanitin-ELISA:**

Inferiore a 1.5 ng/ml: **NEGATIVO**

Tra 1.5 ng/ml e 5 ng/ml: **DUBBIO**

Maggiore di 5 ng/ml: **POSITIVO**

**NB:** CONFRONTARE SEMPRE I RISULTATI DEL TEST CON LA CLINICA/DIAGNOSTICA DEL PAZIENTE e, ove possibile, con LA PERIZIA MICOTOSSICOLOGICA

**Che Cosa va comunicato al laboratorio di tossicologia che esegue il test amanitine:**

**Esempio di “SCHEDA NOTIZIE AMANITINA URINARIA” che accompagna il campione**

Il campione di urine (e così anche per siero o plasma) inviato per eseguire il test delle amanitine deve necessariamente essere accompagnato dalle seguenti informazioni che sono riportate sul modulo adottato dal Laboratorio di Patologia Clinica dell’Ospedale Santa Chiara di Trento, qui riportato come esempio.

Queste INFO permettono al laboratorista di interpretare il risultato del test amanitine, in base alle sue conoscenze specifiche metodologiche e criticità intrinseche nel test stesso, al fine di fornire al clinico un risultato attendibile e clinicamente utile, segnalando eventuali osservazioni integrative e cautelative.

Per completezza, sul modulo (v. pagina accanto) sono riportate anche le informazioni sull’orario di esecuzione del test e i numeri di telefono del Laboratorio Urgenze e Tossicologia dell’ospedale Santa Chiara di Trento.

**Argomentazioni a supporto dello schema proposto**

Le amanitine sono un gruppo di nove piccole proteine con nucleo indolico di cui le alfa, beta e gammaamanitine sono quelle maggiormente tossiche per molte specie animali, compreso l’uomo. La dose letale per l’uomo è stata stimata attorno ai 0.1 mg/kg, ovvero 5-7 mg di amanitine per un uomo adulto di circa 70 kg, contenute generalmente in 50 g di fungo fresco. Per un bambino, in rapporto al peso corporeo, la dose letale è contenuta in circa 20 g di fungo fresco.

Le amanitine sono resistenti all’acidità dei succhi gastrici, all’ebollizione e all’essiccamento e sono molto stabili nel tempo (traverSo, 1998; hallen, 2002).

L’organo bersaglio primario di queste tossine è il fegato, interferendo con il metabolismo stesso degli epatociti. Le amanitine penetrano nella cellula epatica (faulStiCh, 1985) legandosi ad una proteina di trasporto (carrier) presente sulla membrana dei sinusoidi epatici - la OATP1B3 (organic anion-transporting polipeptide) - e vengono trasportate all’interno della cellula stessa e precisamente nel nucleo cellulare (letSChert, 2006). La loro azione tossica si esplica nel nucleoplasma legandosi alla RNA polimerasi 2 e, a concentrazioni più alte, anche alla RNA polimerasi 3, inibendo gli enzimi stessi e la conseguente produzione/allungamento dell’RNA messaggero primario (hn-RNA, detto RNA eterogeneo) (Stryer, 1989), necessario “stampo” per la sintesi delle proteine che avviene nel citoplasma cellulare. Il blocco della sintesi proteica nel citoplasma degli epatociti arreca grave squilibrio metabolico ed omeostatico all’organismo, come, per esempio, la mancata sintesi dei fattori della coagulazione, portando a necrosi (morte) la cellula epatica stessa.

La presenza delle RNA polimerasi nelle cellule degli organismi viventi ipotizza la potenziale tossicità delle amanitine in tutti i tessuti organici di varie specie animali. E’ però documentato che

alcune specie possiedono cellule insensibili all'azione delle amanitine come per esempio i sinusoidi epatici di alcune specie di topi. Attraverso altre sperimentazioni si è potuto appurare che in natura esistono alleli mutanti (es: linee cellulari selezionate da topi da esperimento) e varianti della subunità maggiore della RNA polimerasi 2, tali da rendere questo enzima resistente all'azione delle amanitine, anche per mutazione di un solo aminoacido (Bartolomei, 1987). Le lumache possono sopportare addirittura una dose di amanitina pari a 100 mg/Kg: 1000 volte più dell'uomo; il coniglio e la lepre invece non sono affatto sensibili all'azione delle amanitine e questo ha permesso di ottenere dal siero di coniglio l'anticorpo policlonale impiegato nel test immunoenzimatico Amanitin-ELISA.

Il volume di distribuzione delle amanitine è il compartimento dei liquidi extracellulari, essendo molecole molto solubili in acqua. La clearance totale di queste tossine è vicina a quella della creatinina e l'emivita di eliminazione dal plasma è tra i 25 e i 50 minuti. Esse, infatti, scompaiono precocemente dal plasma e, oltre le 36 ore, sono ivi presenti in bassissime concentrazioni. In pazienti in cui sono state dosate le amanitine simultaneamente sia su plasma che su urina, si è potuto constatare che nelle urine vi era una concentrazione di amanitine da 10 a 100 volte maggiore rispetto a quella presente nel plasma (JAGER, 1993).

Le amanitine, nel fegato, vengono coniugate al glutatione, molecola antiossidante e detossificante, il cui precursore è l'N-Acetil-Cisteina (NAC), al fine di essere espulse dall'organismo per via renale.

Più dell'80% delle amanitine è eliminato dal rene in forma inalterata e in quantità elevate fino a 72 ore dopo il pasto. La filtrazione glomerulare è limitata da una piccola quota riassorbita a livello tubulare. Un 10% delle amanitine viene eliminato con la bile attraverso il circolo enteroepatico e si possono ritrovare nel tratto gastroduodenale fino a cinque giorni dopo l'ingestione (JAGER, 1993).

L'amanituria avviene non prima delle 4-6 ore dall'assunzione della tossina anche se la concentrazione massima nelle urine si ha tra le 24 e 48 ore (in assenza di trattamento). L'urina estemporanea, prelevata possibilmente prima della diuresi forzata, dalle sei alle trentasei ore dall'ingestione dei funghi (BUTERA, 2004), è il campione biologico più idoneo per la determinazione delle amanitine nella diagnostica di sindrome falloidea, in quanto solitamente l'intossicato sintomatico giunge in ospedale, in media, circa 10-12 ore dopo il pasto (tra le 6 e 24 ore dal pasto): periodo di latenza in cui le amanitine sono presenti in concentrazione maggiore nelle urine rispetto al plasma o al siero.

Tuttavia, in alcuni casi, può essere necessario testare un campione di siero, ad esempio:

- quando il micologo abbia già reperito specie contenenti amanitine o su fondato sospetto di ingestione di amanitine, prima delle sei ore di latenza dal pasto di funghi;
- quando siano coinvolti pazienti pediatrici con precoci e importanti sintomi gastrointestinali;
- quando il paziente non urina.

Spesso, quando sia più indicato prelevare siero, al laboratorio viene comunque inviato anche un campione di urine. I due campioni così inviati (siero e urine) vengono testati nella stessa seduta analitica previa consulenza con il laboratorista, il quale ritenga appropriato dosare entrambi.

 Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari Provincia Autonoma di Trento Dipartimento Laboratorio e Servizi	Modulo Scheda notizie AMANITINA URINARIA
---	--

**APSS**  
**Ospedale di Trento**  
**U.O. Patologia Clinica**  
 Largo Medaglie d'Oro, 9 38122 Trento

**SCHEDA NOTIZIE AMANITINA URINARIA**

ETICHETTA  
 PAZIENTE

DATA E ORA ASSUNZIONE PASTO: \_\_\_\_\_

DATA E ORA COMPARSA SINTOMI: \_\_\_\_\_ o ASSENZA SINTOMI

DATA E ORA RACCOLTA URINE: \_\_\_\_\_

CONSULTATO MICOLOGO:  SI  NO

SINTOMI GASTROINTESTINALI PRESENTI:  SI  NO

IDRATAZIONE PRIMA DI RACCOLTA URINA:  SI  NO

Timbro e firma leggibile medico richiedente \_\_\_\_\_ TEL \_\_\_\_\_

FAX \_\_\_\_\_

DATA \_\_\_\_\_

Le urine vanno raccolte **PRIMA della reidratazione** e, per un'attendibilità del test,  
**dalle 4 alle 36 ore dal pasto.**  
 I campioni vanno inviati al **LAB. URGENZE di Patologia Clinica**, Osp. S. Chiara Trento,  
**PREVIO AVVISO (Tel. 0461 903157, Fax 0461 903165).**  
 L'esame viene **eseguito tutti i giorni dalle 8:00 alle 17:00**. Al di fuori di questo orario il campione  
 sarà conservato in frigorifero.  
**PER LE RICHIESTE FUORI PROVINCIA E' NECESSARIO ALLEGARE L'IMPEGNATIVA  
 DEL MEDICO RICHIEDENTE IL TEST (per la fatturazione).**  
**Per info: TOSSICOLOGIA CLINICA, Tel. 0461 903874 / 903833**

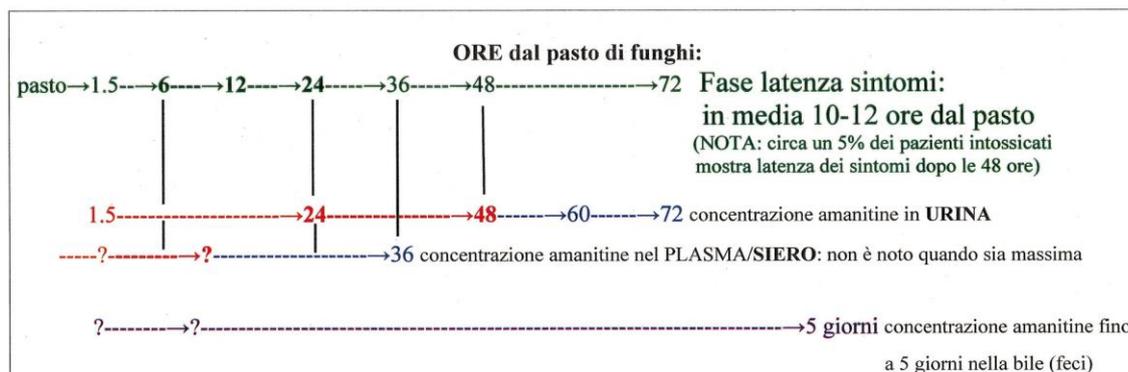
MD95 Rev. N° 01 del 03/10/2017	Redatto dal Responsabile ufficio qualità dipartimentale	Approvato dal Direttore di Dipartimento
--------------------------------	--	---

In alternativa, il laboratorista darà altre indicazioni di appropriatezza diagnostica in base al caso clinico individuale.

Le evidenze di alcuni casi clinici mostrano che quando la dose assunta è molto alta rispetto al peso dell'intossicato e/o quando un organismo sia particolarmente debilitato, il tempo di insorgenza dei sintomi dal pasto di funghi può anche essere inferiore alle 6 ore. A titolo preventivo e previa valutazione clinica, si consiglia di prescrivere il test amanitine per pazienti pediatrici anche sotto le sei ore di latenza e di ripeterlo eventualmente, dopo le sei ore, se il risultato del primo test fosse negativo o dubbio e se l'esordio fosse incerto e/o inaggravante nel tempo.

Di seguito, uno schema in cui si evidenziano, in parallelo, le fasi di latenza dei sintomi e i dati attualmente disponibili riguardanti la concentrazione delle amanitine nei fluidi biologici, nel tempo.

CONCENTRAZIONE/ESCREZIONE delle amanitine nell' **urina** e nel sangue (**siero o plasma**) dal pasto di funghi



LEGENDA:

- fase latenza sintomi: **ESPRESSA IN ORE DAL PASTO**
- **AMANITINE** concentrazione aumenta: **ESPRESSA IN ORE DAL PASTO**
- **AMANITINE** concentrazione massima: **ESPRESSA IN ORE DAL PASTO**
- **AMANITINE** concentrazione diminuisce: **ESPRESSA IN ORE DAL PASTO**
- **AMANITINE** concentrazione nella bile (feci)

L'urina, come già ribadito, è il campione più idoneo. Il produttore del test, prima di poterlo validare come test diagnostico in vitro, è tenuto a espletare varie prove, tra cui le così dette "prove di recupero", dove, a campioni di urine, siero e plasma, sono aggiunte concentrazioni note di alfa-amanitine e poi testate secondo il metodo Amanitin-ELISA (Amanitin-ELISA rev.2013).

Se vi fosse la necessità di prelevare un campione di siero o di plasma, per ragioni metodologiche, ovvero le prove di recupero dell'alfa-amanitina in urina, siero e plasma, è preferibile utilizzare un campione di **SIERO** rispetto al **PLASMA**.

Infatti, le prove di recupero hanno evidenziato che sull'urina si ha un recupero medio dell'alfaamanitina pari al 99.9% mentre:

- su siero: sovrastima media del risultato del 4.6% rispetto all'urina.
- su plasma: sovrastima media del risultato dell'11.2% rispetto all'urina.

### Campioni diversi da urine, siero e plasma

Il test Amanitin-ELISA non è validato su altri campioni biologici come, per esempio, vomito, aspirato gastrico, feci, bile, saliva né su campioni fungini come residui di funghi, liquidi di risulta, ecc. L'interpretazione dei risultati su questi campioni, eventualmente comunque testati, è possibile solo da parte di personale altamente specializzato e potranno essere espressi in modo qualitativo, difficilmente quantitativo. Non essendo matrici sottoposte a validazione preventiva da parte del produttore per le specifiche di qualità del dato richieste, al suddetto test, **NON** può conseguire comunque un referto medico.

### Interpretazione dei risultati del test Amanitin-ELISA su URINE o SIERO (o plasma):

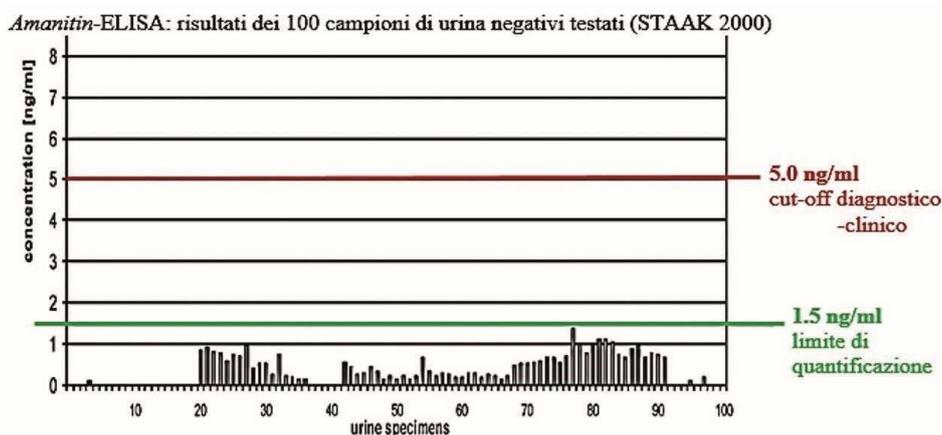
Risultato **NEGATIVO**: inferiore a 1.5 ng/ml

Il produttore ha dosato, secondo procedura di dosaggio, 75 urine e 100 sieri da donatori sani. I risultati sono riportati nella tabella seguente che mostra quali siano i limiti di quantificazione nei campioni negativi che è stato così calcolato in 1.5 ng/ml, sia per urine che per siero.

	Urine ng/ml	Serum ng/ml
<b>Total (n)</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
<b>Median</b>	<b>0.4</b>	<b>0.8</b>
<b>95<sup>th</sup> Quantile</b>	<b>0.8</b>	<b>1.3</b>
<b>99<sup>th</sup> Quantile</b>	<b>1.1</b>	<b>1.8</b>
<b>Min./Max</b>	<b>0/1.3</b>	<b>0.2/2.3</b>
<b>Mean</b>	<b>0.4</b>	<b>0.9</b>
<b>SD</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>
<b>Mean+3SD</b>	<b>1.1</b>	<b>1.8</b>

Inoltre, in uno studio indipendente di STAACK et al. (2000), 100 campioni di urine di donatori, sottoposti ad esame per abuso di farmaci, ma non intossicati da amanitine, furono testati con il kit Amanitin-ELISA. Tutti i campioni diedero risultati inferiori a 1.5 ng/ml (Amanitin-ELISA rev2013), dimostrando che la matrice urinaria e/o farmaci non producevano interferenze al di sopra del limite di quantificazione stabilito dal produttore. L'immagine seguente, relativa allo studio di STAACK et al. è stata corretta dalla scrivente, alla luce del cut-off diagnostico-clinico oggi adottato.

L'esperienza maturata dal Laboratorio di Patologia Clinica di Trento testando urine negative che oggi, secondo istruzione operativa del laboratorio stesso, sono inserite in seduta analitica come ulteriore controllo negativo, dimostra che sono molteplici i fattori che producono risultati negativi diversi ma sempre compresi in un intervallo tra 0.1 ng/ml e 1.5 ng/ml. Anche testando la stessa urina negativa aliquotata e congelata nel corso delle sedute analitiche stagionali, i risultati mostrano una certa variabilità, se pur sempre negativi. La matrice urinaria e le variabili intrinseche del test stesso, non controllabili, come per esempio la difforme distribuzione dell'anticorpo sul fondo del pozzetto di reazione e la temperatura ambiente, presentano una effettiva criticità che produce imprecisione di misura (Arrigo, 1983).



Altresì va ribadito che un risultato **NEGATIVO** refertato **INFERIORE A 0.1 ng/ml** dà al clinico un'informazione importante, ovvero assenza di alfa e/ o gamma-amanitine nel campione testato, il cui risultato è inferiore al limite di sensibilità del metodo stesso di 0.22 ng/ml e che non si rilevano interferenza da parte della matrice urinaria, né criticità intrinseche all'immunodosaggio.

### **Risultato POSITIVO: maggiore di 5 ng/ml**

L'efficacia di un test diagnostico (DE) è «la capacità di un test diagnostico di supportare una decisione clinica nel suo contesto operativo» (Drain, 2014).

Nella scelta di un cut-off diagnostico-clinico, non bastano le implicazioni tecniche in termini di limite di quantificazione del metodo ma entrano in gioco altri fattori, fra cui la stabilità della reazione a quella concentrazione e l'Efficacia Diagnostica (DE) che a quel valore si possa attribuire.

Butera et al. (2004) hanno studiato e definito l'accuratezza diagnostica di questo test.

Nella tabella seguente si riportano i risultati dello studio sull'accuratezza diagnostica del test Amanitin-ELISA, intesa come l'insieme di Sensibilità, Specificità, Efficacia Diagnostica, Valore Predittivo Positivo e Negativo, comparata con i contributi diagnostici alternativi utilizzati nella diagnosi di intossicazione da amanitine come: la lunga latenza dei sintomi gastrointestinali e l'iniziale valutazione di un medico tossicologo.

Come mostrato in tabella, i campioni urinari raccolti dalle 6 alle 36 ore dall'ingestione dei funghi, mostrano una sensibilità, specificità ed efficacia diagnostica del 100% considerando un cut-off di 5 ng/ml che è stato adottato come cut-off diagnostico-clinico.

Dopo le 36 ore, nel 40% dei campioni testati la concentrazione dell'amanitina urinaria scendeva sotto i 5 ng/ml.

BUTERA R., C. LOCATELLI, T. COCCINI & L. MANZO - 2004: Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study. Journal of Toxicology 42: 901-912.

Accuratezza diagnostica in percentuale IC 95% (Intervallo di Confidenza)	<b>SENS</b> sensibilità	<b>SPEC</b> specificità	<b>PPV</b> Valore Predittivo Positivo	<b>NPV</b> Valore Predittivo Negativo	<b>DE</b> Efficacia Diagnostica
<b>Pazienti n=61: urine raccolte dalle 5.5 alle 92 ore dal pasto di funghi</b>					
Sintomi gastrointestinali a lunga latenza	90.0	66.7	34.6	97.1	70.5
<u>Valutazione clinica iniziale positiva</u>	100.0	60.8	33.3	100.0	67.2
Cut-off $\geq$ 1.5 ng/ml	70.0	82.4	43.8	93.3	80.3
<b>Cut-off <math>\geq</math> 5.0 ng/ml</b>	<b>60.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>92.7</b>	<b>93.4</b>
<b>Pazienti n=51: urine raccolte dalle 6 alle 36 ore dal pasto di funghi</b>					
Sintomi gastrointestinali a lunga latenza	83.3	72.3	27.8	97.1	73.6
<u>Valutazione clinica iniziale positiva</u>	100.0	66.0	27.3	100.0	69.8
Cut-off $\geq$ 1.5 ng/ml	100.0	87.2	<b>50.0</b>	100.0	88.7
<b>Cut-off <math>\geq</math> 5.0 ng/ml</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

NOTA: Il Valore Predittivo è la probabilità di un test di esprimere, attraverso il risultato positivo o negativo, la diagnostica corretta di malattia o di escluderla, in base ai pazienti effettivamente ammalati o effettivamente sani.

Il Valore Predittivo Positivo, nello studio in esame, esprime la percentuale di test Amanitin-ELISA positivi a cui corrispondono effettivamente pazienti intossicati da alfa-gamma-amanitine. Il Valore Predittivo negativo, nello studio in esame, esprime la percentuale di test Amanitin-ELISA negativi a cui corrispondono effettivamente pazienti non intossicati da alfa-gamma-amanitine.

**Risultato DUBBIO: tra 1.5 ng/ml e 5 ng/ml: (PPV 50%; NPV 100%)**

Dal punto di vista metodologico il test Amanitin-ELISA indica una possibile intossicazione da amanitine quando un campione di urine risulti al di sopra del limite di quantificazione di 1.5 ng/ml (Amanitin-ELISA rev2013).

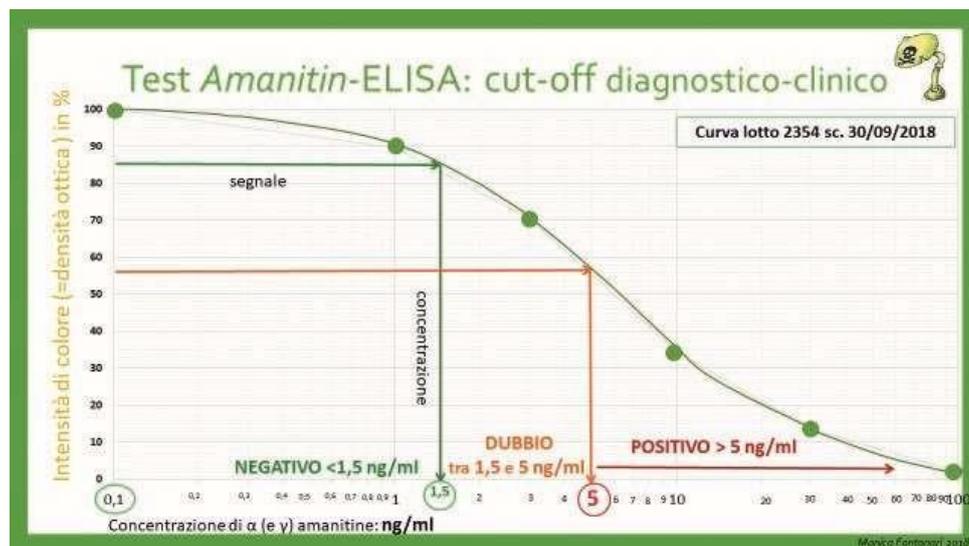
Considerando un prelievo di urine dalle 6 alle 36 ore, lo studio di Butera mostra un cut-off diagnostico-clinico a 5 ng/ml come miglior efficacia diagnostica oltre il quale valore, un test positivo

sia certo. Lo studio in esame dimostra anche che effettivamente da 1.5 ng/ml a 5 ng/ml un risultato debba considerarsi dubbio. Infatti il valore predittivo positivo (PPV) stimato in questo studio, considerando un cut-off di 1.5 ng/ml è del 50%, mentre per un cut-off di 5 ng/ml è appunto del 100%. Quindi, se consideriamo l'intervallo di concentrazione di alfa-gamma-amanitine da 1.5 ng/ml a 5 ng/ml, il 50% dei test positivi ha confermato pazienti affetti da intossicazione faloidea.

Questa asserzione non contrasta con l'indicazione del produttore secondo cui un risultato maggiore di 1.5 ng/ml possa essere indice di intossicazione da amanitine.

Il valore predittivo negativo (NPV) del 100%, evidenzia che ad un paziente non intossicato da amanitine corrisponde test negativo.

Si riporta un esempio di Curva di Calibrazione del test Amanitin-ELISA, evidenziando gli intervalli decisionali della concentrazione di alfa e gamma-amanitine.



### Criticità del test Amanitin-ELISA

Il test presenta non poche criticità metodologiche di natura tecnica di cui brevemente se ne citerà solo alcune che interessano maggiormente lo scopo di questo lavoro: diluizione dei campioni, contaminazione e dosaggio qualitativo e quantitativo delle amanitine.

#### Risultati falsi positivi

- La procedura metodologica prevede la diluizione dei campioni, prima di essere testati. La mancata o scorretta diluizione dei campioni in seduta analitica, porta a risultati falsamente positivi. Solitamente, su campioni di urina negativi, i risultati ottenuti per mancata diluizione del campione stesso, risultano essere dubbi o debolmente positivi. Su campioni positivi invece, il risultato per mancata diluizione può essere così alto da non potersi interpolare sulla retta di calibrazione, ovvero maggiore di 100 ng/ml. Probabilmente, la mancata diluizione porta ad una variazione del PH nel pozzetto di reazione che modifica sensibilmente la reazione antigene-anticorpo stessa, producendo risultati non attendibili.

- La contaminazione dei campioni con reagenti contenenti alte concentrazioni di alfa-amanitina presenti nel KIT stesso, può essere un'altra causa di risultato falso positivo.

- La presenza, sullo stesso tavolo di lavoro della seduta analitica del test Amanitin-ELISA, di reperti fungini contenenti amanitine, può comportare un'elevata probabilità di contaminazione dei dispositivi per dispensare e dei supporti utilizzati durante la procedura operativa del test stesso. Si

tenga presente che nelle urine la concentrazione di amanitine è dell'ordine dei nanogrammi, mentre nei funghi è dell'ordine dei milligrammi: un milione di volte maggiore nei tessuti fungini rispetto alle urine dei pazienti intossicati.

#### **Risultati falsi negativi**

- Ad oggi, nessuna seduta analitica, utilizzando il kit Amanitin-ELISA, eseguita nel settore di Tossicologia del Laboratorio di Patologia Clinica, ha prodotto risultati falsi negativi sui campioni dei pazienti testati.

#### **Criticità dosaggio qualitativo e quantitativo**

- Un altro punto critico è il “valore vero” del dosaggio qualitativo e quantitativo delle amanitine. Questo test infatti, per le caratteristiche metodologiche e tecniche su cui basa il principio di misura, è paragonabile ad un test di screening a cui dovrebbe necessariamente seguire un test di conferma, da eseguirsi utilizzando un altro metodo. E' altresì evidente, dopo tanti anni di utilizzo, che comunque l'informazione data dal risultato, pur se affetto da molteplici fattori che ne influenzano l'accuratezza diagnostica, è sufficiente a contribuire nella diagnosi clinica di intossicazione falloidea, dove i segni e i sintomi rimangono gli elementi obiettivi decisionali più significativi.

Le specie dei funghi che contengono amanitine esprimono queste tossine in modo differente sia in qualità (fenotipo: alfa, beta, gamma-amanitine ecc. e falloidine), sia in quantità (concentrazione dei diversi fenotipi di tossine). Inoltre l'espressione e la concentrazione di amanitine, relativa ai diversi fenotipi, varia, non solo da specie a specie, ma anche all'interno della stessa specie raccolta in luoghi e/o paesi diversi.

Un esempio di quanto asserito è riportato da uno studio di R.M. Sgambelluri et al. (2014) dove in *Amanita virosa*, raccolta in Italia, sono state dosate (metodo HPLC-UV e spettrometria di massa) solo alfaamanitine e falloidine, mentre in raccolte giapponesi della stessa specie si sono dosate sia alfa che betaamanitine. La *Lepiota brunneoincarnata* (raccolta italiana) esprime alfa e beta-amanitine, mentre la *Lepiota subincarnata* (= *L. josserandii*, raccolta italiana) alfa e gamma-amanitine e la *Amanita phalloides*, sia italiana che californiana, esprime sia alfa che beta-amanitine ma non le gammaamanitine. Infine sono state descritte raccolte di *Amanita verna* e *A. phalloides* californiane prive di amanitine (Benjamin, 1995), pubblicazione che lascia non poche perplessità e che sicuramente necessita di altre conferme attraverso strumentazioni e metodi analitici più accurati, oggi disponibili.

- In uno studio prospettico condotto da Butera e Lonati (Butera & Lonati, 2004) sulla valutazione della specificità dell'Amanitin-ELISA, si evidenziò che l'alfa-amanitina rilevata in campioni di urina in cui erano stati aggiunti alfa-amanitina, beta-amanitina e falloidina, si riduceva dal 50% al 65% rispetto alle stesse urine contenenti solo alfa-amanitina. Venne dedotto che la beta-amanitina e la falloidina avevano un effetto mascherante sterico sui siti di legame dell'anticorpo. Infatti, nel momento in cui la beta-amanitina o la falloidina venivano saggiate separatamente, esse non erano rilevate dall'anticorpo. La presenza di beta-amanitina nel campione può dunque portare ad una sottostima dei risultati delle alfa e gamma-amanitine stesse e, un ragionevole sospetto, è che a causa di questo effetto mascherante, il test rilevi percentuali di amanitine nel campione di molto inferiori alla quantità effettivamente presente, quando nel campione stesso siano presenti beta-amanitine e falloidine.

Infine, è bene ricordare che in letteratura sono documentati una raccolta di *Amanita verna* americana in cui era presente solo beta-amanitina e il caso di un paziente europeo, in cui fu trovata solo la beta-amanitina nei suoi fluidi biologici (Butera, 2004). In questi casi il test Amanitin-ELISA darebbe probabilmente un risultato negativo, ma non sarebbe comunque da considerarsi metodologicamente “un falso negativo” poiché, è dichiarato dal produttore, che la beta-amanitina non è rilevabile dal test.

- A tutte queste criticità si aggiungono quelle relative alla fase preanalitica di campionamento, spesso non eseguita secondo i criteri indicati e, se pur nella maggior parte dei casi, le urine vengono prelevate tra le 6 e 36 ore per il naturale decorso di latenza dei sintomi di questa sindrome, circa un paziente su due viene reidratato prima del prelievo delle urine. A tal proposito sarebbe forse opportuno inserire nelle procedure di triage del Pronto Soccorso un prelievo preventivo di un campione di urine (campione di facile prelievo e non invasivo), quando il paziente dichiara di aver consumato funghi. Ovviamente poi la decisione prescrittiva del test spetta al medico che ha in carico e valuta il paziente.

- È importante inoltre, che tutte e le informazioni arrivino anche al laboratorista in modo da poter fornire un risultato del test Amanitin-ELISA che tenga anche conto anche delle variabili del caso specifico al fine di coadiuvare, nel miglior modo possibile, il clinico nella diagnosi di intossicazione falloidea o di escluderla.

In definitiva, il risultato del dosaggio delle amanitine urinarie utilizzando il test AmanitinELISA, è affetto da inaccuratezza dovuta alla non conoscenza del fenotipo di amanitine presenti nel campione, alle problematiche intrinseche nel dosaggio stesso e alla fase preanalitica di campionamento.

Tutto questo non sembra comunque concorrere a inficiare una corretta diagnosi e immediata terapia. I risultati francamente positivi riflettono di norma la sintomatologia e il possibile danno epatico e/o organico descritti nella sindrome falloidea, in accordo con quanto asserito da A. Giampreti che «la determinazione dell'amanitina urinaria è un utile strumento per la diagnosi di questo grave avvelenamento ...e che questa indagine tossicologica non è una mera analisi di conferma del sospetto diagnostico e apporta informazioni rilevanti per la corretta gestione del paziente» (Giampreti).

Si riporta brevemente la casistica dei risultati dei test Amanitin-ELISA ottenuti dal Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale Santa Chiara di Trento, dal 2009 all'ottobre 2018.

Il 92,3% (300) dei campioni testati sono risultati negativi poiché inferiori a 1.5 ng/ml. Di questi un 63% circa (206 campioni) sono risultati inferiori a 0.1 ng/ml, ovvero inferiori al limite di sensibilità del metodo di 0.22 ng/ml. In una organizzazione sanitaria complessa dove il bilancio tra salute umana e spesa sanitaria sembrano essere in continua contrapposizione, la diagnostica dei negativi è elemento rilevante e importante che concorre al miglioramento nella gestione e cura del paziente e al contenimento della spesa sanitaria globale.

Un 3.1% (10 campioni) dei campioni sono risultati dubbi, nessuno di questi nostri pazienti era effettivamente intossicato da amanitine, a parte i campioni ritestati in seconda giornata, già precedentemente positivi.

Infine i campioni positivi sono stati un 4.6% (15 campioni) del totale dei campioni testati. La percentuale di positivi del nostro campionamento dovrebbe essere circa in linea con la percentuale di intossicazioni falloidee oggi verificatesi nel nostro paese, sul totale dei micetismi.

La mortalità in Trentino da sindrome falloidea di questi ultimi dieci anni è pari a zero.

### **Conclusioni**

Molteplici sono le problematiche attinenti al saggio Amanitin-ELISA che possono incidere sui risultati finali e che lo rendono un test di difficile interpretazione.

Il clinico basa la sua richiesta di dosaggio urinario delle amanitine sull'evidenza sintomatologica, sui fatti preclinici come l'ingestione di funghi e, quando ciò sia possibile, anche sul parere del micologo competente.

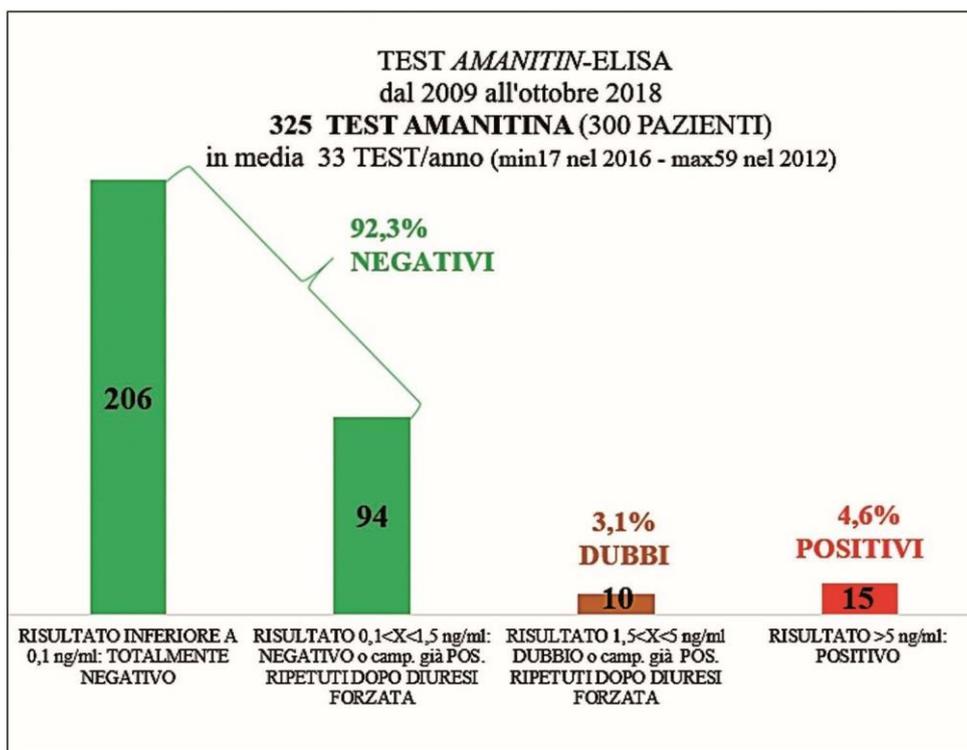
La diagnostica di laboratorio dovrebbe fornire al clinico il miglior dato, ovvero il più indicativo al fine di formulare una diagnosi appropriata e una prognosi predittiva sulla salute del paziente. Le conseguenze delle problematiche insite nel saggio Amanitin-ELISA, sia metodologiche che proprie della reazione immunometrica, aumentano la variabilità del risultato rilevato.

In primis, le difficoltà metodologiche incontrate impongono al tecnico di laboratorio una particolare attenzione verso alcuni punti critici della metodica e una sapiente critica sui risultati ottenuti al fine di validarli tecnicamente in dati utili da sottoporre alla validazione clinica di competenza.

Il peso maggiore di questi fattori si manifesta nel momento in cui i risultati siano compresi tra il limite di quantificazione del test (1.5 ng/ml) e il cut-off diagnostico-clinico (5 ng/ml), oltre il quale si definisce una positività del campione, che prevede, per l'intossicato, l'applicazione di un protocollo diagnostico-terapeutico, di notevole entità.

### Test Amanitin-ELISA: percentuali test negativi, dubbi, positivi

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Santa Chiara di Trento. Direttore dott. P. Caciagli



La scelta del cut-off diagnostico-clinico viene fatta sia considerando la reazione immunologica in termini di qualità analitica dei risultati, sia dalla sua comprovata Efficacia Diagnostica, valutata nei lavori scientifici pubblicati. La positività viene refertata in modo quantitativo, anche se non ha alcun valore probante la refertazione quantitativa di un positivo oltre il limite stabilito di linearità del metodo stesso (1.5-20.0 ng/ml) (Butera & CoCChi 2004). Qualitativamente mantiene il suo significato clinico.

La relazione dose-effetto tra i livelli di amanitina urinaria e la severità dell'avvelenamento non è avvalorata da studi pubblicati, né è correlata alla prognosi. Non si può affermare che un alto valore di amanitina nelle urine sia predittivo di danno epatico. Infatti, molte sono le variabili che intervengono nel determinare tipologia e concentrazione finale di amanitine nelle urine, diversa da caso a caso per dose e specie fungina ingerita, per volume di distribuzione della tossina in base al peso del paziente, per la latenza dei sintomi, per lo stato di salute individuale.

Un campione negativo al test Amanitin-ELISA, in cui si determini la totale assenza di amanitina, è l'evento più frequente e che, allo stesso tempo, evidenzia la miglior qualità analitica, fornendo al clinico un dato accurato, in cui l'Efficacia Diagnostica è con certezza una valida conseguenza.

Va però ribadito che la possibilità di misurare dosi di amanitina rilevabili nelle urine decresce nel tempo, perciò l'assenza di amanitina nel campione in esame (soprattutto dopo le 36 ore dal pasto), non esclude l'avvelenamento da amanitine né tanto meno esclude micetismi dovuti alla presenza di tossine diverse dalle alfa e gamma-amanitine, compresa la beta-amanitina per cui l'Amanitin-ELISA NON è specifico.

La prescrizione del test è di competenza medica e solitamente evento non frequente a carico di ogni medico di Pronto Soccorso presente sul nostro territorio che debba gestire un caso di micetismo. Per questo motivo la non conoscenza delle corrette indicazioni prescrittive e le modalità di campionamento diventano esse stesse una criticità quando si debba agire nella tempistica dell'urgenza. Da questa riflessione, lo schema iniziale qui proposto sulle indicazioni prescrittive e di campionamento.

Fondamentale nella sindrome falloidea sono la diagnosi di sospetto ed il rapido approccio terapeutico: una diagnosi tardiva è, ad oggi, la causa principale di mortalità da sindrome falloidea.

Favorire e coadiuvare l'impostazione di un protocollo terapeutico per il paziente, nel più breve tempo possibile, è obiettivo comune al clinico, al laboratorista, al micologo.

Anche il micologo, che sia formato e informato sull'appropriatezza prescrittiva del test amanitine e sul corretto campionamento, può essere di valido supporto al medico di Pronto Soccorso che ha in carico il paziente intossicato e può fornire immediate informazioni utili al laboratorio al quale debba essere inviato il campione, favorendo al contempo e in tempi rapidi, un corretto iter diagnostico-clinico.

In definitiva, appropriatezza prescrittiva, conoscenza delle criticità metodologiche e diagnostiche nonché la corretta interpretazione dei risultati del test Amanitin-ELISA, forniscono al clinico la miglior Efficacia Diagnostica a supporto di un rapido intervento terapeutico per sindrome falloidea o la possibilità di rassicurare il paziente affetto da intossicazione da funghi a decorso benigno.

### **Il test di Wieland-Meixner** **Test macrochimico per la rilevazione dei composti indolici:** **corretta procedura operativa e criticità metodologiche**

Theodor Wieland, chimico tedesco, figlio del premio Nobel Heinrich Wieland che isolò l'alfaamanitina nel 1941, studiò, nel 1949, un test che potesse essere utile per la ricerca rapida delle amanitine. Nel 1978 pubblicò il metodo: "*Zeitungspapier-test für giftpilze*" (Wieland, 1978) che fu a sua volta divulgato a partire dal 1979 da A. Meixner che ne "assunse" così la paternità e la notorietà (Meixner, 1979).

Il test macrochimico qualitativo conosciuto come "test di Meixner", applicabile su residui fungini, ha conosciuto un momento di grande apprezzamento scientifico nella seconda metà del XX secolo in cui si sono susseguite numerose pubblicazioni, studi basati su prove empiriche volte a confermare o meno, la presenza di amanitine nelle specie fungine testate in base ai risultati del test stesso.

Di fatto, oggi, viene scarsamente utilizzato dai micologi poiché viene considerato non affidabile per la ricerca delle amanitine sui reperti fungini, durante la perizia micotossicologica.

Definizioni e premesse utili in ambito micologico

- Si definiscono reazioni "MACROCHIMICHE" o "macroreazioni" quelle reazioni chimiche i cui effetti si possono osservare ad occhio nudo. Nei funghi le reazioni macrochimiche si osservano quando parti o frammenti di fungo (ovvero le sostanze in essi contenute) reagiscono in maniera visibile generando mutamenti di colore (=VIRAGGI) se messe a contatto con specifici reagenti, compresa l'aria.

I test macrochimici possono essere eseguiti su qualsiasi matrice fungina: FRESCO, COTTO, CONGELATO, DIVERSAMENTE CONSERVATO, SECCO, LIQUIDI DI RISULTA, LIQUIDI DI COTTURA, o UNA QUALSIASI DI QUESTE MATRICI OMOGENATA IN ACQUA (meglio se poi filtrata o centrifugata).

La reazione responsiva di positività o negatività non necessariamente sarà uguale nelle diverse matrici.

Le reazioni dovute a “interferenti” sono sempre possibili e possono dare risultati diversi da quanto descritto nel metodo, compresi falso positivi o falso negativi.

- Una SEDUTA ANALITICA è l'insieme delle prove effettuate nello stesso arco di tempo e nelle stesse condizioni (stessi reagenti, matrici, temperatura ambiente). Generalmente comprende: i test eseguiti sui campioni e i test di controllo (positivo e negativo) eseguiti contemporaneamente.

- CONTROLLO POSITIVO: reazione macrochimica POSITIVA eseguita su matrice fungina NOTA contenente la tossina. Un controllo positivo può essere costituito da diverse matrici a seconda della necessità e praticità: fungo secco, fresco macerato in acqua, cotto, congelato. Solitamente un controllo ottenuto macerando la specie tossica in acqua ha stabilità limitata alla stagione corrente e si consiglia comunque di proteggerlo dalla luce.

Il controllo positivo deve essere eseguito in ogni seduta analitica in modo sistematico e ha tre funzioni:

- 1) testare la buona conservazione del reagente che potrebbe essersi deteriorato nel tempo e non funzionare più;

- 2) confrontare il controllo POSITIVO direttamente con i campioni in esame risultati positivi;

- 3) validare i test eseguiti in perizia micotossicologica.

- CONTROLLO NEGATIVO: il controllo negativo può essere costituito da acqua o dal reagente stesso o da matrici fungine NOTE NON contenenti le tossine indagate.

Il controllo negativo deve essere eseguito in ogni seduta analitica in modo sistematico e ha tre funzioni:

- 1) testare il reagente che non si sia contaminato (per es.: durante la deposizione di gocce di reagente si può contaminare il contagocce che riposto, contamina tutto il reagente);

- 2) confrontare il controllo NEGATIVO direttamente con i campioni in esame risultati negativi;

- 3) validare i test eseguiti in perizia micotossicologica.

- **NOTA:** durante la seduta analitica, DISPENSARE prima il controllo negativo, poi i campioni e infine il controllo positivo.

- **CONTAMINAZIONE:** quando si lavora con controlli positivi e con funghi contenenti la tossina in esame, bisogna porre la massima attenzione a non contaminare i campioni da testare ed i controlli negativi. Quindi è buona pratica tenere campioni e controlli fisicamente distanti, cambiare i guanti e/o lavarsi le mani dopo ogni procedura. Non utilizzare lo stesso dispositivo per dispensare campioni e controlli.

### **Validazione dei risultati da parte del micologo**

Nella perizia micotossicologica sarebbe opportuno descrivere anche i risultati qualitativamente osservati dei controlli positivi e negativi effettuati durante la seduta analitica che, per confronto, abbiano evidenziato o meno la positività o negatività del campione in esame, validando così le prove stesse. Si suggerisce un esempio di perifrasi che spieghi quanto asserito in precedenza: “Durante le sedute analitiche del test di WielandMeixner del 13 novembre 2018, sono stati inseriti un controllo positivo ed un controllo negativo che hanno dato rispettivamente risultato qualitativo positivo e negativo, secondo quanto descritto dal metodo applicato”.

## Principio del test di Wieland-Meixner

Il test di Wieland-Meixner sfrutta la nota abilità dei **composti indolici** di produrre una reazione colorata con le aldeidi aromatiche.

I composti indolici, presenti anche in alcune specie di funghi, reagiscono chimicamente con le aldeidi aromatiche presenti nella lignina che vengono liberate grazie all'azione dell'acido cloridrico aggiunto, producendo un viraggio all'azzurro/verdino (Bresinski, 1990).

L'indolo è un composto eterociclico aromatico che possiede un gruppo ciclico, detto indossile e dei gruppi reattivi per cui è tossico. L'indossile è presente in molti alimenti essendo parte dell'amminoacido triptofano (precursore della serotonina), nello scatolo che caratterizza l'odore sgradevole delle feci, nell'olio di gelsomino, nelle amanitine e falloidine, in molti alcaloidi indolici come la bufotenina, la psilocibina, la psilocina, la baeocistina, la norbaeocistina, l'ergotamina ecc. (Bresinski, 1990; Benjamin, 1995).

La tossicità o meno della molecola è data dalla tipologia dei gruppi reattivi coniugati a questo anello.

Anche alcuni terpeni, benché non siano propriamente dei composti indolici, vengono rilevati dal test di Wieland-Meixner (Bresinski 1990).

Sensibilità del test di Wieland-Meixner: rileva i composti indolici (es.: amanitine) fino ad un quantitativo di 0,02 mg/ml (BreSinSKi, 1990; Beuhler, 2004).

Si riporta una tabella indicativa, non esaustiva, in cui si elencano alcuni generi e specie più comuni che possono contenere composti indolici e terpeni (Pelle 2007; SGaMBelluri 2014; BreSinSKi, 1990; Walton, 2018)

<b>COMPOSTI INDOLICI (alcuni) E TERPENI (s.l.)</b>	<b>Alcuni GENERI (e specie) IN CUI SONO STATI TROVATI COMPOSTI INDOLICI E TERPENI</b>
AMANITINE FALLOIDINE (in alcune specie)	AMANITA (phalloides, virosa, verna) LEPIOTA (brunneoincarnata, subincarnata=josserandii, helveola e molte altre sospette); GALERINA (marginata, sulciceps)
BUFOTENINE	AMANITA (citrina, porphyria,); MYCENA (pura ?)
PSILOCIBINA, PSILOCINA BEOCISTINA, NORBEOCISTINA	PSILOCYBE (semilanceata, cyanescens, cubensis, mexicana) INOCYBE (aeruginascens, corydalina, haemacta, tricolor, calamistrata) PANAEULUS (cinctulus=subbalteatus, cyanescens)
ERGOTAMINA	CLAVICEPS (purpurea)
TERPENI NOTA: non sono composti indolici, ma alcuni vengono rilevati dal test di Wieland-Meixner	LACTARIUS E RUSSULA (a sapore acre) TRICHOLOMA HYPHOLOMA (fasciculare, lateritium) OMPHALOTUS (olearius)

## NOTE

### •\* FALLOIDINE (o fallotossine):

il Dott. Paolo Davoli annota che «il test Wieland-Meixner risulta negativo alle fallotossine in quanto rivela soltanto la presenza di nuclei indolici idrossilati, come ad esempio quello del 6-idrossitriptofano presente nella struttura delle amanitine (NB: il triptofano è un amminoacido che contiene un nucleo indolico nella sua struttura). Nelle fallotossine, invece, il nucleo indolico a ponte del triptofano non è idrossilato ed esse risultano pertanto negative al test di Wieland-Meixner.

Anche le triptammine idrossi-sostituite, come la psilocibina e derivati (ma anche la serotonina e la bufotenina) danno risultato positivo al test W-M, in quanto contengono un nucleo indolico idrossilato in posizione 4 (psilocibina e derivati) o in 5 (serotonina e analoghi) (Walton, 2018).

• **ASSENZA DI AMANITINE E FALLOTOIDINE.**

In uno studio recentemente pubblicato (Sgambelluri 2014) sono state testate alcune specie fungine con strumentazioni e metodi analitici di nuova generazione, accurati, sensibili e affidabili (UV-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS), limite di rilevabilità: 10 ng/). Da questo studio è emerso che **NON contengono amanitine, né falloidine** le seguenti specie raccolte in Italia:

*Lepiota cristata*, *L. clypeolaria*, *L. magnispora*, *L. echinacea* ( $\equiv$  *Echinoderma echinaceum*).

Questo NON significa che non possano essere comunque responsabili di sindrome gastrointestinale.

**Procedura operativa per la rilevazione qualitativa dei composti indolici**

(Wieland, 1978; Meixner, 1979; Bresinsky, 1990; Benjamin, 1995; Walton, 2018)

Il test di Wieland-Meixner è un test che rileva qualitativamente in modo specifico i composti indolici presenti nelle matrici fungine. Le amanitine appartengono al gruppo dei composti indolici, per cui il test le rileva come categoria di composti, ma non è in grado di distinguere più specificamente le diverse tipologie di tale gruppo di composti indolici.

MATERIALI/REAGENTI necessari:

**Acido cloridrico (HCl)** concentrazione: o **6N** (=18% circa); o **8N** (=25%); o **12N** (=37%). Tanto maggiore è lo spessore della carta ligninica, tanto minore sarà la percentuale di acido cloridrico utilizzata. Quando la carta è spessa non è indicato utilizzare l'acido cloridrico al 37% (concentrazione commerciale, acido "fumante") in quanto "brucia" la carta rendendo meno visibile la reazione di positività. Inoltre, una concentrazione di acido cloridrico più bassa, rispetto al 37%, è operativamente più sicura per l'operatore. La diluizione dell'acido cloridrico fumante va eseguita sotto cappa chimica e da parte di personale adeguatamente formato.

**Controllo positivo:** un frammento di *Amanita phalloides*, anche essiccata e poi reidratata

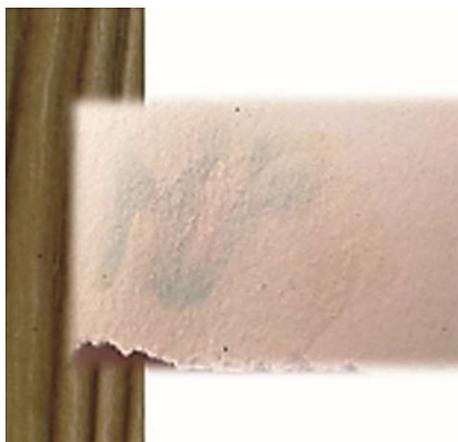
**Controllo negativo:** acqua

Cappa chimica (o asciugacapelli ma solo ad aria fredda!)

Tempo seduta analitica: da 1.30 a 2/3 ore circa

**Carta ligninica** con percentuale di lignina al **19-20%** (FEDRIGONI)

NOTA: sulla carta in immagine si evidenzia il confronto tra colore della carta



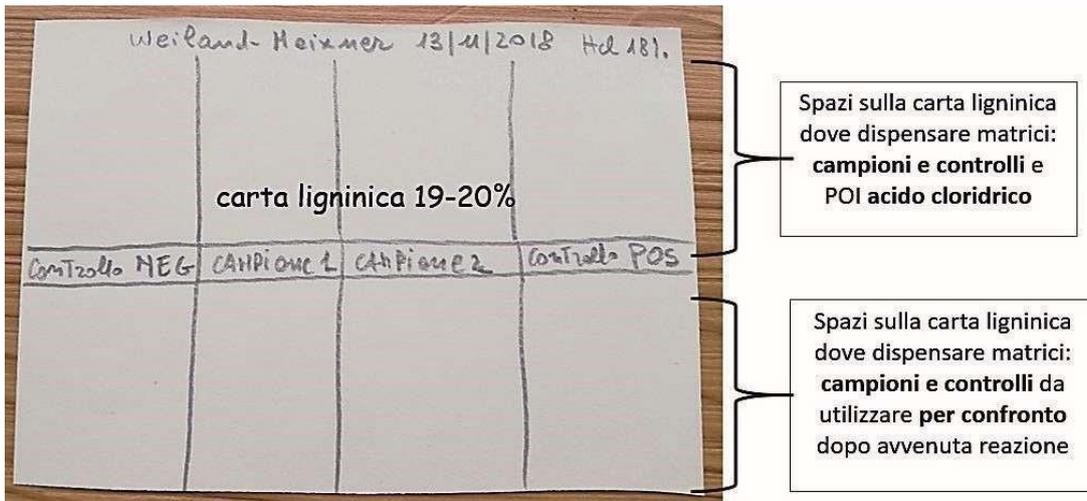
originale e la reazione avvenuta che si manifesta con colore verde/azzurro: MF

## PROCEDURA OPERATIVA •

### Preparare:

sulla carta **ligninica**, con una matita, identificare degli appositi spazi dove si deporranno i campioni e i controlli. Al fine di agevolare il confronto delle matrici (campioni e controlli) dopo avvenuta reazione con l'acido cloridrico, si consiglia di preparare degli appositi spazi per dispensare in **doppio** campioni e controlli. Ovviamente l'acido cloridrico sarà dispensato solo su di una serie di matrici così identificate.

**Campione:** ridurre in poltiglia il pezzo fungino con qualche goccia d'acqua.



**Controllo Positivo:** ridurre in poltiglia un pezzo di Amanita phalloides (o reidratarla se secca) con qualche goccia d'acqua (utilizzare guanti/lavarsi le mani!)

**Lasciare decantare per circa 30 min.** In alternativa favorire la soluzione dei composti indolici nel liquido di macerazione presente, schiacciando la matrice fungina.

- **Dispensare/depositare:**

**Controllo Negativo:** depositare una goccia di acqua nell'apposito spazio predefinito sulla carta ligninica e stenderla circolarmente.

**Campione:** depositare la poltiglia di campione e/o 1-2 gtt di liquido negli appositi spazi predefiniti e identificati sulla carta ligninica.

**Controllo Positivo:** depositare la poltiglia di controllo e/o 1-2 gtt di liquido negli appositi spazi predefiniti e identificati sulla carta ligninica.

Lasciare che la carta assorba la parte liquida del campione e dei controlli e poi rimuovere la poltiglia

- **Asciugare la carta a temperatura ambiente o sotto cappa chimica** o con asciugacapelli ad aria fredda. L'asciugatura in ambiente impiega anche un'ora o più (NON asciugare al sole o con aria calda).



Esempio delle matrici dispensate sulla carta ed asciugate

- **Aggiungere acido cloridrico**

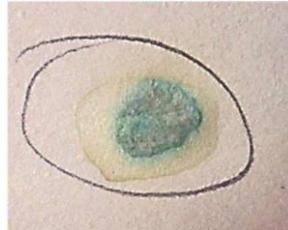
Quando la zona di deposito delle matrici è asciutta, dispensare, sotto cappa, su ogni matrice depositata di campione e dei controlli una goccia di HCl, alla concentrazione preparata inizialmente.

- **Lettura dei risultati**

LEGGERE IL RISULTATO DOPO 20-30 MIN E DOPO ALMENO UN'ORA QUANDO L'AREA DEL TEST SIA PERFETTAMENTE ASCIUTTA.

**REAZIONE POSITIVA** TEST DI WIELAND-MEIXNER: comparsa di un colore AZZURRO-VERDINO in corrispondenza della goccia di acido cloridrico depositata

**RISULTATO POSITIVO**



Questa colorazione rimane visibile a occhio nudo per poco più di un giorno, se messa a riparo dalla luce, coperta da foglio di alluminio.

**NB:** eventuali comparse di viraggi aspecifici: rossastri-porpora-fuxia sono ascrivibili ad una reazione interferente. Si manifestano spesso lavorando sul congelato. Solitamente si riesce anche a rilevare la tipica reazione descritta dal Test di Wieland-Meixner ma, in caso di dubbio, considerare il test non attendibile.

**REAZIONE NEGATIVA:** se il campione è negativo non compare nessun viraggio o si evidenzia una macchia giallastra sovrapponibile al colore della carta.

**CONTROLLO POSITIVO:** REAZIONE POSITIVA comparsa di un colore AZZURRO-VERDINO in corrispondenza della goccia di HCl depositata. Confrontare con il campione! **CONTROLLO NEGATIVO:** non compare nessun colore. Confrontare con il campione!

Esempio: Risultati test di Wieland-Meixner sulle matrici depositate



CONFRONTO TRA CAMPIONE E CONTROLLO



Campione sospetto: trattasi di Amanita muscaria



CONFRONTO TRA MATRICI DEPOSITATE PRIMA E DOPO LA REAZIONE

**NOTA:** si consiglia di dispensare controlli e campioni in doppio e di aggiungere l'acido cloridrico solo in una delle due serie di matrici depositate. Questo permette di avere sempre il confronto tra le matrici depositate prima e dopo l'aggiunta dell'acido cloridrico.



**Criticità del test di Wieland-Meixner e interpretazione dei risultati: in primis, un problema di specificità del metodo non correttamente interpretato**

Il test di Wieland-Meixner, come già ribadito, **rileva in modo specifico i composti indolici** di cui fanno parte anche le amanitine, ma **NON è in grado di distinguere la positività delle amanitine dagli altri composti indolici** come, per esempio, bufotenine, psilocibina ecc. o di alcuni terpeni.

Molti micologi hanno ritenuto questo test “non attendibile” in quanto, ricercando le amanitine, rilevavano dei “falsi positivi” se applicato a residui fungini di specie non contenenti amanitine.

Non è concettualmente né metodologicamente corretto ritenere un risultato “falso positivo” quando un test rilevi in modo specifico quelle molecole per cui si è evidenziata una certa reazione macrochimica per cui è stato approntato quel metodo analitico, al fine di rilevarla.

**Un risultato POSITIVO al test di Wieland-Meixner significa che la reazione avvenuta secondo metodica ha correttamente rilevato composti indolici per cui è specifico.** Si dovrà poi stabilire attraverso altre verifiche micologiche sui campioni fungini reperiti, se questi composti possano appartenere o meno a specie contenenti amanitine.

Per contro, **un risultato NEGATIVO al test di Wieland-Meixner è indice di NON presenza di composti indolici**, comprese le amanitine fino al limite rilevabile di 0.02mg/ml. La negatività al test di Wieland-Meixner diventa informazione principe, che lo conferma essere un test utile da applicarsi a reperti fungini in caso di micetismo.

Ad oggi, non sono descritti “FALSI NEGATIVI” su reperti fungini freschi al test di Wieland-Meixner.

## INTERPRETAZIONE CORRETTA DEL TEST

**TEST POSITIVO**→**PRESENZA DI composti INDOLICI**: amanitine, psilocibina, bufotenine ecc., terpeni e altre sostanze aromatiche presenti nei funghi (anche commestibili!) non note.

**TEST NEGATIVO**→**ASSENZA DI composti INDOLICI, COMPRESSE LE AMANTINE**

**Risultati FALSI POSITIVI e FALSI NEGATIVI nel test di Wieland-Meixner: un problema di procedura operativa non correttamente eseguita**

Come ogni test, dal punto di vista metodologico, la criticità principale di ottenere risultati FALSI POSITIVI o FALSI NEGATIVI deriva **da applicazioni non corrette della procedura operativa come descritta** e messa a punto originariamente dall'Autore.

Al fine di evitare risultati «falsati» si consiglia sempre di **SEGUIRE** la metodica, di un qualsiasi test, come descritta da fonti autorevoli, nello stesso ordine consecutivo dei passaggi, rispettando le quantità dei reagenti necessarie, le diluizioni, i tempi di reazione e la lettura dei risultati ed evitando e prevenendo la contaminazione.

Ogni piccola variante al metodo originale che si voglia introdurre, deve essere testata più volte, procedendo in contemporanea col metodo descritto in origine e confrontando i risultati ottenuti nella stessa seduta analitica.

**Si possono ottenere risultati FALSI NEGATIVI al test di Wieland-Meixner quando:**

- si utilizza **carta diversa da quella ligninica prescritta al 19-20%**. Non utilizzare carte con sbiancanti chimici. La carta da giornale tipo “quotidiano” (detta “riciclone”) può essere idonea, previo test di prova;

- si utilizza acido cloridrico non conservato correttamente, la cui concentrazione non sia quella delle percentuali indicate dal metodo;

- vi sia presenza di abbondante olio nei reperti fungini che possa fungere da «isolante» e interferire nella reazione;

- nel caso in cui si dispensi prima l'acido cloridrico e poi campione/controlli.

**ATTENZIONE! PRIMA** si dispensano i campioni/controlli, si lasciano asciugare bene e **POI** si dispensa l'acido cloridrico;

- si esamina la reazione **TROPPO PRESTO** entro i 20 min. Si devono osservare i risultati nel lasso di tempo minimo da 20 minuti a 1 ora...e più;

- si esaminano i risultati con luce non adeguata: esaminare sempre **MOLTO** attentamente i risultati con luce idonea che permetta una visione tipo luce “giorno”;

- si esegue il test su urine: la sensibilità del test di Wieland-Meixner rileva fino a 0,02 mg/ml di composti indolici (es.:amanitine) ovvero fino a 20000 ng/ml (= 20 microgrammi). Le urine di un paziente intossicato generalmente hanno una concentrazione di amanitine inferiore a 100 ng/ml, quindi di molto inferiore al limite di sensibilità del metodo e per questo motivo, non possono essere rilevate. La Amanita phalloides contiene una concentrazione di tossine pari a 100 microgrammi/ml, ovvero cinque volte superiore al limite di sensibilità del metodo (ENJALBERT 1993). La scrivente ha eseguito delle prove al test di Wieland-Meixner su urine di pazienti intossicati e utilizzando soluzioni di alfa-amanitina a concentrazione nota (rispettivamente di 1ng/ml; 3ng/ml; 10ng/ml; 30ng/ml; 100ng/ml), confermando la “negatività” al test di Wieland-Meixner di questi campioni e soluzioni, poiché il limite di sensibilità del metodo (= rilevabilità) è di molto superiore rispetto alle concentrazioni di amanitina testate.

**Si possono ottenere risultati FALSI POSITIVI al test di Wieland-Meixner quando:**

- si asciugano i campioni/controlli dispensati sulla carta ligninica a fonti di calore: al sole o altra fonte di calore maggiore di 63 °C → si **DEVE ASCIUGARE** sotto cappa o utilizzando un asciugacapelli ad aria fredda o a temperatura ambiente;

- si esegue il test di Wieland-Meixner su VOMITO, ASPIRATO GASTRICO (FOLLESA 2009), FECCI (presenza di scatolo = composto indolico).

### **Conclusioni sul Test di Wieland-Meixner**

Il test di Wieland-Meixner per la ricerca dei composti indolici nelle matrici fungine, se procedurato in modo corretto e quando se ne conoscano le effettive finalità, scopi, sensibilità e specificità analitica, può essere un valido aiuto per il micologo impegnato a coadiuvare il team sanitario che ha in carico un paziente con presunta intossicazione da funghi. Ciò nonostante, anche un risultato positivo attendibile, non può essere esaustivo nella risposta certa di intossicazione da amanitine, ma deve considerarsi parte integrante di una serie di indagini micologiche e tossicologiche in cui il test di Wieland-Meixner è maggiormente informativo quando negativo, escludendo la presenza di composti indolici, comprese le amanitine, nei campioni testati, fino al limite di sensibilità del metodo di 0,02 mg/ml.

**IN APPENDICE:** elenco di specie positive e negative al Test di Wieland-Meixner, secondo R. Seeger (SEEGER 1984), con integrazione di qualche specie testata da M. Fontanari.

## Riflessione conclusiva

Le caratteristiche organolettiche dei funghi eduli e il piacevole diletto nel cercarli per la soddisfazione personale di trovarli - irrefrenabile debolezza umana - spinge, nei luoghi di crescita dei carpofori, raccoglitori anche molto inesperti e poco documentati sull'effettivo rischio di consumare specie velenose. Molteplici fattori umani ed ambientali concorrono a determinare il consumo di una o più specie tossiche, con possibile insorgenza di micetismo. L'abbondante presenza di specie pregiate attira nei boschi raccoglitori meno esperti, non abituali. L'incidenza dei casi di intossicazione è strettamente correlata con l'andamento stagionale dei funghi e con la copiosità delle specie comparse nei luoghi di crescita. Non si dimentichi però che anche la scarsa presenza di specie commestibili spinge i raccoglitori verso specie eduli meno conosciute.

La possibile confusione tra specie commestibili e velenose è però un rischio effettivo anche per i raccoglitori consuetudinari.

Per chiunque, solamente quando necessariamente debba ricorrere alle cure di Pronto Soccorso, la presunta conoscenza si fa dubbio che diventa l'unica certezza manifesta nei sintomi, che annientano ogni convinzione.

Nei casi di intossicazione da funghi, la finalità degli interventi è il paziente intossicato mentre i funghi sono solo il mezzo attraverso cui si veicolano delle tossine, alcune potenzialmente mortali, dove fondamentale è la diagnosi di sospetto e il rapido approccio terapeutico. Le risorse umane coinvolte nella gestione dei micetismi necessitano di conoscenze, competenze, abilità pratiche nelle procedure di assistenza e nell'utilizzo di metodi diagnostici che portano a capacità operative e ad una serena assunzione di responsabilità, dove il preservare la vita umana e la salute è una missione di competenza, prima che un lavoro.

## Ringraziamenti

*Desidero ringraziare:*

- *Il Direttore del Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale Santa Chiara di Trento, dott. Patrizio Caciagli che, in questi vent'anni, ha permesso al personale tecnico di dedicare le conoscenze ed esperienze maturate al miglioramento continuo nell'applicazione di queste metodiche, guardando principalmente alle ricadute umane prima che economiche, non solo per i nostri pazienti ma anche per il personale sanitario coinvolto, motivandolo.*
- *Il dott. Pietro Alfonsi, il dott. Pierluigi Anzivino e i tecnici del Settore di Tossicologia: Roberto Ravagni, Gianni Stefani, Flora Donini e tutti i colleghi tecnici impiegati in urgenza che adeguatamente formati hanno sempre dato grande disponibilità nell'eseguire questa metodica con attenzione e valutazione critica dei risultati, senza dare mai nulla per scontato. A tutti, un grazie di cuore per la disponibilità e professionalità dimostrata, indispensabili nella gestione di questa attività "di nicchia" che ha permesso anche l'impostazione e realizzazione di questo lavoro.*
- *La dott.ssa Daniela Maiori dei Laboratori Bühlmann, fornitori del test Amanitin-ELISA per il costante supporto tecnico.*
- *Gli amici e micologi Francesco Golzio, Riccardo Mazza, Nicola Sitta, Paolo Davoli, Alberto Ferretti le professoresse dell'Università di Genova Micaela Tiso e Mirca Zotti che permettono, anche attraverso la divulgazione di queste tecniche, la formazione e l'acquisizione di nuove competenze del personale micologo coinvolto nelle intossicazioni da funghi.*

## Bibliografia

- AA.VV. - 2013: *Amanitin-ELISA. Foglietto illustrativo indicazioni Kit Amanitin-ELISA, revisione 24/01/2013.*
- AA.VV. - 2013: *Amanitin-ELISA GUIDA. Management of suspected mushroom poisoning.* Bühlmann CF032-03E. Guida rapida indicazioni e metodica 2013.
- Arrigo S., C.A. Russo. & G. Merlo - 1983: *Appunti di radioimmunologia.* BY Gulden Italia S.P.A.
- Bartolomei M.S. & J.L. Corden - 1987: *Localization of alpha-amanitin resistance mutation in the gene encoding the largest subunit of mouse RNA polymerase 2.* Mol Cell Biol. 7 (2): 586-594.
- Benjamin D.R. - 1995: *Mushrooms poisons and panaceas.* W.H. Freeman and Company.
- Beuhler M., D.C. Lee, R. Gerkin - 2004: *The Meixner test in the detection of alpha-amanitin and false-positive reactions caused by psilocin and 5-substituted tryptamines.* Ann Emerg Med 44(2):114-20.
- Beutler J.A. & P.P. Vergeer - 1980: *Amatoxins in American mushrooms evaluation of the Meixner Test.* Mycologia 72 (6): 1142-1148.
- Bresinsky A. & H. Besl - 1990: *A colour atlas of poisonous fungi:* 18-49. Wolfe publishing Ltd.
- Butera R., C. Locatelli, T. Coccini & L. Manzo - 2004: *Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study.* Journal of Toxicology 42: 901-912.
- Butera R., T. Coccini, G. Randine, C. Locatelli & L. Manzo: *Validation of the Elisa Test for Urinary Alpha-Amanitin Analysis in Human Amanita Phalloides.* J. Toxicol. Clin. Toxicol 42 (4): 535.
- Butera R., D. Lonati, J. Georgatos, S. Arrigoni, C. Locatelli & L. Manzo - 2004: *Diagnostic Value of Urinary Amanitin Analysis in Mushroom Poisoning. A Prospective Study.* Journal of Toxicology 42 (4): 395-564.
- Diaz J.H. - 2005: *Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings.* Critical Care Medicine 33 (2): 427.
- Drain P.K., E.P. Hyle, F. Noubary, K.A. Freedberg, D. Wilson, W.R. Bishai, W. Rodriguez & I.V. Bassett - 2014: *Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings.* Lancet Infect Dis. 14 (3): 239-49. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70250-0. Epub 2013 Dec 10. Review. PubMed PMID: 24332389; PubMed Central PMCID: PMC4016042
- Enjalbert F., C. Gallion, F. Jehl & H. Monteil - 1993: *Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of Amanita phalloides tissues.* Toxicon 31: 803-807.
- Epis S. - 2009: *Poisonous mushrooms. Molecular detection of poisonous mushrooms in different matrices.* Mycological Society of America. As doi: 10.3852/09-124.
- Faulstich H., A. Talas & H.H. Wellhoner - 1985: *Toxicokinetics of labelled amatoxin in the dogs.* 1985; Arch Toxicol 56: 190-194.
- Fedrigoni: Carta ligninica al 19%. Arco Print Edizioni, risma da 250 fogli, misure (70 × 100 cm). <http://www.fedrigonicartiere.com/papers/arcoprint-edizioni-15>
- Fiedziukiewicz M. - 2013: *Mushroom Toxins - the Meixner test.* Degree of master of Science by research. University of York, Department of Chemistry.
- Follesa P. - 2009: *Manuale tecnico-pratico per indagini su campioni fungini.* AMB Fondazione Centro Studi Micologici. Trento.
- Fontanari M. - 2006: *Studio sulla fattibilità di una master curva in un kit immunometrico di alfa amanitina.* Tesi di laurea (Relatore: dott Aldo Peruzzini).
- Giampreti A., S. Vecchio, T. Coccini, V. Petrolini, D. Lonati, R. Butera, E. Roda, D. Acerbi & C. Locatelli: *Utilità della determinazione dell'amanitina urinaria nella diagnostica delle intossicazioni da funghi: studio prospettico.* Fondaz. Maugeri di Pavia.
- Hallen H.E., G.C. Adams & A. Eicker - 2002: *Amatoxins and phallotoxins in indigenous and introduced South African amanita species.* South African journal of Botany 68: 322-326.
- Jaeger A., F. Jehl, F. Flesch & P. Sauder - 1993: *Is There a Role for Use of Elimination Techniques in Amanita Poisoning?* J Toxicol Clin Toxicol 31: 63-80.
- Letschert K., H. Faulstich, D. Keller & D. Kepp - 2006: *Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes.* Toxicological Sciences 91 (1): 140-149.
- Mazza R. - 2008: *Dizionario illustrato di Micotossicologia. Myconolexikon I.* Ed. Romar. Milano.
- Meixner A.: *Reazioni chimiche colorate sui funghi.*
- Meixner A. - 1979: *Amatoxin-Nachweis in Pilzen.* Z. Mycol. 45: 137-139.
- Pelle G. - 2007: *Funghi velenosi e sindromi tossiche.* Ed. Bachetta. Albenga.
- Price C.P. & R.H. Christenson - 2003: *Evidence-Based Laboratory Medicine: from principle to outcomes.* Washington D.C.: AACC Press.
- Rald E. - 1983: *The Meixner test should not be applied as a standard procedure in case of mushroom poisoning.* Svampe 7: 18-25.

- Santi L., C. Maggioli, M. Mastroroberto, M. Tufoni, L. Napoli & P. Caraceni - 2003: *Acute liver failure caused by Amanita phalloides poisoning*. International Journal of Hepatology, Volume 2012, Article ID 487480.
- Seeger R. - 1984: *Zeitungspapiertest für Amanitine-falsch-positive Ergebnisse*. Zeitschrift für Mycologie, Band 50 (2).
- Sgambelluri R.M., S. Epis, D. Sasser, H. Luo, E.R. Angelos & J.D. Walton - 2014: *Profiling of Amatoxins and Phallotoxins in the Genus Lepiota by Liquid Chromatography Combined with UV Absorbance and Mass Spectrometry*. Toxins 6: 2336-2347.
- Sgambelluri R.M., S. Epis, D. Sasser, H. Luo, E.R. Angelos & J.D. Walton - 2014: *Supplementary Data S1-S5*.
- Staack R.F. & H. Maurer - 2000: *New Buhlmann ELISA for determination of Amanitins in urine. Are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites?* Toxichem Krimtech 2000; 68 (2): 65-70. Dipartimento di Farmacologia e Tossicologia, Univ. di Saarland.
- Stryer L. - 1989: *Biochimica*. Terza edizione 29: 819-820.
- Traverso M. & M. Benvenuti - 1998: *Il genere Amanita in Italia*. Arti Grafiche Tilligraf S.p.A. Roma.
- Walton J. - 2018: *The cyclic peptide toxins of Amanita and other poisonous mushrooms*. Springer International Publishing AG.
- Wieland T.H. - 1978: *Zeitungspapier-test für giftpilze*. Umschau Wiss.Technik 78: 611.
- Wieland T.H. - 1986: *T.Wieland: Peptides of poisonous Amanita Mushroom*. Springer New York.

## APPENDICE

### ELENCO SPECIE TESTATE AL TEST DI WIELAND (1949)MEIXNER (1979)

tratto da: SeeGer R., 1984

A cura di Monica Fontanari, vengono riprodotti gli elenchi delle specie testate come supporto tecnico-pratico nella valutazione dei risultati del test, in base alla specie testata. Si riporta il testo originale, compresi errori ortografici nei generi e/o specie che non sono aggiornati secondo l'attuale sistematica. In questo lavoro, R. Seeger testa 335 specie di funghi utilizzando il metodo proposto da T.H. Wieland, pubblicato nel 1978 e ripreso poi da A. Meixner nel 1979.

#### Risultati al test di Wieland-Meixner:

**63 specie testate risultano positive**

**272 specie testate risultano negative**

#### NOTA: LE PROVE EFFETTUATE DALL'AUTORE SI RIFERISCONO A FUNGHI FRESCI.

Poco o nulla si conosce sui risultati al test di Wieland-Meixner sulle stesse specie da cotte.

Qualche altro test, eseguito su fresco e/o cotto e/o congelato e/o liquidi di risulta/cottura e/o secco è stato inserito qui per completezza ed eseguito da M. Fontanari.

#### LEGENDA COLORAZIONI REAZIONI OTTENUTE DALL'AUTORE

<p>BABYBLAU = BLU TENUA          BLAUGRAU = BLU GRIGIO          BLAßGRÜN = VERDE PALLIDO          GRAUBLAU = GRIGIOBLU          GRAUGRÜN = GRIGIO VERDE          GRAUTÜRKIS = GRIGIO TURCHESE          GRAUVIOLETT = GRIGIO VIOLETTO          GRÜNWEIß = VERDE BIANCO          HELLTÜRKIS = TURCHESE BRILLANTE          NEBELBLAU = BLU NEBBIA          PASTELLGRÜN = VERDE PASTELLO</p>
--

**SPECIE POSITIVE AL TEST DI WIELAND-MEIXNER SECONDO SEEGER**

<b>GENERI/SPECIE</b>	<b>COLORE</b>
<b>RISULTATO TEST</b>	
<b>Gomphidiaceae</b>	
<i>Gomphidius glutinosus</i>	blaugrau
<b>Tricholomataceae</b>	
<i>Clitocybe nebularis</i>	blaßgrün
<i>Lepista sordida</i>	graugrün
<i>Tricholoma inamoenum</i>	grünweiß
<i>Tricholoma lascivum</i>	graugrün
<i>Tricholoma pardinum</i>	graugrün
<i>Lyophyllum infumatum</i>	graugrün
<i>Lyophyllum loricatum</i>	graugrün
<i>Lyophyllum decastes</i>	graugrün
<i>Calocybe chrysenteron</i>	graugrün
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	graugrün
<b>Entolomataceae</b>	
<i>Entoloma clypeatum</i>	pastellgrün
<b>Pluteaceae</b>	
<i>Pluteus pellitus</i>	blauweiß
<b>Amanitaceae</b>	
<i>Amanita citrina</i>	grauviolett
<i>Amanita porphyria</i>	graublau
<i>Amanita strobiliformis</i>	grünweiß

AMANITA PHALLOIDES positiva al Test di Wieland-Meixner SIA COTTA, CRUDA, DECONGELATA, LIQUIDI DI RISULTA/COTTURA, SECCO. (Test eseguiti da M. Fontanari)

AMANITA VIROSA positiva al Test di Wieland-Meixner SIA COTTA, CRUDA, DECONGELATA, LIQUIDI DI RISULTA, SECCO. (Test eseguiti da M. Fontanari)

LEPIOTA BRUNNEOINCARNATA positiva al Test di Wieland-Meixner SIA COTTA, CRUDA. (Test eseguito da M. Fontanari)

LEPIOTA SUBINCARNATA (=JOSSEANDII) positiva al Test di Wieland-Meixner SIA COTTA, CRUDA (Test eseguiti da M. Fontanari)

## SPECIE POSITIVE AL TEST DI WIELAND-MEIXNER SECONDO SEEGER

GENERI/SPECIE	COLORE
RISULTATO TEST	
<b>Coprinaceae</b>	
<i>Coprinus atramentarius</i>	graugrün
<i>Coprinus lagopus</i>	graugrün
<i>Coprinus hemorobius</i>	graugrün
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	graugrün
<i>Psathyrella velutina</i>	grautürkis
<i>Psathyrella hydrophila</i>	graugrün
<i>Psathyrella obtusata</i>	blaßgrün
<b>Cortinariaceae</b>	
<i>Inocybe hirtella</i>	grünweiß
<i>Hebeloma radicosum</i>	grünweiß
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	graugrün
<i>Hebeloma sinuosum</i>	babyblau
<i>Hebeloma claviceps</i>	graugrün
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	graugrün
<i>Hebeloma sinapizans</i>	graugrün
<i>Cortinarius multiformis</i>	helltürkis
<i>Cortinarius amoenolens</i>	graugrün
<i>Cortinarius subtortus</i>	babyblau
<i>Cortinarius camphoratus</i>	nebelblau
<i>Cortinarius decoloratus</i>	graugrün
<i>Leucocortinarius bulbiger</i>	graugrün

PSILOCYBE SEMILANCEATA positiva al Test di Wieland-Meixner SECCO, LIQUIDI DI RISULTA. (Test eseguiti da M. Fontanari)

**SPECIE POSITIVE AL TEST DI WIELAND MEIXNER SECONDO SEEGER**

<b>GENERI/SPECIE</b>	<b>COLORE</b>
	<b>RISULTATO TEST</b>
<i>Russulaceae</i>	graugrün
<i>Russula laurocerasi</i>	graugrün
<i>Russula fellea</i>	graugrün
<i>Russula turci</i>	graublau
<i>Russula rosea</i>	grautürkis
<i>Russula paludosa</i>	graugrün
<i>Russula luteotacta</i>	graugrün
<i>Russula emetica</i>	graugrün
<i>R. emetica var. silvestris</i>	grautürkis
<i>R. emetica var. betularum</i>	graugrün
<i>Russula fragilis</i>	graugrün
<i>Lactarius vellereus</i>	graugrün
<i>Lactarius piperatus</i>	graugrün
<i>Lactarius pergamenus</i>	grautürkis
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	graublau
<i>Lactarius necator</i>	graugrün
<i>Lactarius torminosus</i>	graugrün
<i>Lactarius pubescens</i>	blaugrau
<i>Lactarius uvidus</i>	graugrün
<i>Lactarius acerrimus</i>	graugrün
<i>Lactarius pallidus</i>	graugrün
<i>Lactarius circellatus</i>	graugrün
<i>Lactarius tithymalinus</i>	blaßgrün
<i>Lactarius mitissimus</i>	graugrün
<i>Lactarius aurantiacus</i>	graugrün
<i>Lactarius quietus</i>	grautürkis
<i>Lactarius blumei</i>	graugrün
<b>Poriales mit lamelligem Hyme</b>	
<i>Lentinellus cochleatus</i>	graugrün

SPECIE NEGATIVE AL TEST DI WIELAND-MEIXNER SECONDO SEEGER

272 specie testate, risultano negative

**Paxillaceae:** *Paxillus involutus*. *P. atrotomentosus*. *P. panuoides*. *Hygrophoropsis aurantiaca*. *Omphalotus olearius*.

**Gomphidiaceae:** *Chroogomphus rutilus*.

**Hygrophoraceae:** *Hygrophorus chrysodon*. *H. penarius*. *H. eburneus*. *H. melizeus*. *H. erubescens*. *H. queletii*. *H. poetarum*. *H. pudorinus*. *H. nemoreus*. *H. discoideus*. *H. hypothejus*. *H. lucorum*. *H. olivaceoalbus*. *Hygrocybe persistens*. *H. psittacina*. *H. conica*. *H. acutoconica*.

**Tricholomataceae:** *Laccaria amethystina*. *L. laccata*. *L. proxima*. *Clitocybe hydrogramma*. *C. phyllophila*. *C. odora*. *C. clavipes*. *C. inornata*. *C. geotropa*. *C. gibba*. *C. cerussata*. *C. pithiophila*. *C. dealbata*. *C. obsoleta*. *C. suaveolens*. *C. ditopa*. *Lepista nuda*. *L. personata*. *L. gilva*. *L. inversa*. *Tricholomopsis decora*. *T. rutilans*. *Tricholoma batschii*. *T. albobrunneum*. *T. vaccinum*. *T. imbricatum*. *T. portentosum*. *T. sejunctum*. *T. sulfureum*. *T. impolitum*. *T. saponaceum*. *T. irinum*. *T. virgatum*. *T. orirubens*. *T. scalpturatum*. *T. atosquamosum*. *T. terreum*. *Armillariella mellea*. *Calocybe ionides*. *Pseudoclitocybe cyathiformis*. *Melanoleuca strictipes*. *M. subalpina*. *M. melaleuca*. *M. tristis*. *Collybia peronata*. *C. hariolorum*. *C. confluens*. *C. ingrata*. *C. acervata*. *C. dryophila*. *C. butyracea*. *C. fusipes*. *C. maculata*. *Hohenbuehelia petaloidea*. *Oudemansiella platiphylla*. *O. mucida*. *O. radicata*. *Marasmius rotula*. *M. alliaceus*. *M. oreades*. *Mycena pelianthina*. *M. pura*. *M. inclinata*. *M. galericulata*. *M. chlorinella*. *M. zephyrus*. *M. alcalina*. *Flammulina velutipes*.

**Entolomataceae:** *Clitopilus prunulus*. *Entoloma sinuatum*. *E. rhodopolium*. *E. nidorosum*.

**Pluteaceae:** *Volvariella speciosa*. *V. speciosa* var. *gloiocephala*. *Pluteus pellitus*. *P. atricapillus*. *P. leoninus*. *P. romelli*.

**Amanitaceae:** *Amanita inaurata*. *A. vaginata*. *A. mairei*. *A. crocea*. *A. umbrinolutea*. *A. lividopallescens*. *A. muscaria*. *A. pantherina*. *A. spissa*. *A. rubescens*. *A. echinocephala*.

**Agaricaceae:** *Agaricus bisporus*. *A. bitorquis*. *A. maleolens*. *A. aestivalis*. *A. langei*. *A. haemorrhoidarius*. *A. silvaticus*. *A. vaporarius*. *A. subperonatus*. *A. campester*. *A. augustus*. *A. perranus*. *A. silvicola*. *A. abruptibulbus*. *A. arvensis*. *A. excellens*. *A. macrosporus*. *A. comtulus*. *A. lutosus*. *A. xanthoderma*. *A. placomyces*. *A. placomyces* var. *meleagris*. *Lepiota acutesquamosa*. *L. aspera*. *L. cristata*. *L. subgracilis*. *L. clypeolaria*. *Macrolepiota procera*. *M. rhacodes*. *M. gracilentia*. *M. mastoidea*. *Leucoagaricus pudicus*. *Cystoderma amiantinum*. *C. carcharias*.

**Coprinaceae:** *Coprinus comatus*. *C. picaceus*. *C. micaceus*. *C. domesticus*. *C. disseminatus*. *Psathyrella candolleana*.

LEUCOAGARICUS LEUCOTHITES: negativo al test di Wieland-Meixner. (Test eseguiti da M. Fontanari)

LEPIOTA CRISTATA negativo al test di Wieland-Meixner. (Test eseguiti da M. Fontanari)

**Bolbitiaceae:** *Conocybe cryptocystis*, *Pholiotina vestita*, *Bolbitius vitellinus*, *Agrocybe praecox*, *A. vervacti*.

**Strophariaceae:** *Stropharia squamosa*, *S. coronilla*, *S. rugosoannulata*, *S. aeruginosa*, *Hypholoma capnoides*, *H. sublateritium*, *H. fasciculare*, *Pholiota squarrosa*, *Ph. flammans*, *Ph. adiposa*, *Ph. subsquarrosa*, *Ph. lenta*, *Ph. gummosa*, *Ph. astragalina*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Tubaria furfuracea*.

**Crepidotaceae:** *Crepidotus mollis*.

**Cortinariaceae:** *Inocybe atripes*, *I. terrigena*, *I. patouillardii*, *I. jurana*, *I. maculata*, *I. fastigiata*, *I. cervicolor*, *I. bongardii*, *I. godeyi*, *I. geophylla*, *I. geophylla* var. *lilacina*, *I. pyriodora*, *I. lucifuga*, *I. obscura*, *I. cincinnata*, *I. napipes*, *I. asterospora*, *Gymnopilus spectabilis*, *G. liquiritiae*, *G. hybridus*, *G. penetrans*, *Dermocybe cinnamomeolutea*, *D. malicora*, *D. sanguinea*, *Cortinarius cotoneus*, *C. betuletorum*, *C. orellanoides*, *C. gentilis*, *C. sturyi*, *C. glaucopus*, *C. praestans*, *C. varius*, *C. balteatocumatilis*, *C. latus*, *C. infractus*, *C. prasinus*, *C. auroturbinatus*, *C. elegantior*, *C. subfulgens*, *C. traganus*, *C. pholideus*, *C. trivialis*, *C. elatior*, *C. pangloius*, *C. delibutus*, *C. armillatus*, *C. colus*, *C. bouillardii*, *C. candelaris*, *C. duracinus*, *C. biveus*, *C. subferrugineus*, *C. saturninus*, *C. erythrinus*, *C. subsertipes*, *C. hinnuleus*, *C. pachypus*, *C. rheubarbarinus*, *Rozites caperata*.

**Russulaceae:** *Russula delica*, *R. nigricans*, *R. densifolia*, *R. adusta*, *R. farinipes*, *R. foetens*, *R. pectinata*, *R. consobrina*, *R. flava*, *R. decolorans*, *R. virescens*, *R. cyanoxantha*, *R. vesca*, *R. aeruginea*, *R. rosacea*, *R. lutea*, *R. nauseosa*, *R. xerampelina*, *R. coenulea*, *R. olivacea*, *R. alutacea*, *R. integra*, *R. pahudosa*, *R. aurata*, *R. pulchella*, *R. badia*, *Lactarius citriolens*, *L. lignyotus*, *L. fuliginosus*, *L. semisanguifluus*, *L. deterrimus*, *L. chrysorrheus*, *L. porninsis*, *L. blennius*, *L. hebus*, *L. volemus*, *L. ichoratus*, *L. rufus*, *L. seriffuus*.

NOTA: rald E. - 1983: *The Meixner test should not be applied as a standard procedure in case of mushroom poisoning*. *Svampe* 7: 18-25.

In questo articolo (spesso riportato in vari testi come significativo per il Test di Wieland-Meixner), in cui Rald afferma di testare 535 specie di cui 163 positive (sull'articolo ne sono riportate molte di più: 463 positive su 769 tesate), non vengono menzionate le specie testate ma solamente i generi di appartenenza e il numero delle specie che sono risultate positive per singolo genere.

Ad esempio: *Amanita*, testate 9 specie e 2 risultano positive.

Questo rende di fatto questo lavoro di Rald non utilizzabile ai fini Meixner.

PAGINE  
DI  
MICROLOGIA

Direttore responsabile Giovanni Consiglio - Via C. Ronzani, 61 - 40033 Casalecchio di Reno (BO)  
Registrato presso la Cancelleria del Tribunale di Trento al n° 828 del Registro stampe  
in data 4 Luglio 1994