



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΟΞΙΝΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΒΙΟΤΡΟΜΟΚΡΑΤΙΑ**  
**ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ**



**TOXINS-BIOTERRORISM**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**  
**ΛΑΡΙΣΑ 2017**

«Τοξίνες που συνδέονται με βιοτρομοκρατία μέθοδοι ανίχνευσης  
και μηχανισμοί δράσης»

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Τσατσάκης Αριστείδης:** Καθηγητής Τοξικολογίας Διευθυντής του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικών Επιστημών & Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

**Τσιτσιμπίκου Χριστίνα:** Phd. Χημικός στο Γενικό Χημείο του Κράτους, Επιτροπή Αξιολόγησης Κινδύνου (ECHA).

## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες .....	7
Περίληψη.....	8
Abstract .....	9
1. Εισαγωγή.....	10
2. Ορισμοί.....	11
2.1 Τρομοκρατία-τρομοκράτες .....	11
2.2 Βιοτρομοκρατία.....	11
2.3 Χημικό όπλο.....	12
2.4 Χημικός παράγοντας .....	12
2.5 Όπλα μαζικής καταστροφής.....	12
2.6 Τοξίνες.....	12
2.7 Τοξινολογία.....	13
3. Κατηγοριοποίηση τοξινών .....	14
3.1 Κατηγοριοποίηση με βάση τους οργανισμούς προέλευσης.....	14
3.2 Κατηγοριοποίηση με βάση τα κύτταρα-στόχους .....	14
3.3 Κατηγοριοποίηση με βάση τον τρόπο δράσης.....	15
3.4 Κατηγοριοποίηση με βάση την απελευθέρωση τους από τον παραγόμενο οργανισμό .	16
3.5 Θεσμική κατηγοριοποίηση βιολογικών παραγόντων-τοξινών.....	16
3.5.1 Ευρωπαϊκή Ένωση .....	16
3.5.2 Centers for disease control (CDC) .....	17
3.5.3 Γκρουπ Αυστραλίας (AG).....	17
3.5.4 Λίστα CIA .....	18
4. Ιστορικά στοιχεία βιοπολέμου -βιοτρομοκρατίας.....	20
4.1. Αρχαιότητα- Μυθολογία - Μεσαίωνα.....	20
4.2. Νεότερη Ιστορία .....	21
4.3 Συνθήκη Γενεύης - Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) .....	22
5. Πιθανοί τρόποι χρήσης τοξινών από τρομοκράτες .....	23
6. Ανίχνευση τοξινών .....	25
6.1 Γενικά στοιχεία μεθόδων ανίχνευσης τοξινών.....	25
6.2 Κύριες μέθοδοι ανίχνευσης τοξινών .....	28
6.2.1 Δοκιμασίες σε πειραματόζωα.....	28
6.2.2 Δοκιμασίες σε σειρές κυττάρων ή ιστών. ....	29
6.2.3 Δοκιμασίες ανίχνευσης γενετικού υλικού .....	29
6.2.4 Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης .....	30

6.2.5 Φασματοσκοπικές αναλυτικές μέθοδοι.....	32
6.2.6 Βιοαισθητήρες (biosensors) .....	33
6.2.7 Συνδυαστικές-καινοτόμες τεχνικές .....	34
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΞΙΝΩΝ .....	35
7. ΤΟΞΙΝΗ ΑΝΘΡΑΚΑ (ΑΤ) .....	35
7.1 Ιστορικά δεδομένα: .....	35
7.2 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:.....	36
7.3 Οργανισμοί προέλευσης:.....	37
7.4 Τρόπος δράσης-παρενέργειες:.....	37
7.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	41
7.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	42
8. ΤΟΞΙΝΗ ΑΛΛΑΝΤΙΑΣΗΣ (BOTULINUM NEUROTOXIN ΒοNT) .....	43
8.1 Ιστορικά δεδομένα: .....	43
8.2 Οργανισμοί προέλευσης:.....	43
8.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:.....	44
8.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	45
8.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	47
8.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης: .....	49
9. ΤΟΞΙΝΗ ΡΙΚΙΝΗΣ (RICIN TOXIN -RT) ΚΑΙ ΑΜΠΙΠΙΝΗΣ (ABRIN TOXIN-AT) ...	50
9.1 Ιστορικά δεδομένα: .....	50
9.2 Οργανισμοί προέλευσης:.....	51
9.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:.....	51
9.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	53
9.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	56
9.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	58
10. ΣΤΑΦΥΛΟΚΚΟΚΙΚΗ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΗ Β (SEB):.....	59
10.1 Ιστορικά δεδομένα: .....	59
10.2 Οργανισμοί προέλευσης.....	59
10.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:.....	59
10.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	60
10.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	62
10.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	63
11. ΤΟΞΙΝΕΣ SHIGA (Stx) ΚΑΙ SHIGA-LIKE (SLtx).....	64
11.1 Ιστορικά δεδομένα: .....	64
11.2 Οργανισμοί προέλευσης.....	64
11.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες.....	65
11.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	65
11.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	67
11.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	68

12.	T-2 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΗ (T-2) .....	69
12.1	Ιστορικά δεδομένα: .....	69
12.2	Οργανισμοί προέλευσης .....	70
12.3	Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες: .....	70
12.4	Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	71
12.5	Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	72
12.6	Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	73
13.	TETΡΟΔΟΤΟΞΙΝΗ (TTX).....	74
13.1	Ιστορικά δεδομένα: .....	74
13.2	Οργανισμοί προέλευσης .....	74
13.3	Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες .....	75
13.4	Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	75
13.5	Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	76
13.6	Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	77
14.	ΣΑΞΙΤΟΞΙΝΗ (STX).....	78
14.1	Οργανισμοί προέλευσης .....	78
14.2	Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες .....	78
14.3	Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	79
14.4	Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	80
14.5	Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	81
15.	ΕΨΙΛΟΝ ΤΟΞΙΝΗ (ETX) .....	82
15.1	Οργανισμοί προέλευσης .....	82
15.2	Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες .....	82
15.3	Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες .....	82
15.4	Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία.....	83
15.5	Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης .....	84
16.	Επίλογος .....	85
	ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	87

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Τοξικολογίας» του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θέλω να ευχαριστήσω τον διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθηγητή Δημήτριο Κουρέτα για την ίδρυση και λειτουργία του συγκεκριμένου μεταπτυχιακού, την επιλογή του θέματος της παρούσας εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και την επικοινωνιακή επικοινωνία μας σε όλη τη διάρκεια της φοίτησης μου στο μεταπτυχιακό της τοξικολογίας.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες μου ΚΟΛΟΒΟΥ Χρύσα και ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ Δήμητρα για την κριτική ανάγνωση και τα σχόλια τους στην παρούσα εργασία αλλά και την συνολική βοήθεια και θετική τους αλληλεπίδραση κατά τη διάρκεια των κοινών μας σπουδών.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την σύζυγό μου Ανθή και του δύο μικρούς μου επιστήμονες Κωνσταντίνο και Βασίλη ,από τους οποίους αφαίρεσα σημαντικό χρόνο παρουσίας μου για να κατορθώσω να ολοκληρώσω το εν λόγω μεταπτυχιακό και στους οποίους αφιερώνω την παρούσα εργασία.

## Περίληψη

Η βιοτρομοκρατία, η οποία έχει πλούσιο ιστορικό παρελθόν, αποτελεί μορφή τρομοκρατίας με χρήση βιολογικών παραγόντων που αποτελούν το μέσο επίτευξης της τρομοκρατικής επίθεσης. Μια εκ των κύριων κατηγοριών βιολογικών παραγόντων βιοτρομοκρατίας με υψηλή δραστηριότητα είναι οι τοξίνες, δηλαδή χημικές ουσίες που προέρχονται από μικροοργανισμούς, φυτά ή ζώα και έχουν δηλητηριώδη ή και θανατηφόρα επίδραση επί άλλων ζωντανών οργανισμών και φυσικά έναντι των ανθρώπων.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τοξίνες οι οποίες αποτελούν τις πλέον πιθανές για χρήση σε βιοτρομοκρατικές επιθέσεις και συγκεκριμένα η τοξίνη του άνθρακα (AT), της αλλαντίασης (BoNT), η ρικίνη (RT) και η αμπρίνη (AT), η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη B (SEB), οι τοξίνες Shiga (Stx) και Shiga like (SLtx), η T-2 μυκοτοξίνη (T-2), η τετροδοτοξίνη (TTX), η σαξιτοξίνη (STX) και η τοξίνη έψιλον (ETX). Επιπλέον αναλύονται γενικοί μέθοδοι-τεχνικές ανίχνευσης των τοξινών και των οργανισμών που τις παράγουν και αναφέρονται ενδεικτικοί τρόποι ανίχνευσης για καθεμιά χωριστά όπως προκύπτουν από την διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία.



## Abstract

Bioterrorism, which has a rich historical past, is a form of terrorism using biological agents that are the means of achieving the terrorist attack. One of the main categories of biological agents with high activity is toxins which are chemicals derived from microorganisms, plants or animals, and they have a deleterious or even fatal effect on other living organisms and, of course, against humans.

In this thesis, we present toxins which are most likely to be used in bioterrorist attacks namely, anthrax toxin (AT), botulinum (BoNT), ricin (RT) and abrin (AB), staphylococcal enterotoxin B (SEB), Shiga (Stx) and Shiga like (SLTx) toxins, T-2 mycotoxin (T-2), tetrodotoxin (TTX), saxitoxin (STX) and epsilon toxin (ETX). Additionally, general methods and techniques for the detection of these toxins and the organisms that produce them are analyzed and indicative ways of detection are reported separately for each toxin based on international scientific literature.

## 1. Εισαγωγή

Τόσο οι τοξίνες όσο και η τρομοκρατία σε όλες τις μορφές της, είναι έννοιες που έχουν απασχολήσει ,λόγω των συνεπειών τους, εκτεταμένα την επιστημονική κοινότητα, τα κράτη , τις τοπικές κοινωνίες και τους πολίτες .Η χρήση τοξινών για καταστροφικούς σκοπούς και οι τρομοκρατικές επιθέσεις έχουν μακρά ιστορία και ο συνδυασμός τους συνέβαλε στην εξάπλωση της βιοτρομοκρατία που αποτελεί μια διαρκής απειλή για την ανθρωπότητα.

Δυστυχώς τις τελευταίες δεκαετίες οι τρομοκρατικές επιθέσεις έχουν αυξηθεί και στις μέρες μας έφτασαν να αποτελούν τακτικό θέμα προβολής στα μέσα μαζικής ενημέρωσης .Η άνοδος ακραίων θρησκευτικών τρομοκρατικών ομάδων όπως ο ISIS και ακραίων ιδεολογικών και πολιτικών αντιλήψεων σε μια εποχή όπου οι εξελίξεις είναι ραγδαίες, οι κοινωνικές και οικονομικές ανισότητες εντείνονται , η πρόσβαση στην πληροφορία και στην επικοινωνία σε παγκόσμιο επίπεδο είναι εύκολη όπως επίσης και η πρόσβαση σε κατάλληλο εργαστηριακό εξοπλισμό και πρώτες ύλες, οι πιθανότητες χρήσης τοξινών σε επιθέσεις βιοτρομοκρατίας έχουν αυξηθεί κατακόρυφα.

Μια βιοτρομοκρατική επίθεση με χρήση τοξινών έχει μικρή πιθανότητα να συμβεί όμως καταστροφικές συνέπειες που ξεπερνούν συνήθως αυτές των συμβατικών όπλων. Οι τοξίνες είναι εκ των πλέον τοξικών ουσιών στον πλανήτη, δεν υπάρχουν για όλες αποτελεσματικά μέσα προφύλαξης και θεραπείας και δεν γίνονται αντιληπτές με τα αισθητήρια όργανα του ανθρώπου πάρα μόνο από τις σοβαρές παρενέργειές τους, που μπορεί να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμες βλάβες ή ακόμη και στο θάνατο μεμονωμένα άτομα αλλά και ευρύτερες πληθυσμιακές ομάδες.

Επειδή η πρόληψη είναι η καλύτερη θεραπεία και επιπλέον και για την θεραπεία απαιτείται διάγνωση, γεγονότα που δεν ισχύουν μόνο στην ιατρική αλλά και στην τρομοκρατία, επιτακτική είναι η ανάγκη εύρεση τρόπων ανίχνευσης των τοξινών που σχετίζονται με την βιοτρομοκρατία, τόσο για την αποτροπή της, όσο και για την γρήγορη και αξιόπιστη διάγνωση της όταν συμβεί.

## 2. Ορισμοί

### 2.1 Τρομοκρατία-τρομοκράτες

Η τρομοκρατία -ετυμολογικά προκύπτει από την σύνθεση των λέξεων τρόμος και κράτος- θα μπορούσε να οριστεί ως η «συστηματική» χρήση, ή η απειλή χρήσης, βίας που συμβαίνει ως αντίδραση, ή άσκηση πίεσης, από οργανωμένες ομάδες με πολιτικά, θρησκευτικά ή άλλα ιδεολογικά κίνητρα (ως υπόβαθρο/βάση) αλλά ακόμη και από ολόκληρους κρατικούς μηχανισμούς, εναντίον ατόμων, ομάδων ή περιουσιών, με απώτερο στόχο τις κυβερνήσεις από τις οποίες προσδοκούν κάποια αντίστοιχα (των κινήτρων) οφέλη/κέρδη. Η κάθε πράξη επ' αυτού χαρακτηρίζεται τρομοκρατική πράξη και οι επιχειρούντες αυτήν τρομοκράτες. Πάντως δεν υπάρχει κοινά αποδεκτός ορισμός της τρομοκρατίας ακόμη και μεταξύ των κρατών μελών των Ηνωμένων Εθνών.

### 2.2 Βιοτρομοκρατία

Η βιοτρομοκρατία αποτελεί μορφή τρομοκρατίας κατά την οποία οι τρομοκράτες με πρόθεση απελευθερώνουν ή διαχέονται βιολογικούς παράγοντες που αποτελούν το μέσο επίτευξης της τρομοκρατικής επίθεσης. Στους βιολογικούς παράγοντες περιλαμβάνονται μικροοργανισμοί (βακτήρια , πρωτόζωα , μύκητες ή ιοί) ή τοξίνες που μπορεί να βρίσκονται στη φυσική τους μορφή ή να έχουν τροποποιηθεί ώστε να αυξάνεται η αποτελεσματικότητα τους στην πρόκληση ασθενειών, στο να είναι ανθεκτικότερες σε φαρμακευτική αγωγή ή στη δυνατότητα τους να διαχέονται στο περιβάλλον.

Η βιοτρομοκρατία είναι ελκυστική στους τρομοκράτες ,γιατί ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες είναι σχετικά εύκολο και όχι ιδιαίτερα δαπανηρό να αποκτηθούν, μπορούν να διαδοθούν και να προκαλέσουν εκτεταμένες ζημιές αλλά και φόβο και πανικό πέρα από την πραγματικές φυσικές ζημιές. Ένα βιολογικό όπλο είναι χρήσιμο σε τρομοκράτες κυρίως ως μέσο δημιουργίας πανικό και αναστάτωση σε ένα πληθυσμό ή μια χώρα και όχι απαραίτητα ως προς τον αριθμό των απωλειών που προκαλεί.

Η βιοτρομοκρατία έχει κάποιους σημαντικούς περιορισμούς ,με κυριότερο το γεγονός ότι η παρασκευή αλλά και η χρήση ενός βιολογικού όπλου απαιτεί σχετικό γνωστικό και τεχνολογικό υπόβαθρο και πρόσβαση στις κατάλληλες πρώτες ύλες, σε αρκετές από τις οποίες υπάρχουν περιορισμοί στην χρήση και διακίνηση όπως και στα συμβατικά όπλα. Βέβαια η πρόσβαση στην πληροφορία είναι πλέον ευρέως διαθέσιμη μέσω του διαδικτύου και επιπλέον υπάρχει μεγάλος αριθμός εργαστηρίων εκ των οποίων θα μπορούσε να προμηθευτεί με παράνομο τρόπο κάποιος κρίσιμα συστατικά για την δημιουργία ενός βιολογικού όπλου. Σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εύκολο χρησιμοποιηθεί ένα βιολογικό όπλο επιλεκτικά, δηλαδή με έναν τρόπο που μόνο ο εχθρός να επηρεάζεται και όχι οι «φιλικές» προς τους τρομοκράτες δυνάμεις. Ωστόσο, η γενετική μηχανική θα μπορούσε να οπλίσει τους μελλοντικούς βιοτρομοκράτες με

ιδιαίτερα αποτελεσματικά όπλα ακόμη και για στοχευμένες επιθέσεις σε πληθυσμιακές ομάδες με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

### 2.3 Χημικό όπλο

Ο όρος χημικό όπλο αναφέρεται σε οποιαδήποτε όπλο το οποίο περιέχει τοξική χημική ουσία ή πρόδρομο αυτής και μπορεί να προκαλέσει θάνατο, τραυματισμό, προσωρινή ανικανότητα ή δυσλειτουργία των αισθήσεων μέσω της χημικής του δράσης.

### 2.4 Χημικός παράγοντας

Ο όρος χημικός παράγοντας αναφέρεται στο τοξικό τμήμα ενός χημικού όπλου. Οι χημικοί παράγοντες βάσει του τρόπου δράσης τους (π.χ. τρόπος εισόδου και επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό) κατηγοριοποιούνται αυτούς που προκαλούν ασφυξία, εξανθήματα, επιδρούν στο αίμα, στο νευρικό σύστημα και αυτούς που χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν εξεγέρσεις. Ανάμεσα στους χημικούς παράγοντες περιλαμβάνονται και οι τοξίνες.

### 2.5 Όπλα μαζικής καταστροφής

Τα όπλα μαζικής καταστροφής (weapons of mass destruction - WMD) περιλαμβάνουν πυρηνικά, ραδιενεργά, χημικά, βιολογικά ή άλλης μορφής όπλα τα οποία μπορούν να σκοτώσουν ή να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στην υγεία σε μεγάλο αριθμό ανθρώπων ή να προκαλέσουν μεγάλες καταστροφές σε υποδομές φυσικές ή ανθρωπογενείς ή στη βιόσφαιρα. Ως WMD ή ακριβέστερα MCBW (Mass Casualty Biological (toxin) Weapon) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ορισμένες τοξίνες ειδικά δε όσες έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως αερόλυμα.

### 2.6 Τοξίνες

Ο όρος τοξίνη προέρχεται από την ελληνική λέξη «Τοξικόν» και ορίζεται ως χημική ουσία που προέρχεται από μικροοργανισμούς, φυτά ή ζώα και έχει δηλητηριώδη επίδραση επί άλλων ζωντανών οργανισμών. Σε αντίθεση με άλλα «συμβατικά» όπλα που χρησιμοποιούνται από τρομοκράτες, οι τοξίνες δεν έχουν επίδραση σε αβιοτικούς παράγοντες.

Οι τοξίνες αποτελούν από τις πλέον θανατηφόρες χημικές ουσίες που γνωρίζουμε και αντιπροσωπεύουν μια συνεχή απειλή για την ανθρωπότητα ειδικά όταν χρησιμοποιούνται ηθελήμενα για να βλάψουν ανθρώπους, ζωικό ή φυτικό κεφάλαιο. Ορισμένες τοξίνες έχουν τοξικότητα πολλαπλάσια των νευροπαραλυτικών αερίων όπως το sarin που χρησιμοποιήθηκε στην τρομοκρατική επίθεση στο μετρό του Τόκιο το 1995.

Οι τοξίνες (σε απομονωμένη μορφή) αν και προέρχονται από έμβιους οργανισμούς δεν είναι έμβιες και δεν έχουν τη δυνατότητα αναπαραγωγής, για το λόγο αυτό δεν αποτελούν βιολογικό μολυσματικό, μεταδοτικό ή λοιμώδη παράγοντα όπως για παράδειγμα οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου οι τοξίνες συνυπάρχουν με τον οργανισμό που τις παράγει όπως για παράδειγμα στην τοξίνη του άνθρακα. Οι τοξίνες δεν παράγονται από τους οργανισμούς για βιοτρομοκρατία αλλά αποτελούν στοιχείο εξέλιξης με κύριο σκοπό την προστασία του οργανισμού που τις παράγει από τους θηρευτές του, παρόλα αυτά έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τους άλλους παράγοντες χημικού πολέμου όπως το ότι κατά κανόνα είναι άγευστες, άοσμες και άχρωμες.

## 2.7 Τοξινολογία

Η μελέτη της λεπτομερούς δομής ,λειτουργία, και το μηχανισμό δράσης των τοξινών καθώς και η εξεύρεση αντιδότη για αυτές ,ανήκουν στο επιστημονικό πεδίο της Τοξινολογίας, και οι σχετικοί επιστήμονες καλούνται Τοξινολόγοι.

Το επιστημονικό πεδίο της τοξινολογίας την τελευταία δεκαετία έχει διευρυνθεί σημαντικά και κυρίως προς δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη είναι η λεπτομερής μελέτη δηλητηριωδών ζώων, φυτών και μικροοργανισμών ώστε να γίνει δυνατή η αναγνώριση, ταυτοποίηση, κατανομή και ο τρόπος δράσης των τοξινών στα όργανα στόχους. Η δεύτερη είναι ανάλυση της βιοχημικής σύνθεσης, η γενομική και πρωτεομική ανάλυση των τοξινών ώστε να αποκωδικοποιηθεί η επίδραση τους με τους ζωντανούς οργανισμούς με ιδιαίτερη έμφαση στον άνθρωπο, η παραγωγή αντιδότη και η δυνατότητα χρήσης τοξινών στη φαρμακολογία.

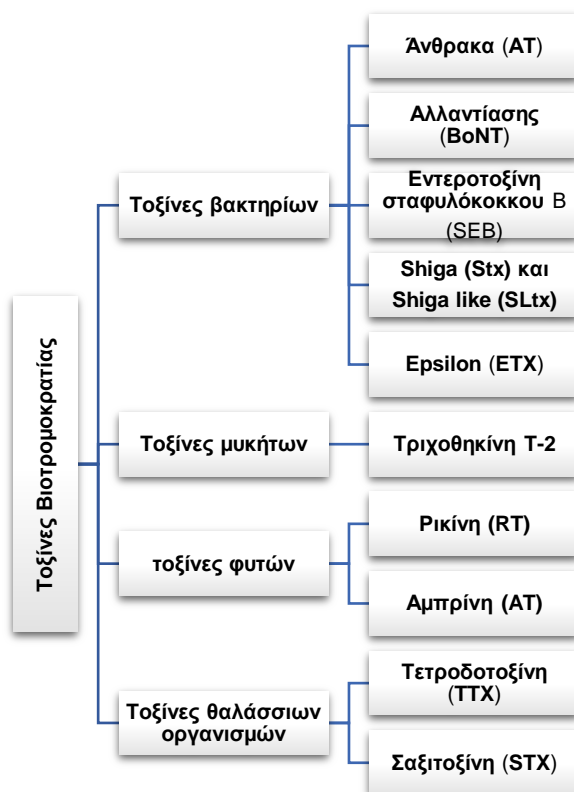
Είναι εμφανές ότι η τοξινολογία έχει ουσιώδη συσχέτιση με την τοξικολογία, τη βιοχημεία, τη μοριακή βιολογία, την ανατομία και την φαρμακολογία ενώ μια έμμεση συσχέτιση προκύπτει με τις εγκληματολογικές επιστήμες όταν οι τοξίνες χρησιμοποιούνται για εγκληματικούς σκοπούς όπως τρομοκρατικές επιθέσεις.

Λόγω των σημαντικών επιπτώσεων από θανάτους και μόνιμες βλάβες στον άνθρωπο και στα ζώα που οφείλονται σε τοξίνες και των προοπτικών χρήσεως τοξινών για την παραγωγή φαρμάκων ένα ταχέως αναπτυσσόμενο κομμάτι της τοξινολογίας είναι η κλινική τοξινολογία.

### 3. Κατηγοριοποίηση τοξινών

#### 3.1 Κατηγοριοποίηση με βάση τους οργανισμούς προέλευσης

Ανάλογα με το είδος του οργανισμού που παράγει-περιέχει-εκκρίνει συγκεκριμένη τοξίνη, οι τοξίνες που σχετίζονται με βιοτρομοκρατία, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τοξίνες βακτηρίων, μυκήτων, φυτών και θαλασσίων οργανισμών-μικροοργανισμών. Η κατηγοριοποίηση δεν είναι απόλυτη καθώς υπάρχουν τοξίνες που παράγονται από διαφορετικές κατηγορίες οργανισμών.



Σχήμα 1. Κατηγοριοποίηση κύριων τοξινών σχετιζόμενων με βιοτρομοκρατία ανάλογα με το κύριο οργανισμό προέλευσης τους.

#### 3.2 Κατηγοριοποίηση με βάση τα κύτταρα-στόχους

Ο τρόπος δράσης των τοξινών στο ανθρώπινο οργανισμό είναι κατά κανόνα κυτταροτοξικός ή νευροτοξικός. Οι κυτταροτοξικές τοξίνες ή κυτταροτοξίνες προκαλούν κυτταρική καταστροφή και κατ' επέκταση δυσλειτουργία ή/και καταστροφή σε ιστούς και όργανα και οι νευροτοξικές τοξίνες ή νευροτοξίνες επηρεάζουν την ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος.

Οι κυτταροτοξίνες δυνητικά έχουν επίδραση σε όλα τα είδη κυττάρων στο σώμα όμως ο βαθμός της βλάβης που προκαλούν είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, όπως ο τρόπος εισόδου τους στον οργανισμό, η δυνατότητα μεταφοράς τους σε άλλα όργανα και ιστούς, το χημικό περιβάλλον και το είδος των κυττάρων στα οποία επιδρούν. Οι κυτταροτοξίνες

προκαλούν κυτταρική καταστροφή ή παρεμβολή σε μεταβολικές διεργασίες όπως η κυτταρική αναπνοή και η σύνθεση πρωτεϊνών.

Οι νευροτοξίνες έχουν επίδραση στους νευρώνες και συνήθως στο περιφερειακό νευρικό σύστημα και ταξινομούνται περαιτέρω με βάση το μηχανισμό με τον οποίο δημιουργούν το τοξικό τους αποτέλεσμα σε τέσσερις υποκατηγορίες, τις προσυναπτικές, τις μετασυναπτικές, τις τοξίνες δέσμησης διαύλου ιόντων και τις ιονοφόρες.

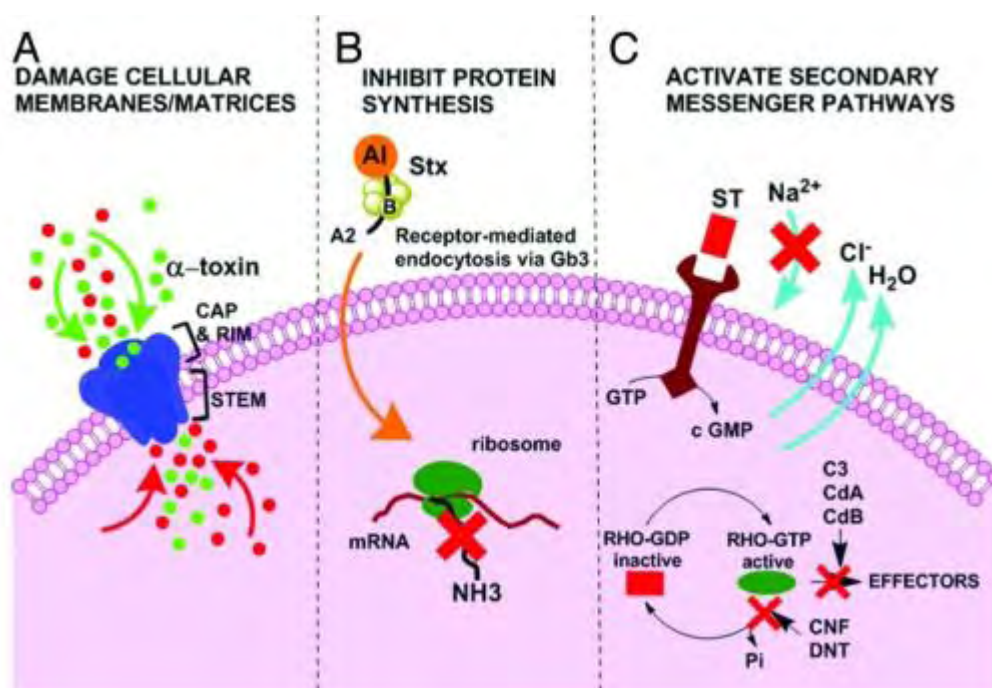
### 3.3 Κατηγοριοποίηση με βάση τον τρόπο δράσης

Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους οι τοξίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

A) Τοξίνες που προσδένονται και προκαλούν βλάβες ή και διάρρηξη στην πλασματική μεμβράνη και τα υποστρώματα του κυττάρου-στόχου.

B) AB τοξίνες, όπου η A υπομονάδα έχει ενζυματική δραστηριότητα και η B υπομονάδα προσδένεται στο κύτταρο-στόχο και επιτρέπει την τοξίνη να εισχωρήσει σε αυτό και να εμποδίσει μια βιοχημική δράση όπως να μπλοκάρει την παραγωγή κάποιας πρωτεΐνης.

Γ) Τοξίνες που προσδένονται στην επιφάνεια του κυττάρου-στόχου μέσω υποδοχέων της πλασματικής του μεμβράνης και τροποποιούν τη φυσιολογία του επηρεάζοντας την ενδοκυτταρική σηματοδότηση όπως για παράδειγμα νευροτοξίνες.



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση τρόπου δράσης τοξινών.

Ο στόχος των ανωτέρω κατηγοριών τοξινών στο κύτταρο του ξενιστή, περιλαμβάνει την ακτίνη, την Rho οικογένεια των σηματοδοτικών πρωτεϊνών GTP, το ενδοκυτταρικό σύστημα αποσύνθεσης των πρωτεϊνών, το ενδοκυτταρικό σύστημα μετάφρασης της γενετικής πληροφορίας, το μηχανισμό SNARE και την σηματοδότηση cAMP.

### 3.4 Κατηγοριοποίηση με βάση την απελευθέρωση τους από τον παραγόμενο οργανισμό

Οι τοξίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τον αν απελευθερώνονται ή όχι από τον οργανισμό που τις παράγει σε ενδοτοξίνες και εξωτοξίνες.

Οι ενδοτοξίνες είναι πολύπλοκης δομής φωσφολιποπολυσακχαρίτες ανθεκτικές στη θερμοκρασία που αποτελούν κομμάτι των κυτταρικών τοιχωμάτων ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών κυρίως αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Οι συγκεκριμένες τοξίνες δεν διαχέονται στον εξωκυττάριο χώρο και παραμένουν ενωμένες με το κύτταρο από το οποίο παρήχθησαν έως το θάνατό και την κυτταρική του λύση. Είναι υπεύθυνες για συμπτώματα όπως πυρετός, διάρροια, πτώση πίεσης του αίματος και μια σειρά άλλων συμπτωμάτων που εξαρτώνται από το είδος του παθογόνου μικροοργανισμού και την κατάσταση του μολυσμένου ατόμου.

Οι εξωτοξίνες είναι στην πλειοψηφία τους μεσαίου έως μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες που τροποποιούνται ή καταστρέφονται δομικά με τη θερμότητα, σημαντικά δραστικότερες από τις ενδοτοξίνες. Παράγονται και εκκρίνονται από παθογόνα βακτήρια αρνητικών ή θετικών κατά Gram και με την κυκλοφορία του αίματος διασπείρονται στο εσωτερικό του ανθρωπίνου οργανισμού και ανάλογα με τη φύση τους προσβάλλουν συγκεκριμένα όργανα στόχους. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η εξαιρετικά μεγάλη τους δραστικότητα σε εξαιρετικά μικρή ποσότητα.

### 3.5 Θεσμική κατηγοριοποίηση βιολογικών παραγόντων-τοξινών

#### 3.5.1 Ευρωπαϊκή Ένωση

Οι βιολογικοί παράγοντες ανάλογα με το κίνδυνο για την δημόσια υγεία κατηγοριοποιούνται σε 4 κατηγορίες Ευρωπαϊκή ντιρεκτίβα 2000/54/EC<sup>1</sup>:

-*Κατηγορία 1* → Είναι απίθανο να προκαλέσουν βλάβη.

-*Κατηγορία 2* → Είναι πιθανό να προκαλέσουν βλάβη στον άνθρωπο και είναι επικίνδυνοι. Δεν είναι πιθανή η εξάπλωση τους και υπάρχει αποτελεσματικός τρόπος προφύλαξης και αντιμετώπισης.

-*Κατηγορία 3* → Μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή βλάβη στον άνθρωπο και αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Ενέχουν μεσαίο ρίσκο εξάπλωσης και συνήθως υπάρχει αποτελεσματικός τρόπος προφύλαξης και αντιμετώπισης.

- *Κατηγορία 4* → Μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή βλάβη στον άνθρωπο και αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Ενέχουν υψηλό ρίσκο εξάπλωσης και συνήθως δεν υπάρχει αποτελεσματικός τρόπος προφύλαξης και αντιμετώπισης.



### 3.5.2 Centers for disease control (CDC)

Κατηγοριοποίηση βιολογικών παραγόντων ανάλογα με το κίνδυνο που ενέχει η χρήση τους σε βιοπόλεμο -βιοτρομοκρατία σύμφωνα με το CDC (Centers for Disease Control) με έδρα την Ατλάντα των ΗΠΑ και τον Ευρωπαϊκό ECDC με έδρα τη Στοκχόλμη της Σουηδίας. Στη συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση υπάρχουν 3 κατηγορίες (A ,B ,C) ανάλογα με το πόσο εύκολα εξαπλώνονται, τη σοβαρότητα της νόσου και τη συχνότητα των θανάτων που προκαλούν<sup>2</sup>.

- **Κατηγορία A** → Ύψιστης προτεραιότητας. Υψηλής διασποράς, μολυσματικότητας, μεταδοτικότητας, θνησιμότητας. Πιθανότητα σοβαρού αντίκτυπου στην υγεία μεγάλων πληθυσμών, πρόκλησης αναστάτωσης και πανικού στην κοινωνία. Επιβαρύνουν σημαντικά τη δημόσια υγεία και απαιτούν ειδικά μέτρα , παρεμβάσεις και ετοιμότητα από τους φορείς δημόσιας υγείας . Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι εξής βιολογικοί παράγοντες: **Anthrax (*Bacillus anthracis*)**, **Botulism (*Clostridium botulinum toxin*)** , **Plague (*Yersinia pestis*)**, **Smallpox (*variola major*)** , **Tularemia (*Francisella tularensis*)** , **Viral hemorrhagic fevers (*filoviruses [e.g., Ebola, Marburg]* , *arenaviruses [e.g., Lassa, Machupo]*)**

- **Κατηγορία B** → Υψηλής προτεραιότητας μετά την κατηγορία A. Μεσαίας αλλά εύκολης διασποράς .Προκαλούν σοβαρότατες βλάβες στα θύματα αλλά είναι λιγότερο θανατηφόρα σε σχέση με αυτούς της κατηγορίας Απαιτούν ενισχυμένα μέτρα επιτήρησης από τους φορείς δημόσιας υγείας. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι εξής βιολογικοί παράγοντες: **Brucellosis (*Brucella species*)** , **Epsilon toxin of *Clostridium perfringens*** , **απειλές στην ασφάλεια των τροφίμων (π.χ. *Salmonella species*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella*)** , **Glanders (*Burkholderia mallei*)** , **Melioidosis (*Burkholderia pseudomallei*)** , **Psittacosis (*Chlamydia psittaci*)** , **Q fever (*Coxiella burnetii*)** , **Ricin toxin from *Ricinus communis* (castor beans)** , **Staphylococcal enterotoxin B** , **Typhus fever (*Rickettsia prowazekii*)** , **Viral encephalitis (*alphaviruses [e.g., Venezuelan equine encephalitis, eastern equine encephalitis, western equine encephalitis]*)** , **απειλές στην ασφάλεια του νερού (π.χ. *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*)**.

- **Κατηγορία C** → Περιλαμβάνουν αναδυόμενους παθογόνους παράγοντες που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για μαζική διασπορά στο μέλλον, λόγω της διαθεσιμότητας, ευκολίας παραγωγής. και διασποράς και είναι δυνατόν να προκαλέσουν νοσηρότητα και θνησιμότητα και να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι εξής βιολογικοί παράγοντες: ***Nipah virus* και *hantavirus***.

### 3.5.3 Γκρουπ Αυστραλίας (AG)

Ακόμη υπάρχει κατηγοριοποίηση σύμφωνα με εθνικές λίστες και διεθνείς λίστες όπως η λίστα του γκρουπ της Αυστραλίας (AG), στην οποία συμμετέχει και η Ελλάδα από το 1985, για να υπάρχει εναρμονισμός στη λήψη μέτρων μεταξύ των μελών της ώστε μεταξύ άλλων να μην εξαγονται και να μην διακινούνται ανεξέλεγκτα βιολογικοί παράγοντες κινδύνου για ανθρώπους και ζώα και περιλαμβάνει περισσότερους παράγοντες και διαφορετική κατηγοριοποίηση.

Λίστα AG<sup>3</sup>:

**Ιοί:** African horse sickness virus, African swine fever virus, Andes virus, Avian influenza virus, Bluetongue virus, Chapare virus, Chikungunya virus, Choclo virus, Classical swine fever virus (Hog cholera virus), Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Dobrava-Belgrade virus, Eastern equine encephalitis virus, Ebolavirus: all members of the Ebolavirus genus, Foot-and-mouth disease virus, Goatpox virus, Guanarito virus, Hantaan virus, Hendra virus (Equine morbillivirus), Japanese encephalitis virus, Junin virus, Kyasanur Forest disease virus, Laguna Negra virus, Lassa virus, Louping ill virus, Lujo virus, Lumpy skin disease virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Machupo virus, Marburgvirus: all members of the Marburgvirus genus, Monkeypox virus, Murray Valley encephalitis virus, Newcastle disease virus, Nipah virus, Omsk hemorrhagic fever virus, Oropouche virus, Pestes-des-petits-ruminants virus, Porcine Teschovirus, Powassan virus, Rabies virus and other members of the Lyssavirus genus, Reconstructed 1918 influenza virus, Rift Valley fever virus, Rinderpest virus, Rocio virus, Sabia virus, Seoul virus, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-related coronavirus), Sheeppox virus, Sin Nombre virus, St. Louis encephalitis virus, Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus; Aujeszky's disease), Swine vesicular disease virus, Tick-borne encephalitis virus (Far Eastern subtype), Variola virus, Venezuelan equine encephalitis virus, Vesicular stomatitis virus, Western equine encephalitis virus, Yellow fever virus.

**Βακτήρια:** *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Burkholderia mallei* (*Pseudomonas mallei*), *Burkholderia pseudomallei* (*Pseudomonas pseudomallei*), *Chlamydia psittaci* (*Chlamydophila psittaci*), *Clostridium argentinense* (formerly known as *Clostridium botulinum* Type G), **botulinum neurotoxin producing strains**, ***Clostridium baratii***, **botulinum neurotoxin producing strains**, ***Clostridium botulinum***, ***Clostridium butyricum***, **botulinum neurotoxin producing strains**, ***Clostridium perfringens***, **epsilon toxin producing types**, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* ("strain F38"), *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC (small colony), *Rickettsia prowazekii*, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Typhi* (*Salmonella typhi*), **Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) of serogroups O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145, O157, and other shiga toxin producing serogroups**, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.

**Τοξίνες:** **Abrin**, **Aflatoxins**, **Botulinum toxins**, **Cholera toxin**, ***Clostridium perfringens* alpha, beta 1, beta 2, epsilon and iota toxins**, **Conotoxins**, **Diacetoxyscirpenol**, **HT-2 toxin**, **Microcystins** (**Cyanoginosins**), **Modeccin**, **Ricin**, **Saxitoxin**, **Shiga toxins (shiga-like toxins, verotoxins, and verocytotoxins)**, ***Staphylococcus aureus* enterotoxins**, **hemolysin alpha toxin**, and **toxic shock syndrome toxin** (formerly known as *Staphylococcus enterotoxin F*), **T-2 toxin**, **Tetrodotoxin**, **Viscum** (***Viscum album* lectin 1**), **Volkensin**.

**Μύκητες:** *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*

#### 3.5.4 Λίστα CIA

Επιπλέον μια ακόμη λίστα είναι αυτή της CIA (Κεντρική Υπηρεσία Πληροφοριών των ΗΠΑ) η οποία αναφέρεται στους παράγοντες CBRN (Chemical, biological, radiological and nuclear) που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από τρομοκράτες. Στην συγκεκριμένη λίστα, όσον

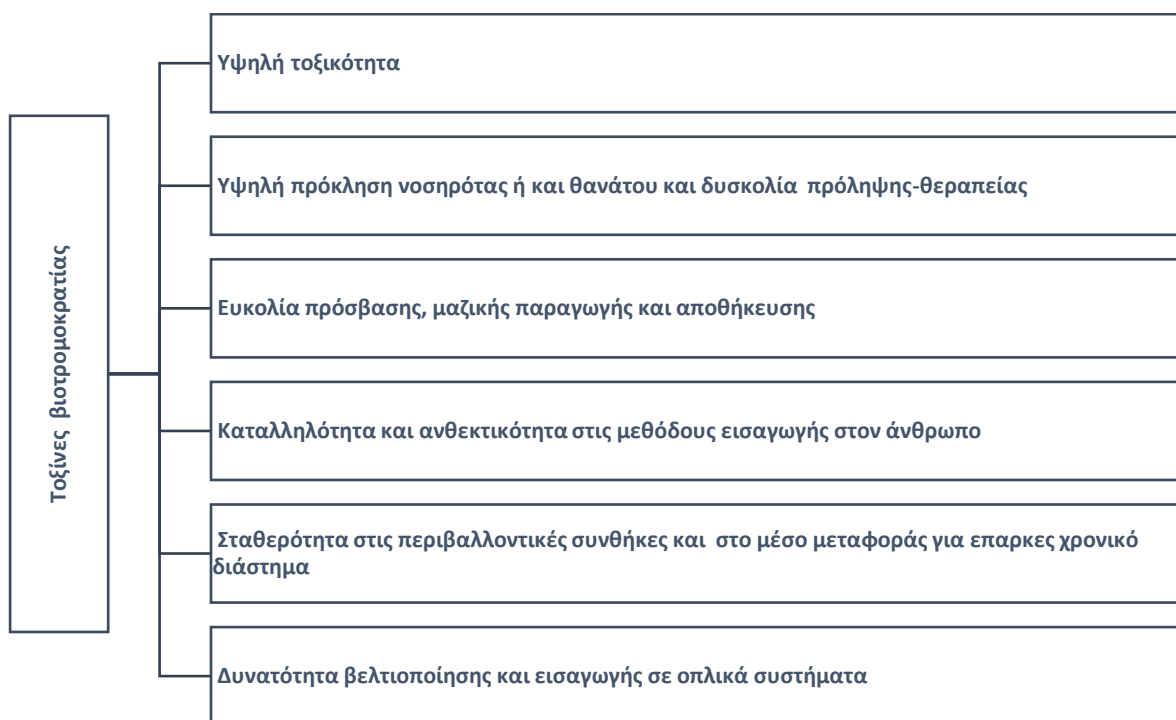
αφορά τους βιολογικούς παράγοντες περιλαμβάνονται ο **άνθρακας**, η **τοξίνη της αλλαντίασης** και η **ρικίνη**<sup>4</sup>.

Σε όλες τις παραπάνω λίστες ελήφθησαν υπόψιν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Η παθογένεια του παράγοντα.
- Ο τρόπος μετάδοσης ή μόλυνσης και το εύρος των ξενιστών.
- Η διαθεσιμότητα αποτελεσματικών μέτρων προφύλαξης (π.χ. εμβόλια).
- Η διαθεσιμότητα αποτελεσματικών μέτρων θεραπείας (π.χ. φαρμακευτική αγωγή).

Ο μηχανισμός δράσης των τοξινών υπαγορεύει τόσο τον τρόπο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως όπλα βιοτρομοκρατίας όσο και τον τρόπο που μπορούμε να υπερασπιστεί από αυτές. Στον παρακάτω σχήμα αναγράφονται τα κύρια χαρακτηριστικά της βέλτιστης τοξίνης για χρήση σε βιοτρομοκρατία.

Για την παρούσα εργασία λαμβάνοντας υπόψιν τους βιολογικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν στις ανωτέρω λίστες και την εκτεταμένη βιβλιογραφία (βιβλία, επιστημονικά άρθρα, διαδικτυακές πηγές) σχετικά με τις τοξίνες και την βιοτρομοκρατία, επιλέχθηκαν οι 10 πλέον πιθανοί τύπου τοξινών για χρήση σε τρομοκρατική επίθεση με τις 3 πρώτες στην ταξινόμηση δηλαδή την τοξίνη του άνθρακα, την τοξίνη της αλλαντίασης και τη ρικίνη να εμφανίζουν την υψηλότερη πιθανότητα χρήσης για λογούς που αναλύονται.



Σχήμα 3. Χαρακτηριστικά τοξινών κατάλληλων για βιοτρομοκρατία

## 4. Ιστορικά στοιχεία βιοπολέμου -βιοτρομοκρατίας

### 4.1. Αρχαιότητα- Μυθολογία - Μεσαίωνας

Τα βιολογικά όπλα είναι γνωστά από την αρχαιότητα και αναφέρονται ακόμη και σε μύθους. Οι μύθοι εμπεριέχουν συνήθως και πραγματικά στοιχεία και λαμβάνοντας αυτό υπόψιν, ο πρώτος που ίσως χρησιμοποίησε τέτοιου είδους όπλα ήταν ο Ηρακλής. Κατά τον άθλο του εναντίων της Λερναίας Ύδρας χρησιμοποίησε για να την σκοτώσει, βέλη εμπλουτισμένα με ρετσίνι στα οποία έβαλε φωτιά. Επίσης, μετά τον θάνατο της Λερναίας Ύδρας πήρε το άψυχο σώμα της, το έσχισε, έβγαλε από μέσα την χολή, και στο δηλητήριό της βούτηξε τις αιχμές από τα βέλη του.

Πριν χιλιάδες χρόνια γηγενείς στην Νότια Αμερική χρησιμοποιούσαν βέλη που είχαν φτιάξει από το δηλητηριώδες φυτό *Curare* και επιπλέον βέλη βουτηγμένα σε τοξίνες δηλητηριωδών βατράχων (*poison-dart frogs*) κυρίως για κυνήγι. Παρόμοιες τοξίνες χρησιμοποιήθηκαν και στην Αφρική.

Η χρήση βιοόπλων για στρατιωτική χρήση χρονολογείται τουλάχιστον στον 6<sup>ο</sup> π.Χ αιώνα όπου οι Ασσύριοι στρατιώτες μόλυναν τα πηγάδια των εχθρών τους με σίκαλη που περιείχε το μύκητα *ergot*. Επίσης τον 6<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. σύμφωνα με τον Ηρόδοτο οι Σκύθες ιππείς χρησιμοποιούσαν δηλητηριασμένα βέλη<sup>5</sup>, το 590 π.Χ. δηλητηριάστηκε το πόσιμο νερό της Κίρρας με ελλέβορο, ενώ το 326 π.Χ. όταν ο Μ. Αλέξανδρος πολιορκούσε την Αρματηλία, οι αμυνόμενοι είχαν επαλείψει τα όπλα τους με θανατηφόρο δηλητήριο, που παρήγαγαν από φίδια.

Στην αρχαία Ελλάδα «Τοξικόν» σήμαινε το δηλητηριώδες βέλος του τόξου και από εκεί προέκυψαν οι λέξεις τοξίνη και τοξικολογία. Ως δηλητήριο για το βέλος χρησιμοποιούνταν το φυτό Ακόνιτο και η πρακτική αυτή της χρήσης δηλητηριασμένων βελών συνεχίστηκε στο μεσαίωνα αλλά και έως τον 17ο αιώνα στην Ισπανία και Πορτογαλία. Η λέξη «*toxica*» προέρχεται από τη λέξη «*taxus*», καθώς τα πρώτα δηλητηριώδη βέλη εμποτιζόνταν με μια θανατηφόρο ουσία που υπάρχει στο τάξος, ένα είδος ελάτου. Ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοόπλων στην αρχαιότητα χρησιμοποιήθηκαν το φυτό ελλέβορος, το οποίο χρησιμοποιούταν και ως φαρμακευτικό βότανο, ορισμένα είδη δηλητηριωδών σκαθαριών υψηλής τοξικότητας όπως τα «σκαθάρια φουσκάλες», και τα σκαθάρια «σταφυλίνους», βάτραχοι που εκκρίνουν στο δέρμα τους δηλητήριο όπως ο βάτραχος - δηλητηριώδες βέλος (*poison dart frogs*), σπονδυλική στήλη των σαλαχιών, νεκρές οχιές και το δηλητηριό τους, ακόνιτο.

Ο Καρχηδόνιος στρατηγός Αννίβας χρησιμοποιούσε δοχεία με δηλητηριώδη φίδια τα οποία εκτόξευε προς τα αντίπαλα πλοία κατά τη διάρκεια της ναυμαχίας εναντίον του Ευρυμέδωνα της Περγάμου. Στο Μεσαίωνα, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η επιδημία του

«Μαύρου Θανάτου» (βουβωνική πανώλη) ξεκίνησε από τον πολιορκία της Κριμαϊκής πόλης Καρφα από τους Τατάρους το 1346 μ.Χ. κατά την οποία εκσφενδόνιζαν πτώματα από νεκρούς που πέθαναν από πανώλη με την βοήθεια καταπελτών.

#### 4.2. Νεότερη Ιστορία

Στην νεότερη ιστορία, το 1889, κατά τη διάσκεψη της Χάγης, καταδικάστηκε η χρήση πολεμικών αερίων και επιβλήθηκε η απαγόρευσή τους. Ωστόσο, επίσημη χρήση των χημικών ουσιών εν καιρώ πολέμου έγινε από τους Γερμανούς κατά τον Α΄ Παγκόσμιο Πόλεμο.

Κατά τη διάρκεια του Β παγκοσμίου πολέμου Ιάπωνες επιστήμονες στην μονάδα 731 έκαναν έρευνες για τη χρήση τετροδοτοξίνης. Στην κατεχόμενη από τους Ιάπωνες Ματζουρία, η μονάδα 731 του Ιαπωνικού στρατού έκανε πειράματα μικροβιακού πολέμου σε Κινέζους πολίτες, χρησιμοποιώντας βακτήρια χολέρας, άνθρακα, τύφου και πανώλης. Μετά τον Β παγκόσμιο πόλεμο υπήρξαν περιστατικά χρήσης Ρικίνης σε δολοφονικές επιθέσεις. Μετά τη λήξη του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου, τα πειράματα για χρήση βιολογικών όπλων συνεχίστηκαν στις ΗΠΑ και στην πρώην ΕΣΣΔ.

Στα νεότερα χρόνια τα περιστατικά χρήσης βιολογικών παραγόντων και ειδικά τοξινών αυξήθηκαν, ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένα στον πίνακα 1.

Έτος 1985	Περιστατικό Το Ιράκ ξεκίνησε πρόγραμμα επίθεση με όπλα που περιέχουν βιολογικούς παράγοντες παράγοντας άνθρακα, τοξίνη αλλαντίασης και αφλατοξίνη. Αποκαλύφθηκε ότι υπήρχαν όπλα, πύραυλοι Scud, ρουκέτες 122mm και βλήματα πυροβολικού οπλισμένα με βιολογικούς παράγοντες
1994	Μέλη της Ιαπωνικής αίρεσης Aum Shinrikyo προσπάθησαν να απελευθερώσουν άνθρακα σε μορφή σπρέι από της κορυφές κτηρίων στο Τόκυο
1995	Δύο μέλη στρατιωτικής ομάδας στη Μινεσότα καταδικάστηκαν για κατοχή Ρικίνης την οποία είχαν παράγει οι ίδιοι με σκοπό να την χρησιμοποιήσουν ενάντια σε τοπικά κυβερνητικά στελέχη.
2001	Βάκιλοι άνθρακα ταχυδρομήθηκαν σε ΜΜΕ και γραφεία κυβερνητικών στελεχών. Τέσσερις άνθρωποι πέθαναν.
2002	Έξι άτομα συνελήφθησαν στο Μάντσεστερ της Αγγλίας καθόσον είχαν μετατρέψει το διαμέρισμά τους σε εργαστήριο παραγωγής Ρικίνης
2003	Η Βρετανική αστυνομία σε έφοδο σε δύο κατοικίες στο Λονδίνο βρήκε ίχνη Ρικίνης και η έρευνα οδήγησε στο συμπέρασμα πιθανής ανάμιξης Τσετσένων αυτονομιστών που είχαν σχέδιο να επιτεθούν με Ρικίνη στην Ρώσικη πρεσβεία. Ακολούθως έγιναν αρκετές συλλήψεις.
2004	Τρία κτήρια γραφείων γερουσιαστών στις ΗΠΑ εκκενώθηκαν καθόσον βρέθηκε Ρικίνη σε γραμματοκιβώτια του Γερούσιαστή Bill Fris.

Πίνακας 1. Παραδείγματα περιστατικών αναδυόμενης βιοτρομοκρατίας με χρήση τοξινών <sup>6</sup>

### 4.3 Συνθήκη Γενεύης - Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC)

Μετά την υπογραφή της Συνθήκης της Γενεύης το 1925 για τα χημικά και τα βιολογικά όπλα, η χρήση τους είχε απαγορευθεί, αλλά όχι και η αποθήκευση ή η ανάπτυξή τους. Ως αποτέλεσμα των παρατεταμένων προσπαθειών της διεθνούς κοινότητας για τη θέσπιση ενός νέου μέσου το οποίο θα επέτρεπε τη συμπληρώνει του συνθήκης της Γενεύης του 1925, προέκυψε η σύμβαση για την απαγόρευση της ανάπτυξης, της παραγωγής και της αποθήκευση των βακτηριολογικών (βιολογικών) και τοξινικών όπλων και της καταστροφής τους, γνωστότερη ως Σύμβαση για τα Βιολογικά Όπλα (BWC), που άνοιξε προς υπογραφή στις 10 Απριλίου 1972 στο Λονδίνο, τη Μόσχα και την Ουάσιγκτον. Η BWC ήταν η πρώτη πολυμερής συμφωνία αφοπλισμού για την απαγόρευση της παραγωγής και της χρήσης μιας ολόκληρης κατηγορίας όπλων η οποία τέθηκε σε ισχύ στις 26 Μαρτίου 1975. Έκτοτε έχουν υπάρξει μια σειρά συνεδρίων για τα βιολογικά όπλα και τα όπλα τοξινών (Biological and Toxin Weapons Convention, -BTWC) το 2016 συνολικά 178 κράτη με το πιο πρόσφατο τη Γουινέα έχουν δεσμευτεί στην εφαρμογή 8 άρθρων που συνοψίζονται στα εξής<sup>7</sup>:

**Άρθρο I:** Ποτέ και κάτω από οποιοσδήποτε συνθήκες να μην αποκτούν και να μην διατηρούν βιολογικά όπλα

**Άρθρο II:** Να καταστρέψουν ή να εκτρέψουν σε ειρηνικούς σκοπούς βιολογικά όπλα και συναφείς πόρους πριν από την ένταξή τους.

**Άρθρο III:** Να μην μεταβιβάσουν ή με οποιονδήποτε τρόπο να βοηθήσουν, να ενθαρρύνουν ή να παρακινήσουν οποιονδήποτε άλλον να αποκτήσει ή να διατηρήσει βιολογικά όπλα.

**Άρθρο IV:** Να λάβουν τα απαραίτητα εθνικά μέτρα για την εφαρμογή των διατάξεων της BWC εντός της επικράτειας τους.

**Άρθρο IV:** Να διεξάγουν διμερείς και πολυμερείς διαβουλεύσεις για την επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων με την εφαρμογή της BWC.

**Άρθρο VI:** Να ζητήσουν από το Συμβούλιο Ασφαλείας των Ηνωμένων Εθνών να διερευνήσει εικαζόμενες παραβιάσεις της BWC και να συμμορφωθούν με τις μεταγενέστερες αποφάσεις του.

**Άρθρο VII:** Να βοηθήσει τα κράτη που έχουν εκτεθεί σε κίνδυνο ως αποτέλεσμα παραβίασης του BWC.

**Άρθρο X:** Να κάνουν όλα τα παραπάνω με τρόπο που ενθαρρύνει τις ειρηνικές χρήσεις της βιολογίας και της τεχνολογίας.

Τα συμβαλλόμενα κράτη της BTWC προσπαθούν να διασφαλίσουν την αποτελεσματικότητά της παρά το γεγονός ότι υφίστανται συνεχείς αλλαγές στην επιστήμη, την τεχνολογία, την πολιτική και την ασφάλεια από τότε που τέθηκε σε ισχύ. Όλα τα κράτη μέρη και οι εμπειρογνώμονες συνεδριάζουν σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα αλλά και εκτάκτως εάν υπάρξει σοβαρή αιτία, για να επανεξετάσουν τη λειτουργία της BTWC. Μεταξύ αυτών των διασκέψεων, τα συμβαλλόμενα κράτη έχουν επιδιώξει διάφορες δραστηριότητες και



πρωτοβουλίες για την ενίσχυση του αποτελεσματικότητας και τη βελτίωση της εφαρμογής της σύμβασης.

## 5. Πιθανοί τρόποι χρήσης τοξινών από τρομοκράτες

Λόγω χρήσης υψηλής τεχνολογίας και τεχνογνωσίας στην παραγωγή, απομόνωση και χρήση τοξινών βιολογικής προέλευσης η απειλή βιολογικού πολέμου και βιοτρομοκρατίας είναι στις μέρες μας υψηλότερη σε σχέση με χημικό πόλεμο και τρομοκρατία με χρήση χημικών μέσων.

Για να υπάρξει μια επιτυχής βιοτρομοκρατική επίθεση οι τρομοκράτες θα πρέπει αφού αποκτήσουν ή παράγουν την τοξίνη, να την επεξεργαστούν με τέτοιο τρόπο ώστε χωρίς να αλλοιώσουν τη δράση της να μπορέσουν να την εισάγουν στους ανθρώπους- πληθυσμό στόχο με κατάλληλο τρόπο και σε επαρκείς ποσότητες για να προκληθεί ασθένεια ή θάνατος.

Οι τρόποι εισόδου των τοξινών στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μέσω εισπνοής, μέσω κατάποσης, δερματικά μέσω ασυνεχειών του δέρματος (π.χ. τραύματα) και περιοχών που δεν καλύπτονται από δέρμα (π.χ. μάτια) και τέλος με ένεση ή γενικότερα είσοδο στον οργανισμό με τεχνικό μέσο.



Εικόνα 1. Μόλυνση με εισπνοή



Εικόνα 2. Μόλυνση με κατάποση



Εικόνα 3. Δερματική μόλυνση



Εικόνα 4. Μόλυνση με ένεση

Οι αναφερόμενες στην παρούσα εργασία τοξίνες, λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων τους, δεν είναι όλες κατάλληλες για χρήση με όλους τους ανωτέρω τρόπους και επιπλέον η αποτελεσματικότητά τους διαφέρει και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντικά σε σχέση με το πώς εισάγονται στον οργανισμό. Η είσοδος των τοξινών μέσω εισπνοής και μέσω κατάποσης αποτελούν τους κυριότερους τρόπους όταν στόχος είναι να επηρεάσουν μεγάλο

αριθμό ανθρώπων, όμως ένα τρομοκρατικό χτύπημα μπορεί να στοχεύει και σε μεμονωμένα άτομα ή μικρές ομάδες ατόμων.

Όσον αφορά την εισπνοή, δεδομένου ότι οι τοξίνες στην πλειονότητά τους δεν είναι πτητικές και με σπάνιες εξαιρέσεις (π.χ. T2 μυκοτοξίνη - τριχοθηκίνες), δεν επηρεάζουν άμεσα την επιδερμίδα, ένας επιτιθέμενος θα πρέπει να εκθέσει τον πληθυσμό στόχο κυρίως με τη μορφή αεροζόλ, επιτρέποντας επαφή με τις πιο ευάλωτες εσωτερικές επιφάνειες του πνεύμονα. Επιθέσεις αερολύματος έχουν δύο σημαντικές πλεονεκτήματα:

- Τα σωματίδια της τοξίνης διασπείρονται στην ατμόσφαιρα και παρασυρόμενα από τον άνεμο, μπορεί να διασπαρθούν σε μεγάλη έκταση.
- Πολλές από τις παρενέργειες των τοξινών είναι περισσότερο σοβαρές όταν εξαπλωθούν μέσω αερολύματος στην αναπνευστική οδό.

Για μέγιστη αποτελεσματικότητα είναι γενικά αποδεκτό ότι τα σωματίδια που περιέχουν την τοξίνη θα πρέπει να είναι στην κλίμακα μεγέθους από 1 έως 10 μm. Μεγαλύτερα σωματίδια θα καθιζάνουν από τον αέρα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ μικρότερα σωματίδια θα τείνουν να αποβάλλεται από τους πνεύμονες. Ευτυχώς δεν είναι όλες οι τοξίνες κατάλληλες λόγω φυσικοχημικών ιδιοτήτων ώστε να εισαχθούν σε μορφή αεροζόλ και επίσης η μαζική χρήση ψεκασμού απαιτεί σημαντικές ποσότητες τοξίνης, αφού ελάχιστο ποσοστό θα καταφέρει να εισχωρήσει σε ανθρώπινο οργανισμό, κάτι που δεν είναι εφικτό για τις περισσότερες τοξίνες λόγω των δυσκολιών στην παραγωγή και εξαγωγή τους από τους οργανισμούς που τις παράγουν.

Όσον αφορά την κατάποση, αρκετές τοξίνες θα μπορούσαν να εισαχθούν σε τρόφιμα, ποτά και να σε πόσιμο νερό. Σημαντικό ρόλο εδώ παίζει η διαλυτότητα της κάθε τοξίνης σε τρόφιμα και ποτά, η σταθερότητα της σε υψηλές θερμοκρασίες όταν πρόκειται για τρόφιμα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία αλλά και η λειτουργικότητα τους στο pH και τις λοιπές φυσικοχημικές ιδιότητες του τροφίμου ή ποτού.

Στην δερματική μόλυνση, ελάχιστες τοξίνες θα μπορούσαν να διεισδύσουν το δέρμα που λόγω της δομής του αποτελεί αποτελεσματικό φραγμό ανάμεσα στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Κίνδυνος υπάρχει στην είσοδο τοξίνης (όπως η τοξίνη του άνθρακα) από κάποια ασυνέχεια του δέρματος όπως π.χ. ένα τραύμα και από σημεία που δεν καλύπτονται από δέρμα όπως π.χ. τα μάτια. Για τις περισσότερες τοξίνες η δερματική έκθεση έχει μειωμένα ή ελάχιστα συμπτώματα και παρενέργειες σε σχέση με την είσοδο της τοξίνης από την αναπνευστική οδό ή μέσω κατάποσης.

Όσον αφορά την μόλυνση με ένεση ή εν γένει με κάποιο αιχμηρό αντικείμενο που θα διαπεράσει το δέρμα, όλες σχεδόν τοξίνες είναι δραστικές με αυτό τον τρόπο χορήγησης. Μια τέτοια δράση θα είχε νόημα σε τρομοκρατική δολοφονική επίθεση μεμονωμένου ή μικρής ομάδας ατόμων. Η ένεση είτε ενδομυϊκά είτε ενδοφλέβια προκαλεί σοβαρές παρενέργειες στην πλειοψηφία των τοξινών που σχετίζονται με βιοτρομοκρατία.



## 6. Ανίχνευση τοξινών

### 6.1 Γενικά στοιχεία μεθόδων ανίχνευσης τοξινών

Η παρούσα εργασία δεν φιλοδοξεί -ούτε είναι δυνατόν- να καταγράψει όλες τις υπάρχουσες μεθόδους ανίχνευσης τοξινών που σχετίζονται με βιοτρομοκρατία αλλά να αναφέρει ενδεικτικά ορισμένες για κάθε μια κατηγορία τοξινών. Η καταγραφή των μεθόδων ανίχνευσης ακόμη και για μια τοξίνη δεν θα μπορούσε να είναι πλήρεις λόγω των πολλών διαφορετικών τεχνικών και των παραλλαγών τους τόσο ως προς τα εργαστηριακά μέσα (μηχανήματα, αντιδραστήρια) όσο και ως προς το ακολουθούμενο πρωτόκολλο. Επιπλέον υπάρχει πλειάδα νέων τεχνικών για τις οποίες δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία και επιπρόσθετα τεχνικές που εφαρμοστήκαν με επιτυχία για την ανίχνευση μιας τοξίνης θα μπορούσαν δυνητικά να εφαρμοστούν με κάποιες τροποποιήσεις και για την ανίχνευση κάποιας άλλης ή άλλων.

Η χρήση σπόρων άνθρακα στις επιστολές σε βιοτρομοκρατική εκδήλωση το 2001, τόνισε την ανάγκη για άμεση ανίχνευση και ταυτοποίηση των παραγόντων βιοτρομοκρατίας από περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και από προσβεβλημένα άτομα και έκτοτε δόθηκε μεγάλη βαρύτητα στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων.

Η ανίχνευση των τοξινών αποτελεί μια πρόκληση για δύο κύριους λόγους.

Ο πρώτος είναι γενικός και αφορά προβλήματα-προκλήσεις που αφορούν γενικότερα τις μεθόδους ανίχνευσης κάποιας ουσίας, λόγω ενδογενών περιορισμών και ορίων των τεχνικών και τεχνολογιών ανίχνευσης, όπως για παράδειγμα τα όρια ανίχνευσης των συσκευών, τα απαιτούμενα αντιδραστήρια, το είδος των δειγμάτων και την προεργασία που απαιτείται για να είναι κατάλληλα για ανάλυση.

Ο δεύτερος αφορά συγκεκριμένα τις τοξίνες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε βιοτρομοκρατικό χτύπημα. Κύριο πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι οι τοξίνες μπορεί να υπάρχουν με ή χωρίς την παρουσία του οργανισμού που τις παρήγαγε και συνεπώς και της γενετικής του πληροφορίας. Συνεπώς η εστίαση στην ανίχνευση δεν μπορεί να γίνει μόνο με μεθόδους ανίχνευσης γενετικού υλικού. Όταν έχουμε τοξίνη σε καθαρή μορφή πρέπει να βασιστούμε σε φασματομετρικές, ανοσολογικές, χρωματογραφικές και λειτουργικές δοκιμασίες ή συνδυασμό τους καθώς οι τοξίνες είναι στην καθαρή τους απομονωμένη μορφή στην πλειονότητα πρωτεΐνες ή μικρομοριακές ενώσεις. Την ακριβή ανίχνευση και ταυτοποίηση των βιολογικών τοξινών δυσχεραίνει και το γεγονός ότι στη φύση υπάρχουν σε διαφορετικές ισομορφές ή παραλλαγές, για παράδειγμα η ρικίνη στο φυτό *Ricinus communis* υπάρχει στα ισομερή D και E με ταυτόχρονη παρουσία της αγλουτινίνης που είναι κατά 90% όμοια με τη ρικίνη. Η τοξίνη της αλλαντίασης έχει 7 διαφορετικούς τύπους αλλά και περισσότερους από 40 υποτύπους που διαφέρουν σημαντικά στην αλληλουχία των αμινοξέων. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με την εντεροτοξίνη του σταφυλόκοκκου B που έχει πάνω από 25 ισομορφές.

Εκτός από την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου, κρίσιμης σημασίας είναι αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων του συστήματος ανίχνευσης, που σχετίζεται με την

συλλογή των δειγμάτων, την μεταφορά τους, τη σταθερότητα και την ποιότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται, των συνθηκών ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού και των ορίων σφαλμάτων του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού. Η λύση στο πρόβλημα αυτό είναι η πιστοποίηση των μεθόδων. Γενικά ενώ υπάρχουν πολλές διαθέσιμες τεχνικές για την ανίχνευση τοξινών και την ανάλυση τους σε εξειδικευμένα εργαστήρια, παρόλα αυτά δεν υπάρχει κάποια μέθοδος κοινής αποδοχής ούτε ως προς την τεχνική, ούτε ως προς τα μηχανήματα ούτε ως προς τα αντιδραστήρια ή γενικά τα χρησιμοποιούμενα μέσα για τις περισσότερες τοξίνες που θα αναφερθούν. Επιπλέον δεν υπάρχει σύγκριση-διασταύρωση αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων όσον αφορά την ακρίβεια και την ευαισθησία. Το πρόβλημα αυτό προσέγγισε το πρόγραμμα EQUATOX (Establishment of Quality Assurance for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk) <sup>8</sup> όπου μελετήθηκαν πιστοποιημένοι τρόποι ανίχνευσης για ρικίνη, αλλαντοτοξίνη, εντεροτοξίνη σταφυλόκοκκου και σαξιτοξίνη.

Η κατάσταση δυσκολεύει ακόμη περισσότερο καθόσον στην ανίχνευση τοξινών που σχετίζονται με βιοτρομοκρατία μας ενδιαφέρει να ανιχνεύσουμε το σύνολο ή τουλάχιστον πολλές από τις πιθανές τοξίνες και μάλιστα σε διαφορετικά υποστρώματα ( αέρας, νερό, τρόφιμα, σωματικά υγρά, επιφάνειες) και σε άγνωστη συγκέντρωση.

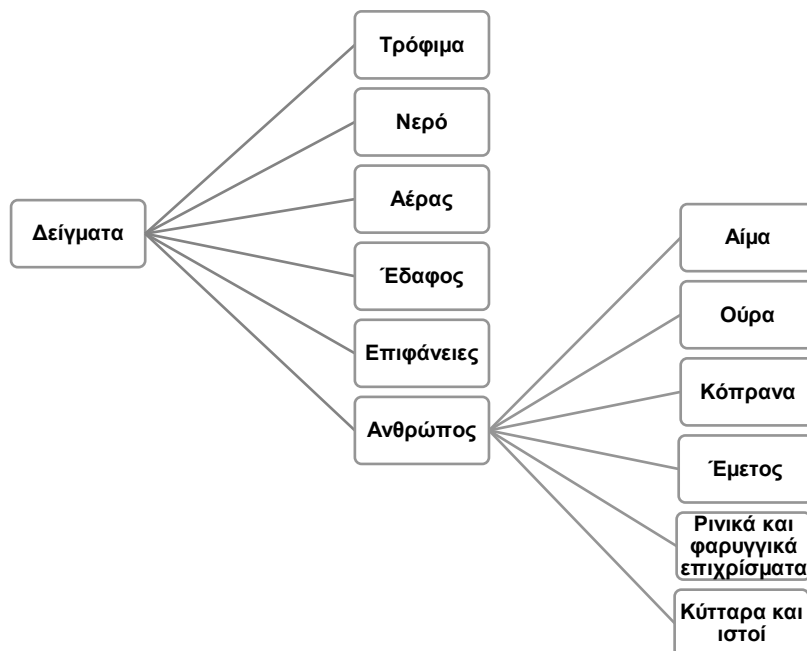
Ένας ακόμη παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη στην ανίχνευση των τοξινών που σχετίζονται με τη βιοτρομοκρατία είναι η συλλογή και ο χειρισμός των δειγμάτων. Τα θέματα που σχετίζονται με τη δειγματοληψία περιλαμβάνουν το είδος του προς δοκιμή μέσου, τη διαδικασία συλλογής, και τη μεταφορά δειγμάτων. Δείγματα αέρα ή νερού πρέπει γενικά να συγκεντρωθούν από μεγάλους όγκους για ανίχνευση χαμηλών επιπέδων της τοξίνης . Τα δείγματα αέρα πρέπει επίσης να είναι να εξάγονται σε ένα υγρό, επειδή οι περισσότερες πλατφόρμες ανίχνευσης επεξεργασία μόνο υγρά δείγματα. Η αποτελεσματικότητα της ανάκτησης από διαδικασίες συγκέντρωσης και εκχύλισης μπορεί να ποικίλουν και να επηρεάζουν όρια ανίχνευσης. Το μέγεθος, ο αριθμός και η κατανομή του δείγματος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, καθώς και ο χρόνος και η μέθοδος μεταφοράς ιδιαίτερα για τους, ζωντανούς μικροοργανισμούς που μπορεί να απαιτούν συγκεκριμένα περιβαλλοντικές και διατροφικές συνθήκες επιβίωσης<sup>9</sup>.



Σχήμα 4. Στάδια για ανίχνευση τοξίνης ή οργανισμού που παράγει τοξίνη σχετιζόμενη με βιοτρομοκρατία.

Αν και η προετοιμασία των δειγμάτων και η αποδοτικότητα του καθαρισμού και απομόνωσης τους καθορίζουν τη συγκέντρωση του βιολογικού παράγοντα, σε ορισμένες περιπτώσεις π.χ σε μια ενδοτοξίνη ή σε συνύπαρξη τοξίνης με τον μικροοργανισμό παραγωγής της στο ίδιο

μέσο, πρέπει να επιβεβαιωθεί η ανάλυση με συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας. Η συμβατική ανίχνευση και ταυτοποίηση των ανθρώπινων παθογόνων ως επί το πλείστον βασίζονται σε καλλιέργεια σε κατάλληλο μέσο και βιοχημική κατόπιν ανάλυση που διαρκεί 3-7 ημέρες αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και πάνω από 15 ημέρες για να παρέχουν αποτελέσματα. Η καλλιέργεια και οι βιοχημικές εξετάσεις είναι αξιόπιστες αλλά χρειάζεται άρτια εκπαιδευμένο ανθρώπινο δυναμικό για να εκτελεστούν. Επιπλέον, δεν παρέχουν αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο βάση και ως εκ τούτου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην περιβαλλοντική ανίχνευση ή σε καταστάσεις που χρειάζονται άμεση αποτελέσματα.



Σχήμα 5. Κατηγορίες δειγμάτων για ανίχνευση τοξινών.

Οι τεχνολογίες ανίχνευσης που αναπτύσσονται πρέπει να είναι ταχείες, ακριβείς και πρέπει να επιβεβαιώνει κατηγορηματικά την παρουσία ή απουσία των τοξινών σε ποικίλα μέσα. Ένα ιδανικό σύστημα ανίχνευσης για τοξίνες αλλά και για τους υπόλοιπους παράγοντες που σχετίζονται με βιοτρομοκρατία πρέπει να είναι σε θέση να ανίχνευση των παραγόντων σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση και σε διαφορετικά μέσα. Επιπλέον στα συστήματα ανίχνευσης θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα εύκολης μεταφοράς τους δηλαδή φορητότητα, να είναι φιλικά προς το χρήστη και ικανό να ανιχνεύουν πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου καθώς τα δείγματα δείγματα συχνά περιέχουν μια ποικιλία από βακτήρια, ιούς και τοξίνες. Τέλος ιδανικό θα ήταν η χρησιμοποιούμενη μέθοδος να μπορεί να εφαρμοσθεί και να ανιχνεύσει τους παράγοντες επι τόπου αλλά και σε εργαστήρια που έχουν περιορισμένη εργαστηριακό εξοπλισμό. Δυστυχώς προς το παρών κανένα από τα διαθέσιμα συστήματα ανίχνευσης δεν πληροί όλα τα ανωτέρω κριτήρια και η επιλογή του καταλληλότερου είναι θέμα πραγματικό της κάθε περίπτωσης. πολλών από τα διαθέσιμα συστήματα που βασίζονται στη σύνδεση αντιγόνου - αντισώματος.

Στην ανίχνευση βιολογικών παραγόντων βιοτρομοκρατίας πολέμου επειδή ενδιαφέρει η πρόληψη μιας κρίσης και όχι απλά η διαπίστωση εκ των υστέρων, πέραν των ανθρωπίνων κλινικών δειγμάτων όπως αίμα, πτύελα, ούρα, κόπρανα, κλπ, έχουμε επίσης δείγματα από υλικά σε σκόνη, δείγματα τροφίμων και ύδατος και δείγματα του περιβάλλοντος αέρα. Οι ρύποι που υπάρχουν στον αέρα, τα αντιπηκτικά του αίματος, η αιμοσφαιρίνη και το DNA λευκοκυττάρων αναστέλλουν την αντίδραση πολυμεράσης. Στην περίπτωση της ανοσολογική δοκιμή, τα δείγματα φαγητού με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και λιπίδιο αλλά και τα κόπρανα με υψηλό βακτηριακό φορτίο στα δείγματα κοπράνων αποτελούν πρόκληση στην ανίχνευση. Εξαιτίας αυτού, μια καλή προετοιμασία του δείγματος είναι απαραίτητη στα περισσότερα από τα συστήματα που έχουν αναπτύχθηκε είτε με το νουκλεϊκό οξύ ή συστήματα ανίχνευσης που βασίζονται σε αντισώματα. Η προετοιμασία του δείγματος λαμβάνει αρκετές ώρες έως και ημέρες, ανάλογα με τα τυποποιημένα πρωτόκολλα και συχνά δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν επι τόπου. Στην περίπτωση των βακτηριδίων που παράγουν τις τοξίνες, τις περισσότερες φορές του δείγματος που λαμβάνεται από το σημείο ελέγχου είναι ακατάλληλο για τις συνθήκες καλλιέργειας.

## 6.2 Κύριες μέθοδοι ανίχνευσης τοξινών

Σε γενικές γραμμές σήμερα οι τεχνολογίες ανίχνευσης ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες χωρίς τα διακριτικά όρια κατηγοριοποίησης να είναι ξεκάθαρα:

### 6.2.1 Δοκιμασίες σε πειραματόζωα.

Στις συγκεκριμένες μεθόδους η τοξίνη χορηγείται σε πειραματόζωα που συνήθως είναι ποντίκια (mouse bioassay – MBA), σε ορισμένες περιπτώσεις κουνέλια και σπανίως πλέον ανωτέρα θηλαστικά όπως πίθηκοι. Μετά την χορήγηση που συνήθως γίνεται με ένεση ή με λήψη τροφής ή υγρού δείγματος, μελετάται το ποσοστό θνησιμότητας τους, ο χρόνος στον οποίο αυτή επέρχεται αλλά και τα εμφανιζόμενα συμπτώματα και επιπλέον συχνά ακολουθεί ιστολογική εξέταση. Κύριο στοιχείο στην μέθοδο αυτή είναι η εύρεση του LD<sub>50</sub> ή η συσχέτιση με γνωστό LD<sub>50</sub> ώστε να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε σε ποια τοξίνη αναφερόμαστε (σε συνδυασμό με την συμπτωματολογία στα πειραματόζωα και τις προκληθέντες βλάβες σε ιστούς και όργανα) και ποια η συγκέντρωσή της προσεγγιστικά στο χορηγούμενο προς εξέταση δείγμα. Τα MBA θεωρούνταν ο «χρυσός κανόνας» (golden standard) στην ανίχνευση και τον προσδιορισμό των τοξινών και χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες. Η τάση τα τελευταία χρόνια είναι ο περιορισμός των δοκιμασιών σε πειραματόζωα για βιοηθικούς λόγους αλλά και διότι οι μέθοδοι αυτοί είναι δαπανηροί, απαιτείται χρήση μεγάλου αριθμού ζώων, τα πλήρη αποτελέσματα χρειάζονται μέρες για να εξαχθούν και δεν υπάρχει μεγάλη ακρίβεια κυρίως στην ποσοτικοποίηση τους.

### 6.2.2 Δοκιμασίες σε σειρές κυττάρων ή ιστών.

Στις συγκεκριμένες δοκιμασίες χρησιμοποιούνται κύτταρα ή ιστοί που έχουν απομονωθεί από όργανα πολυκύτταρων οργανισμών συνήθως θηλαστικών (π.χ. VERO κύτταρα του πράσινου αφρικάνικου πιθήκου), έχουν καλλιεργηθεί σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και βρίσκονται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία, πίεση, ακτινοβολία, αναλογία οξυγόνου-διοξειδίου του άνθρακα κλπ) ώστε να προσομοιάζεται η λειτουργία τους σαν να βρίσκονται σε ζωντανό οργανισμό. Στα συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς εισάγεται το προς μελέτη δείγμα που περιέχει ή είναι ύποπτο ότι περιέχει τοξίνη και παρατηρούνται κυρίως μικροσκοπικά (π.χ. λήψη φωτογραφιών ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα) και με φωτομετρικές μεθόδους (π.χ. κυτταρομετρία ροής) ,φαινόμενα κυτταρικής απόπτωσης, μορφολογικών αλλαγών έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή άλλων δεικτών , ιστολογικές αλλοιώσεις, καθώς και το χρονικό διάστημα και οι συγκεντρώσεις του δείγματος που προκαλούν τα προς μελέτη χαρακτηριστικά. Έτσι αναλύοντας τα δεδομένα των αποτελεσμάτων επιδιώκεται ποιοτική και κατά το δυνατόν ποσοτική ανάλυση της τοξίνης του δείγματος. Η δοκιμασίες σε σειρές κυττάρων ή ιστών έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν τη θανάτωση και τον βασανισμό ζώων, μπορούμε να έχουμε περισσότερες αναλύσεις και επικέντρωση σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά συγκεκριμένων κυττάρων ή ιστών. Μειονεκτήματα κυρίως είναι ότι απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες και κατάλληλά εκπαιδευμένο προσωπικό για την διεξαγωγή των πειραμάτων, και εδώ τα αποτελέσματα δεν λαμβάνονται άμεσα και επιπλέον είναι δύσκολη η επιλογή των κατάλληλων κυττάρων ή ιστών σε άγνωστο δείγμα γιατί δεν αλληλοεπιδρούν όλες οι τοξίνες με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα είδη κυττάρων ή ιστών.

### 6.2.3 Δοκιμασίες ανίχνευσης γενετικού υλικού

Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι οι δοκιμασίες PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Η PCR είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια τα οποία διαρκούν συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και γίνονται σε καθορισμένη θερμοκρασία, την αποδιάταξη του DNA (denaturation), την προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) και την επιμήκυνση των εκκινητών (extension). Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος, έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα και στην βιοτρομοκρατία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση τοξινών έμμεσα μέσω της ανίχνευσης στο προς εξέταση δείγμα γενετικού υλικού του μικροοργανισμού που τις παράγει. Η PCR και οι παραλλαγές της όπως η *real time pcr* αν

και μπορούν να ανιχνεύσει >10 μικροοργανισμούς ανά δείγμα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις που έχουμε καθαρή απομονωμένη τοξίνη καθώς αυτή είναι πρωτεΐνη ή μικρομοριακή οργανική ένωση που δεν περιλαμβάνει γενετικό υλικό των οργανισμών που την παράγουν. Επιπλέον απαιτείται κατάλληλη προετοιμασία του προς μελέτη δείγματος ώστε αφενός να μην εμποδιστεί η πορεία της αντίδρασης από ουσίες που την μπλοκάρουν (π.χ. αντιπηκτικά, DNA λευκοκυττάρων) και αφετέρου για να αποκλειστεί επιμόλυνση του δείγματος που ενδέχεται να δώσει ψευδές θετικό αποτέλεσμα. Ακόμη ένα μειονέκτημα των τεχνολογιών PCR είναι ότι τα προϊόντα τους δεν μπορούν να αποθηκευτούν και να υποστούν περαιτέρω ανάλυση. Τέλος λόγω της εξειδικευμένης λειτουργίας της PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών ειδικών για συγκεκριμένη γενετική αλληλουχία είναι δύσκολη η χρήση της για ανίχνευση πολλαπλών τοξινών μέσω υπολειμμάτων γενετικού υλικού των οργανισμών που τις παράγουν.

#### 6.2.4 Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης

Οι τοξίνες αλλά και μικροοργανισμοί ή τμήματα οργανισμών που τις παράγουν, έχουν την ιδιότητα να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση και έτσι δρουν στον οργανισμό ως αντιγόνα. Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλεύονται οι ανοσολογικές δοκιμασίες που βασίζονται στη σύνδεση αντιγόνου -αντισώματος και έχουν μεγάλη εξειδίκευση καθόσον τα αντιγόνα όπως οι τοξίνες ενώνονται με συγκεκριμένα μορφολογικά αντισώματα.

##### ELISA

Κύριος αντιπρόσωπος των ανοσολογικών δοκιμασιών είναι η είναι βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος (στην συγκεκριμένη περίπτωση της τοξίνης) σε ένα δείγμα ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Στη συγκεκριμένη μέθοδο, αρχικά, ένα αντίσωμα προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια, μετά προστίθεται το δείγμα μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο και γίνεται πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Κατόπιν, προστίθεται αντίσωμα που ανιχνεύει το αντιγόνο. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση με την χρήση ενός ενζύμου που δεσμεύεται έμμεσα με το σύμπλοκο. Έπειτα προστίθεται υπόστρωμα και γίνεται ενζυμική αντίδραση που δίνει έγχρωμο σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια μετρείται. Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του βιομορίου που μελετάται. Οι διάφορες τεχνικές της μεθόδου ELISA, χρησιμοποιούνται για ποσοτική όπως και για ποιοτική ανάλυση. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη (γραφική παράσταση), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος του δείγματος. Η ποιοτική ανάλυση μας παρέχει ενδείξεις για την ύπαρξη αρνητικού ή θετικού αποτελέσματος στο δείγμα.

Η ELISA και οι παραλλαγές της χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των τοξινών, κλειδί στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι η εύρεση του κατάλληλου

αντισώματος ώστε να προσδεθεί με την τοξίνη και να αποφευχθεί ψευδές αρνητικό αποτέλεσμα. Ακόμη πρόκληση αποτελεί η προσθήκη πολλών διαφορετικών αντισωμάτων σε κατάλληλες συγκεντρώσεις για ανίχνευση της τοξίνης σε άγνωστο δείγμα.

Η δοκιμασίες που βασίζονται σε σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος δεν περιορίζονται στην τεχνική και τις παραλλαγές τις ELISA και υπάρχει πληθώρα εφαρμογών και στην κατηγορία των βιοαισθητήρων.

#### DELFLIA

Η DELFLIA (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay), είναι μια τεχνολογία μέτρησης έντασης φθορισμού με χρονική ανάλυση (time-resolved fluorescence -TRF). Οι δοκιμασίες DELFLIA σχεδιάζονται για να ανιχνεύουν την παρουσία μιας ένωσης ή βιομορίου με τη χρήση αντιδραστηρίων που έχουν σημανθεί με χηλικό λανθανίδιο, διαχωρίζοντας το μη δεσμευμένο αντιδραστήριο χρησιμοποιώντας στάδια έκπλυσης. Οι δοκιμασίες DELFLIA είναι ευέλικτες, συμβατές με μια ποικιλία συσκευών ανάγνωσης πλακών και καθώς πρόκειται για τεχνολογία πλουσίματος, είναι συμβατές με τους περισσότερους τύπους δειγμάτων. Η τεχνολογία βασίζεται στον φθορισμό των χηλικών ενώσεων λανθανιδών (Ευρώπιο, Σαμάριο και Τέρβιο). Ο χρόνος μείωσης φθορισμού αυτών των ενώσεων είναι πολύ μεγαλύτερος από τα παραδοσιακά φθοροφόρα, επιτρέποντας αποτελεσματική χρήση της προσωρινής ανάλυσης για τη μείωση του αυτοφθορίζοντος υποβάθρου. Η μεγάλη μετατόπιση Stokes (διαφορά μεταξύ των κυμάτων μήκους διέγερσης και εκπομπής) και οι στενές κορυφές εκπομπών συμβάλλουν στην αύξηση του λόγου σήματος προς θόρυβο. Η ευαισθησία αυξάνεται περαιτέρω λόγω της αρχής της διάστασης-ενίσχυσης: το χηλικό λανθανίδιο διαχωρίζεται και σχηματίζεται ένα νέο ένζυμο υψηλής φθορισμού σε προστατευτικό μυκηλιακό διάλυμα. Συστήματα DELFLIA έχουν χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση BoNT, SEB και του E.coli O157:H7.

#### xMAP

Η τεχνολογία xMAP παρουσιάζει ομοιότητες με την sandwich ELISA και έχει στοιχεία από την κυτταρομετρία ροής. Μάλιστα υπάρχει ήδη εμπορικό kit για ταυτόχρονη ανίχνευση BoNT, SEB και RT<sup>10</sup>. Εδώ το αντίσωμα για την δέσμευση της τοξίνης είναι επικαλυμμένο επάνω στην επιφάνεια ενός σφαιριδίου πολυστυρενίου και όχι σε μικροπλακίδια. Αυτά τα σφαιρίδια υποβάλλονται σε επεξεργασία κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και διαχωρίζονται για ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα μικροσφαιρίδια έχουν συγκεκριμένο φάσμα εκπομπής ακτινοβολίας και χρωματικά κωδικοποιούνται σε διαφορετικά σύνολα που μπορούν να ταυτοποιηθούν από τον αναλυτή. Καθώς κάθε τύπος σφαιριδίων μπορεί να επισημανθεί με διαφορετικά αντισώματα αυτή η επισημανση επιτρέπει πολλαπλές αναλύσεις που εκτελούνται ταυτόχρονα. Τα μικροσφαιρίδια βρίσκονται σε διάλυμα σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, επιτρέποντας έτσι υγρή δέσμευση του στόχου και διαχωρισμό φασματοσκοπικά από ένα διπλό



σύστημα ανίχνευσης λέιζερ. Το λέιζερ ανιχνεύει τη διέγερση των εσωτερικών χρώσεων των μικροσφαιριδίων και των χρωστικών -μαρτύρων των τυχόν δεσμευμένων στόχων. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη με την ποσότητα του στόχου.

Φορητά συστήματα ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής (Lateral Flow)

Οι φορητές συσκευές πλευρικής ροής, έχουν αναπτυχθεί κυρίως για άμεση επί τόπου διάγνωση, αλλά μπορεί επίσης να είναι χρήσιμες για κλινική εργαστηριακή χρήση. Αποτελούν δοκιμασίες μιας χρήσης, με βάση ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες, δίνοντας ορατά, έγχρωμα τελικά προϊόντα που επιβεβαιώνουν ή αποκλείουν την ύπαρξη του παράγοντα βιοτρομοκρατίας. Το σύστημα βασίζεται στα αντισώματα επικαλυμμένα με κυτταρίνη ή μεμβράνη και χρησιμοποιεί δυνάμεις ροής λόγω του τριχοειδούς φαινομένου για την έκλυση αντιγόνων επισημασμένων με κολλοειδή χρυσό, ή χρωματισμένα μικροσωματίδια συζευγμένα με αντισώματα στην υγρή φάση. Θετικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με τη δέσμευση του σημασμένου σύμπλοκου αντιγόνου-αντισώματος με ένα δεύτερο, ακίνητο αντίσωμα (συνήθως κατευθυνόμενο κατά της ανοσοσφαιρίνης G). Στα συστήματα αυτά υπάρχει μια γραμμή ελέγχου (control line) που είναι το αρνητικό αποτέλεσμα και ανάλογα αν έχουμε θετικό ή αρνητικό δείγμα εμφανίζεται ή δεν εμφανίζεται αντίστοιχα μια ακόμη γραμμή δοκιμής (test line). Αν και αυτό το είδος των αναλύσεων είναι εύκολες και γρήγορες στην εκτέλεση, δεν είναι πολύ ευαίσθητες και δίνουν περισσότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Εντούτοις, μπορεί να είναι χρήσιμες για ταχεία αρχική εξέταση δειγμάτων για την παρουσία βιολογικών παραγόντων, και κάθε θετικό αποτέλεσμα πρέπει να επιβεβαιωθεί από άλλες δοκιμές, όπως η PCR. Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες συσκευές πλευρικής ροής που αναπτύχθηκαν για τέτοιους βιολογικούς παράγοντες όπως *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum* και αρκετές τοξίνες, όπως η ρικίνη και η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη B.

#### 6.2.5 Φασματοσκοπικές αναλυτικές μέθοδοι

Εδώ έχουμε ανάλυση του δείγματος από φασματογράφους, όπως ο κλασικός φασματογράφος μάζας (mass spectrometer MS). Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων όπως οι τοξίνες και οι βιοδείκτες (π.χ. θραύσματα πρωτεϊνών, DNA, 16s RNA, ολιγοσακχαρίτες, μόρια και μοριακά θραύσματα χαμηλού μοριακού βάρους όπως φωσφολιπίδια ή μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων). Η φασματοσκοπία μαζών βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) αφού έχει ιοντιστεί η προς μελέτη ουσία με κατάλληλο ιοντιστή όπως ο ESI (electrospray ionization) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιονισμού και επιπλέον του μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων. Πέραν του



κλασικού φασματογράφου μάζας κατάλληλο για την ανίχνευση και ταυτοποίηση τοξινών και μικροοργανισμών που τις παράγουν είναι η νεότερη τεχνολογία MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) με αναλυτές time-of-flight (TOF) και ion trap ,μεγάλος αριθμός επιστημόνων θεωρεί την τεχνολογία ιοντισμού MALDI τον καλύτερο τρόπο για ανίχνευση-ταυτοποίηση πρωτεϊνών όπως είναι και η πλειοψηφία των τοξινών. Υπάρχουν πολλές τεχνικές και παραλλαγές στην φασματογραφία μαζών (π.χ. DART (direct analysis in real time) MS, surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI)-MS, Endopep-MS) και σε πολλές περιπτώσεις οι φασματογράφοι είναι προσκολλημένοι σε μηχανήματα χρωματογραφίας όπου καθαρίζει το δείγμα και έτσι είναι ευκολότερος ο εντοπισμός της τοξίνης, στις τοξίνες χρησιμοποιείται υγρή χρωματογραφία καθώς αυτές δεν είναι πτητικές στην μοριακή τους μορφή. Επιπλέον υπάρχουν και συζευγμένοι φασματογράφοι δύο σταδίων MS/MS και χρήση της τεχνικής Selected reaction monitoring (SRM). Οι φασματογραφικές μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα με μεγάλη ακρίβεια και μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμη και μίγματα διαφορετικών τοξινών και αποτελούν την μέθοδο επιλογής σε εργαστηριακές αναλύσεις. Κυρία μειονέκτημα τους είναι το κόστος η πολυπλοκότητα και το μέγεθος του μηχανολογικού εξοπλισμού και το ότι απαιτείται εξειδικευμένο και έμπειρο επιστημονικό προσωπικό για τη χρήση τους και την ορθή εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Επιπλέον μειονέκτημα αποτελεί ότι σε αρκετές περιπτώσεις περιβαλλοντικά ή κλινικά δείγματα απαιτούν καθαρισμό π.χ. με χρήση υγρής χρωματογραφίας καθώς στην αρχική τους μορφή δίνουν αρκετό θόρυβο και δυσχεραίνουν την αναγνώριση των βιοδεικτών της τοξίνης<sup>11</sup>.

#### 6.2.6 Βιοαισθητήρες (biosensors)

Βιοαισθητήρας είναι ένας αυτόνομος αισθητήρας ικανός να παρέχει ποσοτικές ή ημιποσοτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης που βρίσκεται σε άμεση χωρική επαφή με ένα κατάλληλο μεταλλάκτη. Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές διατάξεις που αποτελείται από ένα βιοστοιχείο ένα μεταλλάκτη που μετατρέπει μία βιολογική ή βιοχημική αναγνώριση του υποστρώματος (αναλύτη) σε ηλεκτρικό σήμα. Συνήθως στους βιοαισθητήρες ως στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης χρησιμοποιείται ένα ένζυμο (ενζυμικοί βιοαισθητήρες) ή βιολογικοί υποδοχείς όπως αντισώματα, κύτταρα, ιστοί (βιοαισθητήρες συγγένειας), επιπλέον υπάρχουν και συνθετικοί υποδοχείς. Το βιοστοιχείο των περισσότερων βιοαισθητήρων είναι ακινητοποιημένο πάνω σε μεμβράνη ή μέσα σε γέλη έτσι, ώστε το βιοστοιχείο να κρατιέται σε στενή επαφή με το μεταλλάκτη. Ο μεταλλάκτης μπορεί να είναι ηλεκτροχημικός, οπτικός, πιεζοηλεκτρικός, θερμομετρικός, μαγνητικός, μικρομηχανικός ή ακουστικός. Το παραγόμενο αναλυτικό σήμα είναι αποτέλεσμα βιοαναγνώρισης, δηλαδή εκλεκτικής αλληλεπίδρασης του βιολογικού παράγοντα ανίχνευσης (παραγοντας βιοαναγνώρισης) με την προσδιοριζόμενη ουσία στην προκειμένη περίπτωση την τοξίνη.

Κάτω από την γενική περιγραφή των βιοαισθητήρων υπάρχει πλειάδα χρησιμοποιούμενων μεθόδων, τεχνικών και τεχνολογιών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ανίχνευση των τοξινών

παρουσιάζουν οι βιοαισθητήρες που στο βιοστοιχείο βασίζονται σε σύνδεση τοξίνης με αντίσωμα ή απταμερές (κυρίως συνθετικών πεπτιδίων) και οι βιοαισθητήρες SPR (surface plasmon resonance).

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν το μέλλον στην ανίχνευση των τοξινών που σχετίζονται με βιοτρομοκρατία και προσπάθειας γίνονται ώστε να υπάρξει εμπορικά διαθέσιμες συσκευές υψηλή ευαισθησίας, μεγάλη εκλεκτικότητα, καλή επαναληψιμότητας και ακρίβειας, ταχείας απόκρισης, υψηλή αξιοπιστίας ,μεγάλου εύρους ανίχνευσης και πολλαπλών τοξινών ,ικανοποιητικής διάρκειας ζωής , δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, χαμηλό κόστους, ανεξαρτησίας απόκρισης από φυσικές και χημικές μεταβολές , φορητότητας, δυνατότητα παραμετροποίησης και εισαγωγής προς ανίχνευση νέων ή τροποποιημένων τοξινών.

#### 6.2.7 Συνδυαστικές-καινοτόμες τεχνικές

Οι ερευνητές δεν περιορίζονται στην απομονωμένη χρήση των ανωτέρω τεχνικών και υπάρχουν καινοτόμοι μέθοδοι συνδυασμού τους με εισαγωγή και νέων τεχνολογιών .Έτσι στους βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν τεχνικές σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος δανειζόμενη στοιχεία από την ELISA όπως οι αισθητήρες Surface plasmon resonance- SPR. Άλλο παράδειγμα είναι η immune PCR όπου χρησιμοποιούνται αντισώματα που προσδένουν στις τοξίνες και χρησιμοποιούνται κομμάτια DNA ως δείκτες (markers).Ένα τελευταίο παράδειγμα είναι η χρήση MALDI-TOF/MS σε μαγνητικά σωματίδια στα οποία είναι συζευγμένα τα αντισώματα που προσδένονται στις προς μελέτη τοξίνες. Με τη χρήση συνδυαστικών τεχνικών επιδιώκεται να συνδυαστούν όσο το δυνατόν περισσότερα πλεονεκτήματα τις κάθε μεθόδου σε μια νέα επιδιώκοντας μείωση του χρόνου ανίχνευσης, αύξηση της ευαισθησίας και της αναπαραγωγιμότητας του αποτελέσματος , ανίχνευση πολλαπλών τοξινών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και από διαφορετικού τύπου δείγματα και ακόμη και φορητότητα.

### 7. ΤΟΞΙΝΗ ΑΝΘΡΑΚΑ (ΑΤ)

#### 7.1 Ιστορικά δεδομένα:

Ο άνθρακας έχει πλούσιο ιστορικό παρελθόν με τις πρώτες αναφορές για την ασθένεια που προκαλεί να προέρχονται από την αρχαία Ελλάδα, την Ρώμη την Αίγυπτο και την Μεσοποταμία. Ο Ιπποκράτης (5<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.) εισήγαγε το όνομα «άνθρακας» για να χαρακτηρίσει την ασθένεια που προκαλούσε το χαρακτηριστικό ανθρακί χρώμα στις πληγές του δέρματος. Πιθανολογείται ότι στην εποχή του Μωυσή, η έκτη από τις δέκα πληγές του Φαραώ σύμφωνα με την περιγραφή της Παλαιάς Διαθήκης αφορούσε την ασθένεια του άνθρακα. Επιπλέον αναφορές έχουμε στην Ηλιάδα του Ομήρου το 700 π.Χ αλλά και σε ποιήματα του Ρωμαίου Βιργίλιου. Έχει προταθεί ότι η ασθένεια του άνθρακα μπορεί να συνέβαλλε στην πτώση της Ρώμης<sup>12</sup>.

Η πρώτη κλινική περιγραφή της ασθένειας του άνθρακα έγινε από τον Maret το 1752 και τον Fournier το 1769. Εντατικά ο βάκιλος του άνθρακα μελετήθηκε από τον βακτηριολόγο Robert Koch το 1877 με αποτέλεσμα τα πλέον γνωστά ως κριτήρια του Κοχ που αφορούν τις προϋποθέσεις που πρέπει να ισχύουν για να είναι μια ασθένεια μεταδοτική. Το 1881 ο Παστέρ παρασκεύασε το πρώτο πειραματικό εμβόλιο κατά του άνθρακα σε ζώα. Το 1944 χρησιμοποιήθηκε η πενικιλίνη που είχε ανακαλυφθεί το 1928 για θεραπεία από την ασθένεια του άνθρακα και το 1950 παρασκευάστηκε το πρώτο εμβόλιο για τον άνθρωπο.

Εξίσου πλούσια ιστορικό έχει και η χρήση του άνθρακα ως βιολογικό όπλο. Η πρώτη επίθεση με σκόπιμη απελευθέρωση άνθρακα καταγράφηκε κατά τη διάρκεια του πρώτου παγκοσμίου πολέμου το 1914-1918 σε ζώα από ανεξάρτητους προμηθευτές προς τις συμμαχικές δυνάμεις.

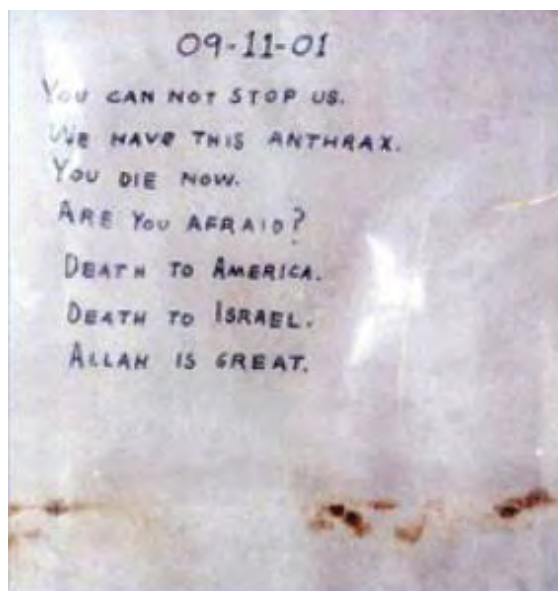
Το 1932 η Ιαπωνία υπό την εποπτεία του στρατηγού και βακτηριολόγου Shirō Ishii ξεκίνησε να καλλιεργεί βάκιλος άνθρακα και να πειραματίζεται για χρήση ως βιολογικό όπλο στην υπό κατοχή περιοχή της Μαντζουρίας. Στα πλαίσια των πειραμάτων χορηγήθηκε άνθρακας σε φυλακισμένους πολέμου. Όπως αποκαλύφθηκε αργότερα οι Ιάπωνες επιτέθηκαν σε 11 Κινέζικες πόλεις με άνθρακα σε μορφή σπρέι-βιοαεροζόλ που ψεκάστηκε από αεροπλάνα απευθείας πάνω σε σπίτι Κινέζων.

Το 1942 οι ΗΠΑ πειραματίστηκαν με τον άνθρακα παράλληλα με άλλους βιολογικούς παράγοντες σε περιοχές του Μισισιπή και της Γιούτα και ετοιμάστηκαν πάνω από 5.000 βόμβες για πιθανή επίθεση στην Γερμανία. Το ίδιο έτος πειράματα διεξήγαγε και η Μεγάλη Βρετανία στο νησάκι Gruinard της Σκωτίας όπου έγινε ρίψη βομβών που περιείχαν άνθρακα αφού είχαν τοποθετηθεί 80 πρόβατα ως πειραματόζωα, με αποτέλεσμα όλα τα πρόβατα να νοσήσουν από άνθρακα και να πεθάνουν. Στο πείραμα αυτό φάνηκε η ανθεκτικότητα των

σπόρων του άνθρακα καιρό μετά την επίθεση και το νησί παρέμεινε ακατοίκητο για πάνω από 40 χρόνια ώστε να θεωρηθεί πλέον ασφαλές.

Τις δεκαετίες του 1950 και 1960 υπήρξε σημαντική έρευνα για τη χρήση του άνθρακα ως βιοόπλο κάτι που ενέτεινε τις ανησυχίες της διεθνούς κοινότητας για τη χρήση του άνθρακα αλλά και των άλλων βιοόπλων και την μη αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου της Γενεύης του 1925 έτσι με προτροπή της Μεγάλης Βρετανίας στην επιτροπή των Ηνωμένων Εθνών προτάθηκε η πλήρης απαγόρευση της ανάπτυξης , παραγωγής και αποθήκευση βιολογικών παραγόντων όπως ο άνθρακας αλλά και ο έλεγχος πιθανών παραβατών. Το 1969 οι ΗΠΑ επί προεδρίας Νίξον τερμάτισε το πρόγραμμα έρευνας και παραγωγής βιοόπλων και δεσμεύτηκε να μην τα χρησιμοποιήσει ποτέ και σε καμία περίπτωση.

Το 2001 μετά τις επιθέσεις της 11ης Σεπτεμβρίου στο παγκόσμιο κέντρο εμπορίου και το πεντάγωνο, γράμματα που περιείχαν λευκή σκόνη ενδοσπόρια άνθρακα ταχυδρομήθηκαν σε δύο γερουσιαστές και σε πρακτορεία ειδήσεων στην ανατολική ακτή. Τέσσερα γράμματα ανακτήθηκαν από τις αρχές με σφραγίδα ταχυδρομείου 18/09/2001 και 09.10.2001 Η λευκή σκόνη μόλυε τον αέρα στα γραφεία που ανοίχτηκαν οι φάκελοι αλλά και στις ταχυδρομικές εγκαταστάσεις. Πριν να νοσήσει κάποιος οι Αμερικάνοι δεν γνώριζαν για αυτή την τρομοκρατική επίθεση. Το 2001 νόσησαν από άνθρακα 22 άνθρωποι και πέντε εξ αυτών πέθαναν. Όλοι οι νεκροί είχαν εισπνεύσει ενδοσπόρια άνθρακα. Συνολικά 43 άνθρωποι βρέθηκαν θετικοί σε τεστ έκθεσης σε άνθρακα και 10.000 θεωρήθηκαν ότι κινδύνευσαν από πιθανή έκθεση.



Εικόνα 5. Γράμμα που περιείχε άνθρακα Οκτώβριος 2001 ΗΠΑ (η αναγραφόμενη ημερομηνία στο γράμμα αναφέρεται στην τρομοκρατική επίθεση στις 11 Σεπτεμβρίου του 2001)<sup>13</sup>

## 7.2 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:

Η τοξίνη του άνθρακα είναι μια εξωτοξίνη που αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η ΑΤ ανακαλύφθηκε από τον Χάρι Σμιθ το 1954. Τα δομικά στοιχεία της τοξίνης είναι

μια πρωτεΐνη δέσμευσης κυττάρων, γνωστή ως προστατευτικό αντιγόνο (PA) μοριακού βάρους 83 kDa και δύο ένζυμα ο παράγοντας οιδήματος (edema factor - EF) μοριακού βάρους 89 kDa και θανατηφόρος παράγοντας (lethal factor - LF) μοριακού βάρους 90 kDa. Τα τρία πρωτεϊνικά συστατικά μεμονωμένα δεν έχουν τοξική δράση, όμως μαζί δρουν σε συνέργεια με ιδιαίτερα τοξική δράση<sup>14</sup>.

### 7.3 Οργανισμοί προέλευσης:

Η ΑΤ παράγεται και εκκρίνεται από τα λοιμογόνα στελέχη του Gram-θετικού βακτηρίου *Bacillus anthracis* το οποίο σχηματίζει ενδοσπόρια δηλαδή ανθεκτικές στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (πίεση, θερμοκρασία, ακτινοβολίες, χημικό περιβάλλον) δομές μεγέθους περίπου 2Χ1 μm. Ο άνθρακας είναι μια επιζωοτική νόσος που μολύνει τα άγρια και οικόσιτα φυτοφάγα ζώα όπως βοοειδή, κατσίκια και πρόβατα. Η νόσος με φυσικό τρόπο μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο που έρχεται σε επαφή με αυτά τα ζώα ή τα προϊόντα του.

Γεωγραφικά βάκιλοι του άνθρακα στη φύση εντοπίζονται κυρίως σε αγροτικές περιοχές της κεντρικής της υποσαχάριας και νότιου Αφρικής, στη Νότιο Αμερική, στην κεντρική και νοτιοδυτική Ασία, στη Νότια και Ανατολική Ευρώπη και στην Καραϊβική.



Εικόνα 6. Βάκιλος του άνθρακα σε μεγέθυνση Χ 1.500 με άσπρο χρώμα διακρίνονται τα ενδοσπόρια

### 7.4 Τρόπος δράσης-παρενέργειες:

Η ασθένεια του άνθρακα επέρχεται όταν σπόροι του *Bacillus anthracis* εισέλθουν στους ιστούς του ξενιστή. Στα ζώα συνήθως η είσοδος του γίνεται με την εισπνοή ή την κατάποση μολυσμένου χώματος, φυτών ή νερού. Γενικά η ασθένεια στον άνθρωπο προκαλείται όταν τα ενδοσπόρια του άνθρακα εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό όπου οι συνθήκες είναι κατάλληλες για να ενεργοποιηθούν και κατόπιν να πολλαπλασιαστούν και να διαχυθούν στο σώμα απελευθερώνοντας εξωτοξίνες του άνθρακα.

Η τοξίνη του άνθρακα εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα με ενδοκυττάρωση, στο ενδοσώμα, τα ενζυματικά συστατικά της τοξίνης μετατοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου στόχου. Μόλις βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, τα ενζυματικά συστατικά της τοξίνης διαταράσσουν

διάφορες λειτουργίες ανοσοκυττάρων, δηλαδή κυτταρική σηματοδότηση και μετανάστευση κυττάρων. Η τοξίνη μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρική λύση, όπως παρατηρείται στα μακροφάγα. Η τοξίνη του άνθρακα επιτρέπει στα βακτηρίδια να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα, να πολλαπλασιάζονται και τελικά να σκοτώνουν τον ξενιστή. Αναλυτικότερα η δράση της τοξίνης έχει ως εξής:

Τα μέρη της πρωτεΐνης του άνθρακα πρέπει να ενωθούν σε σύμπλοκο ολοτοξίνης για να είναι λειτουργική. Οι παράγοντες LF και EF για να δράσουν μέσα στο κύτταρο στόχο πρέπει να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα με ενδοκυττάρωση. Με μια σειρά βημάτων ο παράγων PA μπορεί να μετακινήσει τους παράγοντες EF και LF μέσα στο κύτταρο-στόχο. Η διαδικασία ξεκινά όταν η μορφή του παράγοντα PA βάρους 83-kDa που ονομάζεται PA83 προσδένεται σε υποδοχέα της τοξίνης στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια. Υπάρχουν δύο γνωστοί ομόλογοι υποδοχείς στους οποίους προσδένει ο PA83, ο TEM8 (tumor endothelium marker 8) και ο CMG2 (capillary morphogenesis protein 2) Κατόπιν ένα θραύσμα του παράγοντα PA βάρους 20 kDa (PA20) αποκόπτεται από την τελική αλληλουχία αμινοξέων του PA83 με ενδοπροτεάσες που ανήκουν στην οικογένεια των φουρίνων. Όταν το κομμάτι PA20 απομακρυνθεί το υπόλοιπο κομμάτι του PA βάρους 63 kDa, που ονομάζεται PA63, μετασχηματίζεται σε ένα επταμερές ή οκταμερές σε σχήμα δακτυλίου oligομερές. Το διαχωρισθέν κομμάτι PA20 εν συνεχεία προσδένεται στους παράγοντες LF και EF. Κατόπιν το επταμερές ή οκταμερές oligομερές PA μπορεί να ενωθεί με 3 έως 4 μόρια EF ή/και LF, αντιστοίχως. Κατόπιν με ενδοκυττάρωση η δομές PA-LF και PA-EF εισέρχονται στο κύτταρο-στόχο σε όξινη περιοχή του κυτταροπλάσματος<sup>15</sup>.

Αφού οι παράγοντες EF και LF εισέλθουν στο κυτοσόλιο ξεκινούν την καταστροφική τους δράση. Συγκεκριμένα ο EF δρα ως αδενυλική κυκλάση εξαρτώμενη από ιόντα  $Ca^{2+}$  και καλμοδουλίνη που αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα cAMP στο κύτταρο. Η αύξηση της cAMP διαταράσσει την ομοιόσταση του νερού προκαλεί ανισορροπία στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης και μειώνει την λειτουργικότητα των μακροφάγων που αποτελεί μηχανισμό μη ειδικής άμυνας του οργανισμού, επιτρέποντας τα βακτήρια του άνθρακα να εισβάλλουν περεταίρω στα κύτταρα άμυνας του οργανισμού<sup>16</sup>.

Ο παράγοντας LF επίσης βοηθά τα βακτήρια του άνθρακα να εισβάλλουν περεταίρω στα κύτταρα άμυνας του οργανισμού σκοτώνοντας μακροφάγα. Επιπλέον ο LF δρα ως ενδοπρωτεάση εξαρτώμενη από ιόντα  $Zn^{2+}$  που απενεργοποιεί το N- άκρο MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinases) αναστέλλοντας τη δράση των MAPKK με το να μην τις επιτρέπει να προσδένονται αποτελεσματικά στο υπόστρωμά τους κάτι που οδηγεί σε αλλαγή των μονοπατιών σηματοδότησης και τελικά στην κυτταρική απόπτωση.

Έτσι συνολικά η δράση συνέργειας των τριών παραγόντων AP, EF, LF οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο μέσω μιας αλληλουχίας γεγονότων που επιτρέπουν την είσοδο των παραγόντων αυτών στο κύτταρο εμποδίζοντας την ομαλή κυτταρική λειτουργία.



Στον άνθρωπο υπάρχουν τέσσερις τρόποι μόλυνσης η δερματική, με κατάποση , με εισπνοή και με ένεση.

Στη δερματική μόλυνση που αποτελεί το συνηθέστερο τρόπο μόλυνσης, έχουμε είσοδο από κάποια ασυνέχεια του δέρματος που μπορεί να προκληθεί όταν ο άνθρωπος έρθει σε επαφή με κάποιο προϊόν μολυσμένου ζώου και προκαλεί χαρακτηριστικές βλάβες στο δέρμα. Η λοίμωξη αναπτύσσεται συνήθως σε μια με επτά ημέρες από την έκθεση. Αρχικά σχηματίζονται μικρές κύστη που κάποιες φορές προκαλούν φαγούρα και εν συνεχεία προκαλείται οίδημα. Μετά από μερικές ημέρες επέρχεται ρήξη της κύστης και η ουλή έχει ανθρακί χρώμα από όπου προέρχεται και το όνομα της ασθένειας. Σύνηθες σημεία τέτοιων πληγών είναι ο πρόσωπο, ο αυχένας τα χέρια και οι παλάμες. Ιστολογικά οι προκαλούμενες αλλοιώσεις παρουσιάζουν νέκρωση, διείσδυση λεμφοκυττάρων και οίδημα.

Χωρίς κατάλληλη θεραπεία η δερματική μόλυνση με άνθρακα μπορεί να έχει ποσοστό θνησιμότητας έως και 25%. Με τη κατάλληλη θεραπεία με αντιβιοτικά το ποσοστό θνησιμότητας μειώνεται στο 1% , η βλάβη συνήθως επουλώνεται σε λίγες εβδομάδες και αφήνει ένα περιορισμένο σημάδι. Η κύρια επιπλοκή αυτής της μορφής της ασθένεια είναι η συστηματική εξάπλωση των βακτηριδίων όπου προκύπτει δυνητικά θανατηφόρος σηψαιμία.

Στην μόλυνση από κατάποση ωμού ή μη σωστά μαγειρεμένου κρέατος από ζώο που έχει μολυνθεί από άνθρακα ή τρόφιμο στο οποίο σκοπίμως έχει προστεθεί ικανή ποσότητα σπόρων βάκιλου του άνθρακα προκαλείται γαστρεντερολογική μόλυνση από άνθρακα η οποία είναι σπάνια. Αφού καταποθούν οι σπόροι του άνθρακα, μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα δηλαδή στο λαιμό και στον οισοφάγο, στο στομάχι και στα έντερα. Ο χρόνος επώασης εδώ είναι όπως και στη δερματική μόλυνση είναι 1-7 ημέρες.



Εικόνα 7. Δεξιά πλάγια όψη του λαιμού ενός ασθενούς, στην οποία είναι εμφανείς η δερματική βλάβη από άνθρακα.

Τα συμπτώματα στη γαστρεντερική μόλυνση με άνθρακα περιλαμβάνουν πυρετό και ρίγος, οίδημα στις αμυγδαλές, πονόλαιμο, πόνο κατά την κατάποση, βραχνάδα, ζάλη και έμετο

κυρίως αιματηρό, διάρροια με ή χωρίς αίμα, πονοκέφαλο, εξάψεις με κόκκινο πρόσωπο και μάτια, στομαχόπονο, λιποθυμία και πρήξιμο στο στομάχι

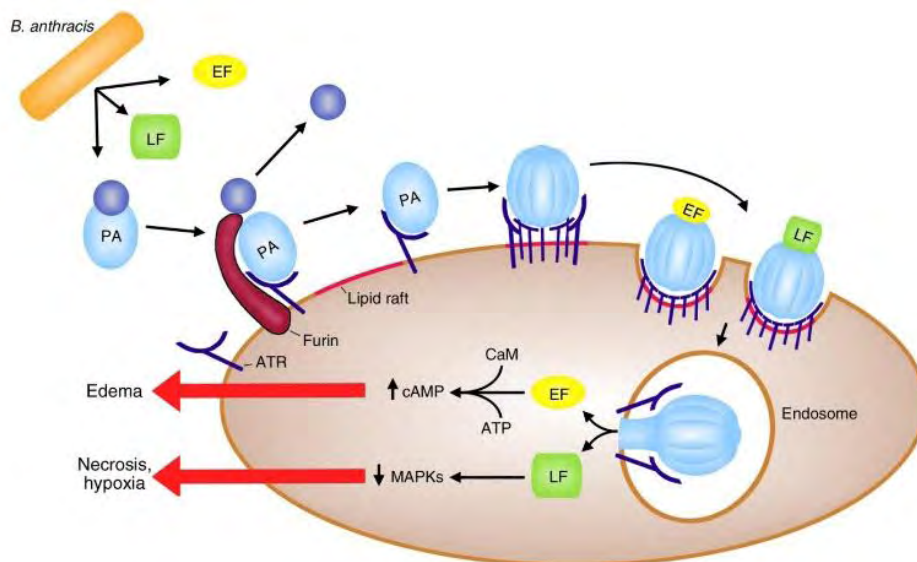
Χωρίς κατάλληλη θεραπεία η γαστρεντερική μόλυνση με άνθρακα είναι θανατηφόρα για περισσότερο από το 50% των ασθενών, ενώ με κατάλληλη θεραπεία το 60% των ασθενών επιβιώνει.

Στην μόλυνση με εισπνοή το άτομο εισπνέει σπόρους του βάκιλου του άνθρακα , αυτό μπορεί να συμβεί σε εργασιακούς χώρους που επεξεργάζονται μολυσμένα με άνθρακα ζώα ή προϊόντα τέτοιων ζώων όπως εργοστάσια επεξεργασίας μαλλιού, σφαγεία και βυρσοδεψία αλλά και σε περιστατικά βιοτρομοκρατίας. Ο ρυθμός αποσύνθεσης της αερολυμένης τοξίνης έχει εκτιμηθεί σε 1-4% ανά λεπτό, ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες<sup>17</sup>. Η μόλυνση εδώ ξεκινάει από τους λεμφαδένες στο στήθος πριν μεταδοθεί στο υπόλοιπο σώμα προκαλώντας τελικά βαριά αναπνευστικά προβλήματα και σοκ.

Τα συμπτώματα στην μόλυνση μέσω αναπνευστικής οδού περιλαμβάνουν πυρετό και ρίγος, δυσφορία στο στήθος, δυσκολία στην αναπνοή, ζαλάδα , βήχα, ναυτία, εμετό ή στομαχικό πόνο, πονοκέφαλο, έντονη εφίδρωση, υπερβολική κούραση και πόνους σε όλο το κορμί. Η μόλυνση με άνθρακα μέσω αναπνευστικής οδού θεωρείται η πλέον θανατηφόρα μορφή μόλυνσης. Η λοίμωξη αναπτύσσεται μέσα σε μια εβδομάδα από την μόλυνση αλλά μπορεί να διαρκέσει έως και 2 μήνες. Χωρίς κατάλληλη θεραπεία μόνο το 10-15% των ασθενών επιβιώνει. Με κατάλληλη όμως «επιθετική» θεραπεία περίπου το 55% των ασθενών επιβιώνει. Ο συγκεκριμένος τρόπος μόλυνσης είναι σπάνιος και σε οποιοδήποτε τέτοιο περιστατικό διερευνάται το ενδεχόμενο βιοτρομοκρατίας.

Τέλος ένας σχετικά πρόσφατος τρόπος μόλυνσης με άνθρακα που εμφανίστηκε κυρίως σε χρήστες ναρκωτικών στην Βόρεια Ευρώπη είναι μέσω ένεσης<sup>18</sup>. Τα συμπτώματα εδώ είναι παρόμοια με αυτά της δερματικής μόλυνσης η οποία επιπλέον μπορεί να προχωρήσει και κάτω από το δέρμα ή και ενδομυϊκά όπου χορηγείται η ναρκωτική ουσία. Στην ενέσιμη μόλυνση οι βάκιλοι του άνθρακα εξαπλώνονται εντός του ανθρωπίνου οργανισμού ταχύτερα και είναι δυσκολότερο να αναγνωριστούν και να θεραπευτούν καθώς δεν είναι πάντα ορατά τα σημάδια όπως στη δερματική μόλυνση αλλά και γιατί δύναται σημάδια στο δέρμα να έχουν να κάνουν με άλλες μολύνσεις στο σημείο εισαγωγής της σύριγγας χωρίς την παρουσία στελεχών άνθρακα.





Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση τρόπου δράσης τοξίνης άνθρακα.

## 7.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Οι σπόροι του βάκιλου του άνθρακα είναι από τους πλέον πιθανούς βιολογικούς παράγοντες για να χρησιμοποιηθούν σε τρομοκρατικές επιθέσεις και έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Ανήκουν στην κατηγορία A του CDC στη λίστα της CIA και στην λίστα του AG.

Οι παράγοντες που θα έκαναν πιθανή τη χρήση σπόρων βάκιλου του άνθρακα και κατ' επέκταση και την τοξίνη που παράγουν και ευθύνεται για τη δράση τους από τρομοκράτες είναι οι εξής:

- Βρίσκονται εύκολα στη φύση, μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο.
- Είναι ανθεκτικοί σε περιβαλλοντικές συνθήκες και επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα
- Είναι άγευστοι, άοσμοι και αόρατοι με γυμνό μάτι.
- Μπορούν λόγω μεγέθους και ανθεκτικότητας να γίνει διασπορά τους σε σπρέι, σκόνης, σε τρόφιμα και νερό.
- Έχουν μεγάλη δραστηριότητα και προκαλούν σοβαρές παρενέργειες ή ακόμη και το θάνατο ειδικά σε περίπτωση εισπνοής.
- Υπάρχει τεχνογνωσία στην παραγωγή, επεξεργασία και χρήση τους από προηγούμενες τρομοκρατικές επιθέσεις.

## 7.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
MALDI TOF	Αρχικά ο LF αιχμαλωτίζεται και συγκεντρώνεται σε μονόκλωνα αντισώματα που σταθεροποιούνται από ορο σε magnetic protein G beads. Κατόπιν το LF υδρολύεται σε δύο μικρότερα πεπτίδια. Διάρκεια 4 ώρες.	0.05 ng/ml	Ορός rhesus macaques που μολύνθηκαν από B. anthracis	19
Real time PCR	Ανίχνευση τμήματος του γενετικού υλικού του Bacillus anthracis (χρωμοσωμική αλληλουχία BA5345) αλλά και ανίχνευση των γονιδίων rag και cap που βρίσκονται στα πλασμίδια pXO1 και pXO2. Διάρκεια 24 ώρες.	16,8 αντίγραφα γενετικού υλικού	Διάλυμα απομονωμένου γενετικού υλικού	20
Real-Time PCR	Ανίχνευση του Bacillus anthracis μέσω του γονιδίου proB.Χρήση τεχνολογίας FRET fluorescence resonance energy transfer).Διάρκεια 1 ώρα.	1 pg	Απομονωμένο DNA καθώς και ακατέργαστα κυτταρολύματα κυττάρων	21
Lateral-flow immunochromatographic assay (LFIA)	Ανίχνευση με φορητή συσκευή του προστατευτικό αντιγόνο (PA) της τοξίνης μέσω μέτρησης των επιπέδων anti-PA IgG με χρήση νανοσωματίδιων κολλοειδούς χρυσού ως το αντιδραστήριο ανίχνευσης. Διάρκεια 5-10 λεπτά.	3-14 μg of PA/ml	Αίμα και ορός αίματος	22
Endopep-MS	Επιλεκτική δέσμευση και συγκέντρωση LF από μονοκλωνικά αντισώματα, ενζυματική μεγέθυνση από ειδικό υπόστρωμα διάσπαση LF και ανίχνευση χρησιμοποιώντας αραίωση ισότοπου. Διάρκεια 2-18 ώρες εκ των οποίων το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα καταναλώνεται την επώαση του διαλύματος.	0.005-0.015 ng/mL	Ορός αίματος	23
Rapid mouse bioassay	Ενδοπεριτονιακή χορήγηση δείγματος που περιέχει B. Anthracis.Μικροσκοπικός έλεγχος δειγμάτων ιστών σε κατάλληλη χρώση. Διάρκεια 3-4 ώρες.	Ποιοτική μέθοδος	Μολυσμένος από B. anthracis ιστός ή εναιώρημα φυτικών κυττάρων. Σπόροι B. anthracis	24

Πίνακας 2. Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευση άνθρακα-τοξίνης άνθρακα από βιβλιογραφικές πηγές.

## 8. ΤΟΞΙΝΗ ΑΛΛΑΝΤΙΑΣΗΣ (BOTULINUM NEUROTOXIN BoNT)

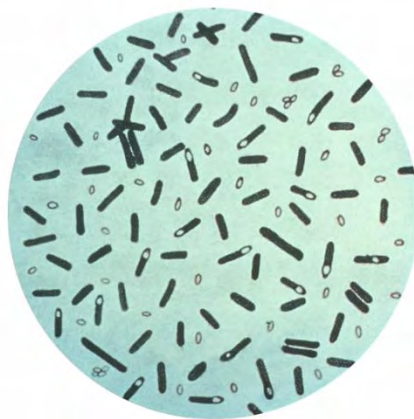
### 8.1 Ιστορικά δεδομένα:

Η αλλαντίαση (botulism) προέρχεται από την λατινική λέξη “botulus” που σημαίνει λουκάνικο και χρησιμοποιήθηκε στην κεντρική Ευρώπη τον 18ο αιώνα για να χαρακτηρίσει μια ασθένεια που σχετιζόταν με μυϊκή παράλυση, δύσπνοια, και υψηλή θνησιμότητα και συνδέονταν με την κατανάλωση ωμών λουκάνικων. Μια κρίση αλλαντίασης που συνέβη στο Ελεζέλ του Βελγίου το 1895 και σχετιζόταν με κατανάλωση σπιτικού παστού χοιρινού ερευνήθηκε από τον βακτηριολόγο Émile van Ermengem που συμπέρανε ότι η ασθένεια πιθανότατα προκαλούνταν από αναερόβια ανάπτυξη μικροοργανισμών, ότι πρόκειται για δηλητηρίαση από τοξίνη και όχι για μόλυνση και ότι η τοξίνη παράγονταν από ενδοσπόρια αναερόβιων βακτηρίων<sup>25</sup>.

Πριν τον πόλεμο του Κόλπου το Ιράκ παρήγαγε 20.000 λίτρα BoNT με παράλληλη παραγωγή οπλικών κεφαλών που περιείχαν την τοξίνη. Αρκετές ομάδες τρομοκρατών πειραματίστηκαν με την BoNT συμπεριλαμβανομένων και μελών της Aum Shinrikyo γνωστή για το τρομοκρατικό χτύπημα με αέριο sarin στο μετρό του Τόκιο το 1995.

### 8.2 Οργανισμοί προέλευσης:

Οι BoNT είναι εξωτοξίνες, παράγονται και εκκρίνονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες από τα Gram-θετικά βακτήρια *Clostridium botulinum* που αποτελούν ετερογενές είδος οργανισμών και κατηγοριοποιούνται με βάση την νευροτοξίνη της αλλαντίασης που παράγουν και όχι με την φυλογενετική τους συγγένεια. Υπάρχουν τέσσερις ομάδες *C. Botulinum* η I, II, III και IV. Το προτεολυτικό *C. Botulinum* της ομάδας I παράγει αλλαντοτοξίνες των τύπων A, B ή F και το μη-προτεολυτικό *C. Botulinum* της ομάδας II παράγει αλλαντοτοξίνες των τύπων B, E ή F. Τα δύο αυτά στελέχη διαφέρουν σημαντικά γενετικά ευθύνονται για τις περισσότερες περιπτώσεις αλλαντίασης<sup>26</sup>. Τα εν λόγω βακτήρια υπάρχουν στο έδαφος και σε υδάτινα ιζήματα παγκοσμίως, αναπτύσσονται και παράγουν τις αλλαντοτοξίνες κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Η γενετική πληροφορία που κωδικοποιεί την παράγωγή τους μπορεί να είναι χρωμοσωμική ή πλασμιδιακή. Υπάρχουν δύο ακόμη είδη οργανισμών που παράγουν αλλαντοτοξίνες το *Clostridium butyricum* και το *Clostridium barati*.



Εικόνα 8. Κλωστρίδιο της αλλαντίασης (*Clostridium botulinum*) με χρώση gentian violet.

### 8.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:

Οι BoNT (CAS Registry Number: 93384-43-1) ανήκουν στις ενδοπεπτιδάσες ψευδαργύρου είναι πρωτεΐνες μοριακού βάρους περί των 150 kDa και ανήκουν στις νευροτοξίνες. Οι BoNT επιπλέον είναι τοξίνες τύπου A-B και περιέχουν δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που αναφέρονται ως αλυσίδες A και B που παίζουν διαφορετικούς ρόλους και συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό και μια μη τοξική αιμοσυγκολλητίνη. Η ελαφριά αλυσίδα A έχει μοριακό βάρος περί των 50 kDa και η βαριά αλυσίδα B έχει μοριακό βάρος περί των 100 kDa. Η βαριά πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι αυτή που προσδένει στις συνάψεις ακατυλοχολίνης των περιφερειακών νευρικών κυττάρων. Η ελαφριά αλυσίδα είναι μια πρωτεάση που περιέχει ψευδάργυρο και δρα κολλώντας σε πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στο μηχανισμό απελευθέρωσης ακετυλοχολίνης (SNAP-25, συνταξίνη συναπτομπεβίνη-VAMP)<sup>27</sup>.

Σε καλλιέργειες οι BoNT συνδέονται με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας πρωτεϊνικά συμπλέγματα βάρους 300-900 kDa. Οι BoNT είναι υδατοδιαλυτές, δεν εμφανίζουν σταθερότητα στη θέρμανση και σε υδατικό διάλυμα δεν αντέχουν στο σημείο βρασμού του νερού σε καθαρή μορφή, όμως είναι ανθεκτικές για εκτεταμένο χρονικό διάστημα όταν βρίσκονται στα ενδοσπόρια των βακτηρίων που τις παράγουν. Υπάρχουν 7 βασικοί-διακριτοί τύποι τοξινών αλλαντίασης ως προς την αντιγονικότητά τους, που συμβολίζονται με τα λατινικά γράμματα A,B,C,D,E,F,G και ένας αριθμός υπό-τύπων (π.χ. για τον τύπο A υπάρχουν πέντε υπο-τύποι οι A1,A2,A3,A4,A5). Οι νευροτοξίνες του κάθε τύπου διαφέρουν έως και 70% σε επίπεδο αμινοξέων ενώ οι υπο-τύποι διαφέρουν μεταξύ 2,6-32%<sup>28</sup>. Οι πιο κοινοί τύποι που επηρεάζουν τον άνθρωπο είναι οι A,B,E και σπανίως η F, οι τύποι C,D και E προκαλούν ασθένεια σε άλλα θηλαστικά, πουλιά και ψάρια.

Οι BoNT απενεργοποιούνται σχετικά εύκολα. Σε φαγητά ή ποτά η θέρμανση στους 85°C για 5 λεπτά είναι αρκετή. Παρόλα αυτά τα βακτήρια *Clostridium botulinum* έχουν το χαρακτηριστικό να σχηματίζουν ενδοσπόρια κάτω από ακραίες προς αυτά περιβαλλοντικές συνθήκες, τα οποία είναι ανθεκτικά στην επεξεργασία και μαγείρεμα των τροφών και βλαστάνουν όταν οι

συνθήκες γίνουν ξανά ευνοϊκές για αυτά<sup>29</sup>. Το θετικό σε αυτή την περίπτωση είναι ότι οι ευνοϊκές συνθήκες εκβλάστησης των ενδοσπορίων απαιτούν αναερόβιες συνθήκες, βασικό pH και χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και ζάχαρη κάτι που δεν είναι σύνηθες στις τροφές, για αυτό και είναι σπάνιες οι περιπτώσεις αλλαντίασης από τρόφιμα. Σε αερομεταφερόμενη μορφή η τοξίνη αποσυντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες ή υγρασία. Ο ρυθμός αποσύνθεσης σε αεροζόλ υπολογίζεται σε 1-4% ανά λεπτό.

#### 8.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Οι BoNT αποτελούν τις πλέον ισχυρές τοξίνες που απαντώνται στη φύση, (στα ποντίκια  $LD_{50}=1$  ng/Kg για τον τύπο A) και είναι 100 δισεκατομμύρια φορές τοξικότερες από το κυάνιο. Οι BoNT είναι ενεργές είτε με την κατάποση είτε με εισπνοή (δεν συμβαίνει με φυσικό τρόπο) και η κλινική εικόνα του ασθενούς είναι παρόμοια και στους δύο τρόπους εισόδου στον οργανισμό.

Η δράση των αλλαντοτοξίνων έχει να κάνει με την επίδραση που ασκούν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την νευρική ενεργοποίηση, αποκλείοντας την περιφερική απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στις προσυναπτικές χολινεργικές νευρικές απολήξεις μέσω της αποδόμησης της SNAP-25, μίας πρωτεΐνης η οποία είναι απαραίτητη για την επιτυχημένη προσκόλληση και απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης από τα κυστίδια που ανευρίσκονται εντός των νευρικών απολήξεων

Αρχικά η βαριά αλυσίδα της αλλαντοτοξίνης συνδέεται ειδικά με νεύρα που χρησιμοποιούν τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Κατόπιν ο νευρώνας περικλείει την τοξίνη σε ένα κυστίδιο το οποίο καθώς κινείται εντός του νευρώνα οξειδώνεται ενεργοποιώντας τμήμα της τοξίνης που ενεργοποιεί την εξώθηση της στο άκρο του κυστιδίου και εντός του κυτταροπλάσματος του νευρώνα. Αφού εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του νευρώνα η ελαφριά αλυσίδα την αλλαντοτοξίνης ενώνεται με SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) πρωτεΐνες εμποδίζοντας το νευρώνα να απελευθερώσει κυστίδια του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνης. Το αποτέλεσμα είναι να εμποδίζεται η επικοινωνία των νευρικών κυττάρων κάτι που οδηγεί σε παράλυση.



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της δομής της BoNT (A) και κρυσταλλική δομή της BoNT/A (B)<sup>30</sup>

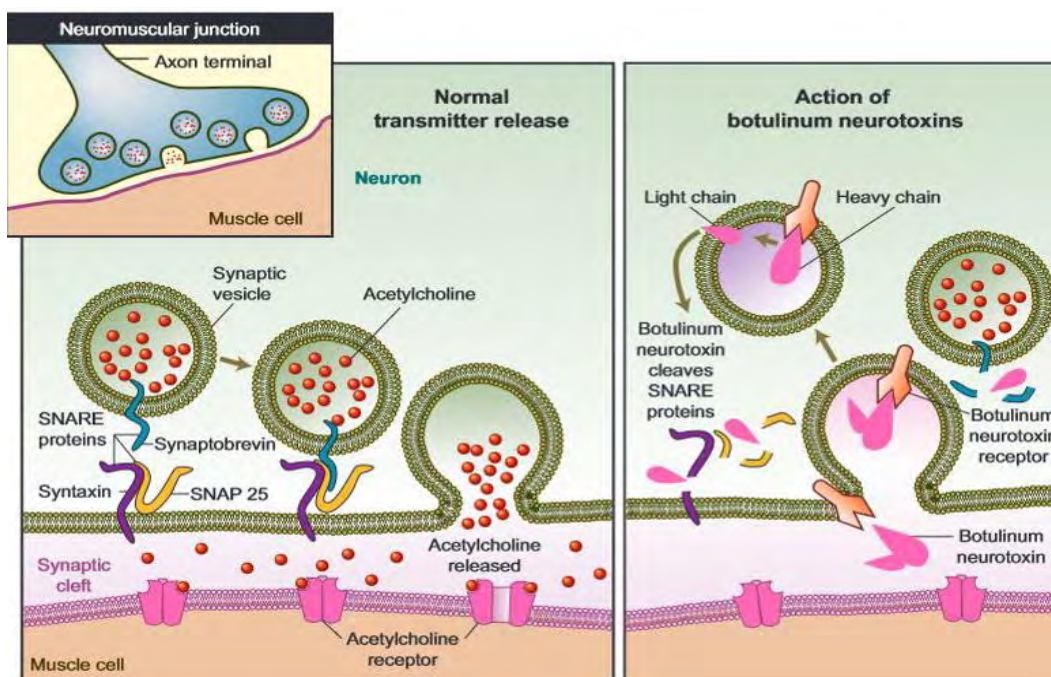
Τα συμπτώματα τοξικότητας των αλλαντοτοξίνων κατόπιν εισπνοής ή κατάποσης εμφανίζονται συνήθως μεταξύ 12 έως 36 ωρών (μέγιστο χρονικό εύρος 4 ώρες έως 8 ημέρες) και ο χρόνος εμφάνισης είναι δόσοεξαρτώμενος, δηλαδή μεγαλύτερη δόση συνεπάγεται μικρότερο χρονικό διάστημα εμφάνισης των συμπτωμάτων. Τα αρχικά συμπτώματα περιλαμβάνουν κόπωση, αδυναμία και ίλιγγο ακολουθούμενα από εμφανή δυσλειτουργία των κρνιακών νέρων IX, X, XI και XII με θολή όραση λόγω διαστολής της κόρης του ματιού, διπλοπία και φωτοφοβία, βλεφαρόπτωση με παράλληλα συμπτώματα δυσκολίας στην άρθρωση λόγου, φωνής και κατάποσης. Στη συμπτωματολογία μπορεί να περιλαμβάνεται έμετος, διάρροια ή δυσκοιλιότητα και πρήξιμο στην κοιλιακή χώρα. Ακολουθεί παράλυση των σκελετικών μυών όπως αυτών των χεριών και των ποδιών με συμμετρική προοδευτική αδυναμία. Η ολοκλήρωση της συμπτωματολογίας είναι η απότομη αναπνευστική ανεπάρκεια. Η αλλαντίαση είναι θανατηφόρα σε ποσοστό 5-10% των περιπτώσεων και απαιτεί γρήγορη διάγνωση και άμεση θεραπεία με αντιτοξίνη και αναπνευστική υποστήριξη.

Η μέση θανατηφόρα δόση της αλλαντοτοξίνης A στον άνθρωπο για την κρυσταλλική καθαρή τοξίνη BoNT τύπου A είναι 0,09-0,15  $\mu\text{g}$  για ένα άνθρωπος των 70 kg, όταν εισάγεται ενδοφλέβια ή ενδομυϊκά 0,7-0,9  $\mu\text{g}$  όταν εισαχθεί με εισπνοή και 70  $\mu\text{g}$  όταν εισαχθεί από το στόμα<sup>31</sup>. Σε περίπτωση εμφάνισης περιστατικού αλλαντίασης με εισπνοή επειδή δεν μπορεί να συμβεί με φυσικό τρόπο υπάρχει συσχέτιση με ατύχημα ή με τρομοκρατική επίθεση με μόλυνση του αέρα με αλλαντοτοξίνες σε μορφή αεροζόλ.

Πέραν της κατάποσης και της εισπνοής αλλαντοτοξίνων, αλλαντίαση μπορεί να προκύψει με δύο ακόμη τρόπους. Ο ένας αφορά τα νεογνά κάτω των 6 μηνών όταν αυτά λάβουν με την τροφή ενδοσπόρια *Clostridium botulinum* τα οποία βλαστάνουν μετατρέπονται κατόπιν σε ενεργά στελέχη που σχηματίζουν αποικίες στο γαστρεντερικό σωλήνα και απελευθερώνουν αλλαντοτοξίνες, κάτι που δεν μπορεί να συμβεί σε ενήλικες και παιδιά άνω των 6 μηνών καθώς η φυσική άμυνα του οργανισμού αποτρέπει την ενδοσπόρια να μετασχηματιστούν σε ενεργά βακτήρια. Τέτοια περιστατικά υπήρξαν σε περιπτώσεις μολυσμένου μελιού με



ενδοσπóρια *Clostridium botulinum*, για αυτό και υπάρχει σαφής προειδοποίηση σε γονείς και φροντιστές παιδιών να μην ταΐζουν με μέλι βρέφη κάτω του έτους. Ο δεύτερο τρόπος αφορά την αλλαντίαση από κάποιο τραύμα. Η περίπτωση αυτή είναι ιδιαίτερα σπάνια και συμβαίνει όταν από κάποια ανοικτή πληγή που προκαλεί ασυνέχεια του δέρματος εισέλθουν ενδοσπóρια *Clostridium botulinum* μετατραπούν σε ενεργά στελέχη και σε αναερόβιες συνθήκες εκκρίνουν αλλαντοτοξίνες. Εδώ τα συμπτώματα αργούν να εμφανιστούν και μπορεί χρονικά να ξεκινήσουν και μετά από 2 εβδομάδες. Τέτοια περιστατικά έχουν εμφανιστεί σε ναρκομανείς και ειδικά σε άτομα που έκαναν ενέσιμη ακετυλιωμένη ηρωίνη (black tar)<sup>32</sup>.



Σχήμα 8 . Αριστερά έχουμε φυσιολογική απελευθέρωση ακετυλοχολίνης και δεξιά έχουμε μη ομαλή απελευθέρωση ακετυλοχολίνης λόγω BoNT<sup>33</sup>

### 8.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Οι αλλαντοτοξίνες κυρίως η Α και η Β αποτελούν παράγοντα βιοτρομοκρατίας λόγω της υψηλής τους θανατηφόρου τοξικότητας (αποτελούν τις πλέον τοξικές γνωστές τοξίνες). Ένα γραμμάριο καθαρής κρυσταλλικής BoNT θεωρητικά με ομαλή κατανομή και εισπνοή θα μπορούσε να σκοτώσει περισσότερους από ένα εκατομμύριο ανθρώπους<sup>34</sup>. Για το λόγο αυτό ανήκει στην Α κατηγορία της CDC, ανήκει στην AG και στη λίστα της CIA επιπλέον αποτελεί απαγορευμένη ουσία του Biological Weapons Convention. Οι κύριοι τρόπου πρόκλησης της συγκεκριμένης νόσου είναι με την εισπνοή τοξινών ή με την χορήγηση του μέσω τροφής.

Οι παράγοντες που θα έκαναν πιθανή τη χρήση των SEB από τρομοκράτες είναι οι εξής:

- Εξαιρετικά υψηλή τοξικότητα (Η πλέον τοξική τοξίνη)
- Ανθεκτικότητα σε μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Ευκολία και χαμηλό κόστος παραγωγής καθόσον τα βακτήρια που τις παράγουν είναι ευρέως διαθέσιμα αλλά και το γεγονός ότι υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα που περιέχουν

αλλαντοτοξίνες για ιατρικούς και κοσμητικούς σκοπούς (botox) από τα οποία μπορούν να απομονωθούν.

-Η δυνατότητα προσθήκης τους σε αεροζόλ για ψεκασμό καθώς μπορούν να αποθηκευτούν σε μορφή σκόνης.

- Η δυνατότητα προσθήκης τους σε τροφές και ποτά που δεν θα θερμανθούν προ της κατανάλωσης.



## 8.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης:

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
Mouse bioassay	Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δείγματος σε λευκά ποντίκια και εύρεση minimumLD50. Διάρκεια 3-4 ημέρες.	10–20 pg/mL	Διάλυμα που περιείχε BoNT/A	35
Amplified ELISA	Η τοξικότητα του δείγματος που προσδιορίστηκε με ELISA εκτιμήθηκε συγκρίνοντας τα δείγματα με μία πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε με πρότυπη νευροτοξίνη τύπου Α σε ρυθμιστικό διάλυμα καζεΐνης. Διάρκεια 8 ώρες	0,2-1ng/ml	BoNT/A/B/E/F σε δείγματα φαγητού (τσίλι, πατάτα)	36
ELISA based protein antibody microarray	Ταυτόχρονη ανίχνευση των ορότυπων του BoNT. Διάρκεια 24 ώρες	0.2-2.2 pg/ml	BoNT/A/B/C/D/E/F σε ρυθμιστικό διάλυμα BSA και γάλα.	37
Endopep MS	Εξαγωγή του αντισώματος της τοξίνης επώαση της τοξίνης με το υπόστρωμα του πεπτιδίου .Διάρκεια 3 ώρες	1 mLD50	BoNT/A/σε τ γάλα.	38
Immuno-PCR	Χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (BT57-1) και PCR στο DNA που προσκολλήθηκε στο αντίσωμα. Διάρκεια 8 ώρες	5pg	Διάλυμα που περιείχε BoNT/A	39
Lateral flow immunoassays	Χρήση λιποσωμάτων GT1b σε ταινία δοκιμής μορφής sandwich. Διάρκεια 20 λεπτά.	15-150 pg/ml	Λαχανικά και θαλασσινά	40
Radioimmunoassay	Χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων από κουνέλι. Χρήση καθαρής τοξίνης BoNT/A με σήμανση με ισότοπο Ιωδίου 131. Διάρκεια 8 ώρες	100 MLD5	Διάλυμα που περιείχε BoNT/A	41

Πίνακας 3. Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευση BoNT από βιβλιογραφικές πηγές.

## 9. ΤΟΞΙΝΗ ΡΙΚΙΝΗΣ (RICIN TOXIN -RT) ΚΑΙ ΑΜΠΡΙΝΗΣ (ABRIN TOXIN-AT)

### 9.1 Ιστορικά δεδομένα:

Οι τοξίνες της Ρικίνης (RT) και της Αμπρίνης (AT) εξετάζονται μαζί λόγω κοινών μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών αλλά και παρόμοιου τρόπου δράσης και προκαλούμενων παρενεργειών.

Οι καρποί του ρικίνου ήταν γνωστοί από την αρχαιότητα και χρησιμοποιήθηκαν από τους αρχαίους Έλληνες και Αιγύπτιους και περιγράφονται στο Σανσκριτικό γραπτό του 6ου Αιώνα π.Χ. *Susruta Ayurveda*. Ο Ηρόδοτος το φυτό αυτό το ονομάζει «Σιλλικύπριον» λέει δε ότι οι Αιγύπτιοι το καλλιεργούσαν στις όχθες των ποταμών και των λιμνών, ενώ στην Ελλάδα ήταν έκτοτε αυτοφυές. Κάνει επίσης λόγο για τον τρόπο με τον οποίο έβγαζαν το λάδι από τους σπόρους. Αυτό το λάδι, το σημερινό ρετσινόλαδο, ήτανε παχύ και χρησίμευε και για φωτισμό. Ο Θεόφραστος ονόμαζε το φυτό αυτό «Κρότωνα», ο δε Διοσκουρίδης το αναφέρει υπό το όνομα Κίκι, Κρότων και Σέσελι Κύπριον λέει δε ότι αυτό ονομάζεται Κρότων διότι το σπέρμα του μοιάζει με τον Κρότωνα δηλαδή το τσιμπούρι που κάθεται στο σώμα των σκυλιών και των προβάτων. Ο Πλίνιος επίσης αναφέρει ότι το λάδι του χρησίμευε για φωτισμό. Ο Διοσκουρίδης το περιγράφει ως εξής: Είναι δένδρο που έχει μέγεθος μικρής συκιάς. Ότι έχει φύλλα που μοιάζουν με τα πλατάνια, άλλα αυτά είναι μεγαλύτερα, τελειότερα και σκουρότερα. Οι κλάδοι του είναι κοίλοι όπως το καλάμι, ο δε καρπός του βρίσκεται μέσα σαν σε τσαμπί σταφυλιού και όταν εκλεπισθεί μοιάζει σαν τον Κρότωνα (το τσιμπούρι) των ζώων.

Υπήρξαν αρκετές αναφορές χρήσης ρικίνης ως όπλο βιοτρομοκρατίας στο παρελθόν. Μια βόμβα, που περιέχει, RT με την κωδική ονομασία « compound W», αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε από τις Ηνωμένες Πολιτείες, σε συνεργασία με τη Βρετανία, πριν τον Α΄ Παγκόσμιο Πόλεμο. RT χρησιμοποιήθηκε σε μορφή ένεσης που χορηγήθηκε από ένα σφαιρίδιο που εισήλθε από την άκρη μιας ομπρέλας από περαστικό στο πόδι του ο Βούλγαρου αντικαθεστωτικού δημοσιογράφου-συγγραφέα Georgi Markov που ζούσε στο Λονδίνο, το 1978 με αποτέλεσμα τον θάνατό του μετά από τρεις ημέρες<sup>42</sup>. Το 1994 και το 1995, τέσσερις άντρες από μια ομάδα διαμαρτυρίας ενάντια στη φορολογία είχαν καταδικαστεί για κατοχή ρικίνης ως βιολογικό όπλο. Σχέδια που συνδέονται με την Αλ Κάιντα για την παραγωγή ρικίνης βρέθηκαν στο Αφγανιστάν τον Νοέμβριο του 2001<sup>43</sup>. Τον Οκτώβριο του 2003 ένα πακέτο που περιείχε RT και ένα απειλητικό σημείωμα εστάλησαν σε ταχυδρομικό γραφείο της Νότιας Καρολίνας<sup>44</sup>. Τον Μάιο και τον Ιούνιο του 2004, καρποί ρικίνης βρέθηκαν σε βάζα της επιδόρπιου γιαουρτιού μπανάνας της εταιρίας Gerber στην Καλιφόρνια. Για την AT δεν έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα χρήση της σε τρομοκρατική επίθεση.

## 9.2 Οργανισμοί προέλευσης:

Η RT και η AT ανήκουν στις φυτοτοξίνες και μάλιστα αποτελούν έως τώρα τις πλέον γνωστές δηλητηριώδεις φυτοτοξίνες. Η RT παράγεται από τους καρπούς του τροπικού φυτού Ρίκινος ο κοινός (*Ricinus communis*) της οικογένειας των Ευφορβιοειδών (*Euphorbiaceae*) που στα λατινικά σημαίνει τσιμπούρι λόγω τις ομοιότητας των καρπών του με παραφουσκωμένα τσιμπούρια και είναι γνωστός στη χώρα μας και ως ρετινολαδιά, κίκι, χαμοκουκιά, κολοκκίκι και κρότωνας. Από τους καρπούς του συγκεκριμένου φυτού παράγεται το καστορέλαιο ή ρετινολάδο το οποίο παράγεται με εξαγωγή εν θερμώ μια διαδικασία που καταστρέφει την τοξίνη. Μικρό ποσοστό της παραγωγής του καστορέλαιου χρησιμοποιείται στην ιατρική ως καθαρτικό, ενώ η μεγαλύτερη ποσότητα χρησιμοποιείται στη βιομηχανία ως λιπαντικό, στο καστορέλαιο δεν περιέχεται RT καθόσον αυτή είναι υδατοδιαλυτή και κατά την διαδικασία εκχύλισης απομακρύνεται ως παραπροϊόν.

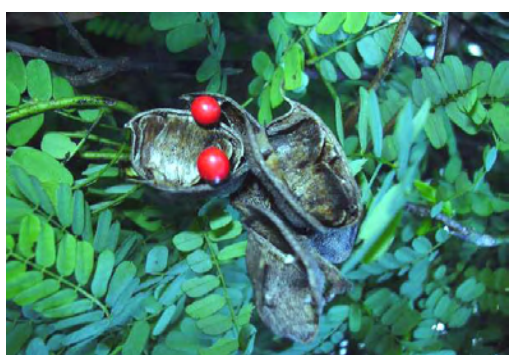
Η AT παράγεται από τους καρπούς του φυτού *Abrus precatorius* γνωστό και με την ονομασία rosary pea.



Εικόνα 9. Φυτό *Ricinus communis*



Εικόνα 10. Καρποί ρίκινου



Εικόνα 11. Φυτό *Abrus precatorius*



Εικόνα 12. Καρποί rosary pea

## 9.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:

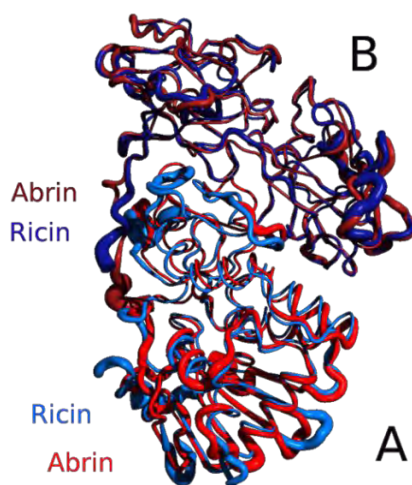
Η RT (CAS 9009-86-3) και η AT (CAS 1393-62-0) είναι γλυκοπρωτεΐνες (τοξαλβουμίνες) σχετικά μικρού μοριακού βάρους 60-65 kDa, και ταξινομούνται στις τύπου 2 πρωτεΐνες ριβοσωμικής απενεργοποίησης (RIPs) που ονομάζονται και ολοτοξίνες (holotoxins), είναι

κυτταροτοξίνες χωρίς επιλεκτικότητα σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες την Α και την Β μοριακού βάρους 32 και 34 kDa αντίστοιχα που ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές<sup>45</sup>.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα Α RTA (Ricin toxic A chain) είναι μια Ν-γλυκοσυ υδρολάση που απαρτίζεται από 267 αμινοξέα με τρεις δομικούς υποτομείς με περίπου το 50% της πολυπεπτιδικής αλυσίδας να είναι δομημένη σε α-έλικες και σε οκτώ β-πτυχωτές επιφάνειες. Οι τρεις υποδομές σχηματίζουν ένα «κλειδί» που είναι το ενεργό μέρος της RT. Αντίστοιχης δομής είναι η Α πολυπεπτιδική αλυσίδα της αμπρίνης ATA (Abrin toxic A chain) με μόνη διαφορά των αριθμό των αμινοξέων που εδώ είναι 251.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα Β RTB (Ricin toxic B chain) είναι μια λεκτίνη που απαρτίζεται από 262 αμινοξέα και δομικά μπορεί να προσδεθεί σε υπολείμματα γαλακτοζης στην επιφάνεια των κυττάρων. Η RTB σχηματίζει μια δομή με δύο λοβούς πως ένας αλτήρας άνευ α-ελίκων και β-πτυχωτών επιφανειών όπου ο κάθε λοβός περιλαμβάνει τρεις υπομονάδες. Τουλάχιστον μια από αυτές τις τρεις υπομονάδες σε κάθε ομόλογο λοβό κατέχει μια θέση προσκόλλησης σε σάκχαρο που δίνει το λειτουργικό χαρακτήρα της RTB. Αντίστοιχης δομής είναι η Β πολυπεπτιδική αλυσίδα της αμπρίνης ΒΤΑ (Abrin toxic B chain) με μόνη διαφορά των αριθμό των αμινοξέων που εδώ είναι 268 (εκ των οποίων τα 256 όμοια με την ρικίνη με ομολογία των δύο Β-αλυσίδων 60%).

Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των RT και ET περιέχονται και σε άλλους φυτικούς οργανισμούς για παράδειγμα το κριθάρι που συνθέτει την αλυσίδα Α, όμως για να έχουμε τοξικό αποτέλεσμα απαιτείται η ταυτόχρονη παρουσία και σύνδεση των δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων διαφορετικά η αλυσίδα Α δεν μπορεί να εισέλθει στο ριβόσωμα και να του προκαλέσει βλάβη<sup>46</sup>.



Σχήμα 9. Συγκριτική σχηματική απεικόνιση τρισδιάστατων δομών Ρικίνης και Αμπρίνης

Η RT και η AT σε καθαρή μορφή είναι λευκές σκόνη, υδατοδιαλυτές με το υδατικό διάλυμα να είναι λιγότερο σταθερό σε σχέση με το στεγνή φάση, επιπλέον διαλύονται διατηρώντας την ενεργότητα τους και σε ασθενή όξινα διαλύματα και είναι ανθεκτικές στη θέρμανση αλλά και τα

παγκρεατικά ένζυμα. Σε στεγνή κατάσταση είναι σταθερές σε θερμοκρασία δωματίου και μετουσιώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας και παράλληλα η σταθερότητα τους μειώνεται αυξανόμενης και της υγρασίας<sup>47</sup>. Σε θερμοκρασία 80° C και άνω απενεργοποιούνται πλήρως. Η RT και η AT μπορεί να πάρουν την μορφή σκόνης, σπρεί ή χαπιού.

#### 9.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Η ρικίνη είναι εξαιρετικά δηλητηριώδεις σε περίπτωση εισπνοής, ή χορήγησης με ένεση και λιγότερο επικίνδυνη κατά την κατάποση. Μπορεί ακόμη να είναι δηλητηριώδεις αν σκόνη ρικίνης έρθει σε επαφή με τα μάτια ή να απορροφηθεί από κάποια ασυνέχεια του δέρματος λόγω τραυματισμού.

Η ρικίνη και η αμπρίνη όπως και οι τοξίνες Shiga είναι RNA N-γλυκοσιδάσες που απενεργοποιούν επιλεκτικά και μη αναστρέψιμα το ευκαρυωτικό ριβοσωμάτων με διάσπαση ενός διατηρούμενου υπολείμματος αδενοσίνης εντός του λεγόμενου sarcin-ricin loop (SRL) του 28S rRN. Δρουν κυτταροτοξικά παρεμποδίζοντας τα κύτταρα να συνθέσουν πρωτεΐνες από αμινοξέα σύμφωνα με την κωδικοποιημένη πληροφορία που λαμβάνουν από το αγγελιαφόρο RNA μια διεργασία που γίνεται στα ριβοσώματα και είναι βασική για όλα τα κύτταρα. Ένα βιομόριο ρικίνης είναι ικανό να απενεργοποιήσει περί τα 1.500 ριβοσώματα ανά λεπτό οδηγώντας τελικά το κύτταρο σε θάνατο<sup>48</sup>.

Η είσοδος στο κυτταρόπλασμα ξεκινά με την Β αλυσίδα δεσμεύεται σε σύνθετους υδατάνθρακες στην επιφάνεια των ευκαρυωτικών κυττάρων που περιέχουν είτε στο ένα άκρο N-ακετυλογαλακτοζαμίνη ή βήτα-1,4-συνδεδεμένα υπολείμματα γαλακτόζης. Επιπλέον, οι γλυκάνες τύπου μαννόζης της ρικίνης είναι ικανές να συνδέουν κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς μαννόζης. Έχει δειχθεί ότι συνδέονται 106-108 μόρια ρικίνης από την Β αλυσίδα της ανά κυτταρική επιφάνεια.

Η σύνδεση των RT και AT σε επιφανειακά μεμβράνες επιτρέπει την είσοδό της στο κύτταρο σε κάθε είδους εγκοιλώσεων της μεμβράνης. Η ολοτοξίνη μπορεί να προσληφθεί εντός κυστιδίων κλαθρίνης, καθώς και από μη εξαρτημένους από κλαθρίνη οδούς συμπεριλαμβανομένων μικροσπηλαίων και μακροπυνοκυττάρωσης. Ενδοκυτταρικά κυστίδια μεταφέρουν τις RT και AT στα ενδοσώματα που τα μεταφέρουν στα σωμάτια Golgi. Η δραστική αύξηση της οξύτητας των ενδοσωμάτων θεωρείται ότι έχει μικρή επίδραση στις λειτουργικές ιδιότητες των RT και AT. Επειδή οι RT και AT είναι σταθερές σε μία ευρεία περιοχή pH, η αποικοδόμηση σε ενδοσώματα ή λυσοσώματα προσφέρει μικρή ή καθόλου προστασία στον οργανισμό. Τα μόρια των RT και AT πιστεύεται ότι ακολουθούν ανάδρομη μεταφορά από τα ενδοσώματα, το δίκτυο trans-Golgi, και το Golgi για να εισέλθουν στην αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου.

Για να δράσουν κυτταροτοξικά οι RT και AT, η αλυσίδα A πρέπει να αποκοπεί από την αλυσίδα B, προκειμένου να απελευθερωθεί η δραστική της θέση. Η διαδικασία αυτή

καταλύεται από το ένζυμο PDI (protein disulphide isomerase) που εδρεύει στο αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Όταν απελευθερωθεί η αλυσίδα A στον αυλό του ER ενδοπλασματικού δικτύου, τότε μερικώς ξεδιπλώνεται και μερικώς εισέρχεται στη μεμβράνη του.

Η A αλυσίδα έχει δραστηριότητα της rRNA N-γλυκοζυλάσης που είναι υπεύθυνη για την διάσπαση ενός γλυκοσιδικού δεσμού εντός της υπομονάδας 60S του mRNA των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Η A αλυσίδα ειδικά και μη αντιστρεπτά υδρολύει το N-γλυκοσιδικό δεσμό της αδενίνης στην θέση 4324 (A4324) εντός του 28S rRNA, αλλά αφήνει τη ραχοκοκαλιά φωσφοδιεστέρα του RNA άθικτο. Η ρικίνη στοχεύει A4324 που περιέχεται σε μια άκρως συντηρημένη αλληλουχία 12 νουκλεοτιδίων που βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα. Η αλληλουχία, 5'-AGUACGAGAGGA-3', που ονομάζεται βρόχος σαρκίνης-ρικίνης είναι σημαντική στην πρόσδεση των παραγόντων επιμήκυνσης κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Η αποπουρίνωση αδρανοποιεί γρήγορα και πλήρως το ριβόσωμα, με αποτέλεσμα την τοξικότητα από την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

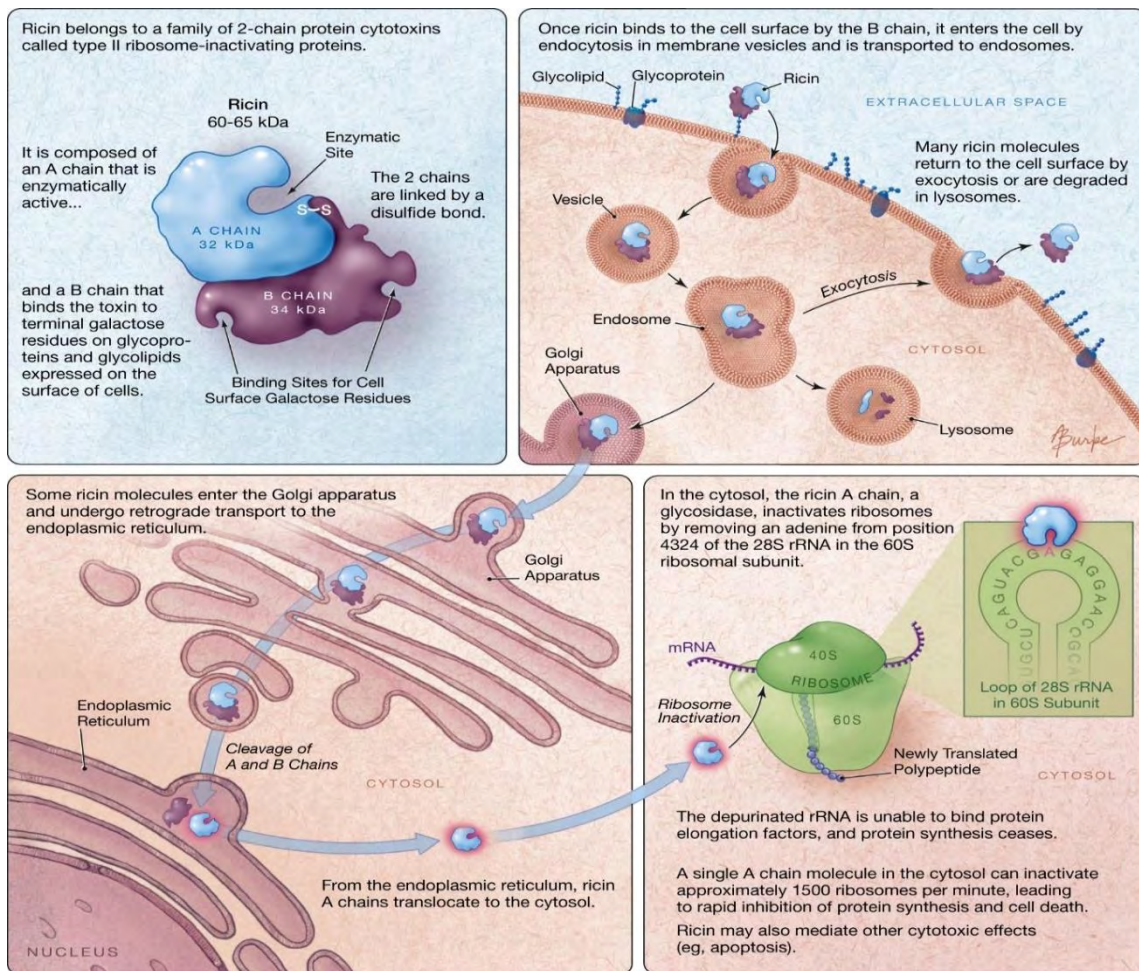
Εντός της δραστηρικής θέσης της A αλυσίδας, υπάρχουν αρκετά αμινοξέα που εμπλέκονται στην αποπουρίνωση του ριβοσωματικού RNA. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της αποπουρίνωσης είναι άγνωστος, αμινοξέα κλειδιά περιλαμβάνουν την τυροσίνη στις θέσεις 80 και 123, γλουταμικό οξύ στη θέση 177, και αργινίνη στη θέση 180. Ειδικότερα, η Arg180 και η Glu177 έχουν δειχθεί να εμπλέκονται στον καταλυτικό μηχανισμό, και όχι δέσμευσης υποστρώματος, με ένζυμοκινητικές μελέτες που περιλαμβάνουν μεταλλαγμένες A αλυσίδες. Το μοντέλο που προτείνει Mazingo και Robertus, βασίζεται σε δομές ακτίνων-Χ, είναι ως εξής:

Το υπόστρωμα βρόγχου σαρκίνης-ρικίνης δεσμεύεται στη δραστηρική θέση της A αλυσίδας με την αδενίνη στόχο εναντι tyr80 και tyr123. Η Arg180 είναι τοποθετημένη έτσι ώστε να μπορεί να πρωτονιωθεί αζωτοομάδα N-3 της αδενίνης και να σπάσει το δεσμό μεταξύ N-9 του δακτυλίου αδενίνης και C-1' της ριβόζης. Η διάσπαση του δεσμού καταλήγει σε ένα ιόν οξυκαρβονυλίου στην ριβόζη, που σταθεροποιείται με τη Glu177.

Η πρωτονίωση του N-3 της αδενίνης από Arg180 επιτρέπει αποπρωτονίωση ενός κοντινού μορίου νερού με αποτέλεσμα το προκύπτον υδροξύλιο αντιδρά με ιόν καρβονυλίου της ριβόζης.

Η αποπουρίνωση της αδενίνης οδηγεί σε μια ουδέτερη ριβόζη σε ένα άθικτο φωσφοδιεστερικό σκελετό RNA.





Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού δράσης Ρικίνης

Τα πιο ήπιες επιπτώσεις παρατηρούνται σε περίπτωση κατάποσης των RT και AT καθώς η παθολογία περιορίζεται κυρίως στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα πιθανόν λόγω ενζυματικής αποδόμησης. Τα κύρια συμπτώματα σε περίπτωση κατάποσης ρικίνης περιλαμβάνουν πόνο, σε φλεγμονή και αιμορραγία στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα και ακολούθως ναυτία, εμετό με αίμα, διάρροια, δυσκολία στην κατάποση, αιματηρές κενώσεις. Η μείωση του όγκου του αίματος στο γαστρεντερικό σύστημα μπορεί να προκαλέσει ανεπάρκεια σε πάγκρεας, νεφρά, συκώτι και γαστρεντερικό σωλήνα και σοκ στον ανθρώπινο οργανισμό με μια σειρά συμπτωμάτων όπως ζαλάδα, αδυναμία απώλεια προσανατολισμού, τάση για λιποθυμία, χαμηλή παραγωγή ούρων και ουραιμία.

Τα πρώτα συμπτώματα στην κατάποση ρικίνης εμφανίζονται μέσα σε 6 ώρες δεν είναι αρχικά τόσο έντονα και είναι δοσοεξαρτώμενα. Η πλήρης δράση της ρικίνης εμφανίζεται σε 2 έως 5 ημέρες.

Κατόπιν εισπνοής ρικίνης η συμπτωματολογία διαφέρει με αρχικά συμπτώματα τον βήχα και τον πυρετό. Στην εισπνοή αλλά και στην επαφή με το δέρμα επιπλέον η ρικίνη προκαλεί αλλεργική αντίδραση με οίδημα στους οφθαλμούς και τα χείλη, άσθμα, βρογχίτιδα, ξηρολαιμία, ερυθρότητα στο δέρμα, υπεραιμία, φουσκάλες, φαγούρα και ερεθισμό στο δέρμα και πόνο στο στήθος

Τα αρχικά συμπτώματα τοξικότητας στην αμπρίνη σε εισπνοή εμφανίζονται σε 8 ώρες περίπου ενώ σε κατάποση σε λιγότερο από 6 ώρες. Συνήθως η κύρια συμπτωματολογία εμφανίζεται μετά από 1 έως 3 ημέρες. Ο θάνατος από αμπρίνη μπορεί να επέλθει μεταξύ 36-72 ωρών και εξαρτάται από τον τρόπο χορήγησης ( εισπνοή, κατάποση, σε ένεση) .Αν δεν επέλθει θάνατος μετά από 3-5 ημέρες συνήθως το θύμα αναρρώνει.

Δεν υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία σχετικά με θανατηφόρα δόση καθαρής RT ή AT στον άνθρωπο καθώς συνήθως αναφέρεται δηλητηρίαση από κατάποση καρπών των φυτών που τις παράγουν όπου ειδικά αν κατά την κατάποση δεν πολτοποιηθούν τα συμπτώματα είναι σχετικά ήπια<sup>49</sup>. Η θανατηφόρα δόση LD<sub>50</sub> ρικίνης σε ποντίκια με κατάποση είναι 30mg/kg σωματικού βάρους και θεωρείται 1.000 φορές λιγότερο τοξική σε σχέση με εισπνοή ή χορήγηση με ενέσιμη μορφή<sup>50</sup>. Στον άνθρωπο υπολογίζεται κατά την εισπνοή 5–10 μg ανά κιλό σωματικού βάρους ,στη χορήγηση με ένεση σε 1μg ανά κιλό σωματικού βάρους η LD<sub>50</sub>= 0,22mg/kg, ενώ η αντίστοιχη θανατηφόρα δόση στην κατάποση είναι σημαντικά υψηλότερη καθώς μεγάλο μέρος απενεργοποιείται στο στομάχι και υπολογίζεται περί το 1mg ανά κιλό σωματικού βάρους. Η αμπρίνη είναι περίπου 75 φορές δραστικότερη από την ρικίνη με LD<sub>50</sub> 0,04 μg/kg σωματικού βάρους στα ποντίκια με ενέσιμη χορήγηση<sup>51</sup>.

Η δηλητηρίαση με ρικίνη δεν είναι μεταδοτική με επαφή μολυσμένου με μη μολυσμένο άτομο αλλά υπάρχει έκθεση από άτομο που φέρει ρικίνη στο δέρμα ή τα ρούχα του. Όμως επαφή με το δέμα ή έκθεση των οφθαλμών είναι απίθανο να προκαλέσει θανατηφόρες παρενέργειες και περιορίζεται σε κοκκινίλα και πόνο στο δέρμα και τους οφθαλμούς και ενδεχομένως τοπικές βλάβες. Τέσσερις έως οκτώ καρποί ρικίνης περιέχουν αρκετή ποσότητα RT για να σκοτώσουν ένα παιδί.

## 9.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Η RT έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε τρομοκρατικές και δολοφονικές επιθέσεις, αποτελεί παράγοντα βιοτρομοκρατίας ανήκει στην Β κατηγορία της CDC, στην λίστα AG και στη λίστα της CIA, επιπλέον αποτελεί απαγορευμένη ουσία ταυτόχρονα του Chemical Weapons Convention και του Biological Weapons Convention.

Οι παράγοντες που θα έκαναν πιθανή τη χρήση της RT από τρομοκράτες είναι οι εξής:

-Ευκολία και χαμηλό κόστος παραγωγής καθώς το φυτό ρίκινος μπορεί εύκολα να καλλιεργηθεί ακόμη και σε σπίτι χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις και να απομονωθεί εξίσου εύκολα από τους σπόρους. Με χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) είναι δυνατόν να απομονωθούν 180mg καθαρής RT από 100gr καρπών ρικίνης. σε μεγάλες ποσότητες ,κάθε έτος παράγονται πάνω από ένα εκατομμύριο τόνοι καρπών ρικίνης. Επιπλέον η RT μπορεί σχετικά εύκολα να απομονωθεί από τα απόβλητα της παραγωγής καστορέλαιου χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες όπως εξάνια ή τετραχλωράνθρακα.

-Η σταθερότητα της στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για επαρκή χρονικά διαστήματα.



-Η δυνατότητα να διαλυθεί σε υδατικά διαλύματα και η ανθεκτικότητα της σε ελαφρώς όξινο pH.

-Η δυνατότητα μορφοποίησης σε σκόνη, σπρέι και χάπι

Η AT δεν έχει χρησιμοποιηθεί έως τώρα σε περιστατικό βιοτρομοκρατίας ή πολέμου όμως επειδή έχει όμοια δράση με την RT και είναι ισχυρότερη και επειδή ισχύουν και για αυτήν τα ανωτέρω που ισχύουν για την RT δεν μπορεί να αγνοηθεί η δυνατότητα χρήσης της ως παράγων βιοτρομοκρατία

## 9.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
Sandwich-type ELISA	Αντισώματα ακινητοποιημένα σε ράβδους σιλικόνης. Διάρκεια 10 ώρες.	10–100 fmol	Ρυθμιστικό διάλυμα και σωματικά υγρά	52
Colorimetric and chemiluminescence ELISA	Αντισώματα συζευγμένα σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης. Διάρκεια 3-24 ώρες.	0.1–0.5 ng/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα και σωματικά υγρά	53
Fiber optic-based biosensor	Αντισώματα συζευγμένα σε οπτικές ίνες. Διάρκεια 20 λεπτά.	0.1–1 ng/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα και νερό από ποτάμι	54
xMAP microspheres immunoassay	Αντισώματα συζευγμένα σε μικροσφαιρίδια xMAP Διάρκεια 2,5 ώρες. Ανιχνεύει ταυτόχρονα και SEB και BoNT	0.01–0.03 ng/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα και γάλα	55
Surface plasmon resonance-SPR	Αντισώματα συζευγμένα σε SPR chip .Διάρκεια 15 λεπτά.	0.1 ng/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα και περιβαλλοντικά δείγματα	56
Hand-held SPR	Αντισώματα συζευγμένα σε SPR chip. Διάρκεια 10 λεπτά.	200 ng/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα	57
immuno-PCR	Αντισώματα συζευγμένα σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης.	0.01–0.1 ng/ml	Βοδινός κρέας, γάλα και αυγά	58
Immunocapture and MALDI-TOF/MS	Αντισώματα συζευγμένα σε μαγνητικά σωματίδια .Διάρκεια 6 ώρες.	50 ng/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα και γάλα	59
Mouse bioassay	Δοκιμή σε ποντίκια. Εύρεση LD50 με χρήση 10 πειραματόζων. Διάρκεια 24 ώρες.	<7.5 µg/ml	Ρυθμιστικό διάλυμα	60
Nano LC-MS	χρήση λακτόζης ως ακίνητη φάση σε μονολιθική στήλη Si Διάρκεια 5 ώρες.	8 ng/mL	διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη	61
Duplex Real-time PCR (qPCR)	ταυτόχρονη ανίχνευση ρικίνης και αβρίνης , μέσω ανίχνευσης γενετικού υλικού των φυτών εκ των οποίων παράγονται	3 αντίγραφα DNA για τη ρικίνη και 1,2 για την αβρίνη	Ακατέργαστο εκχύλισμα -μίγμα τροφίμων	62
real-time cell electronic sensing (RT-CES)	Δοκιμή σε VERO κύτταρα και μέτρηση του πολλαπλασιασμού τους και του κυτταρικού θανάτου λόγω τοξικότητας με online παρακολούθηση μέσω του συστήματος RT-CES. Διάρκεια 8-60 ώρες.	0.2–14 ng/ml	Γάλα , χυμός καρότου, βρεφική τροφή	63
LC-SRM	Ανίχνευση 8 διαφορετικών τοξινών CBRN. Διάρκεια 20-24 ώρες.	1.3 mg της A αλυσίδας της RT	Μίγμα «Κινέζικης» σούπας	64

Πίνακας 4 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευση Ρικίνης-Αμπρίνης από βιβλιογραφικές πηγές.

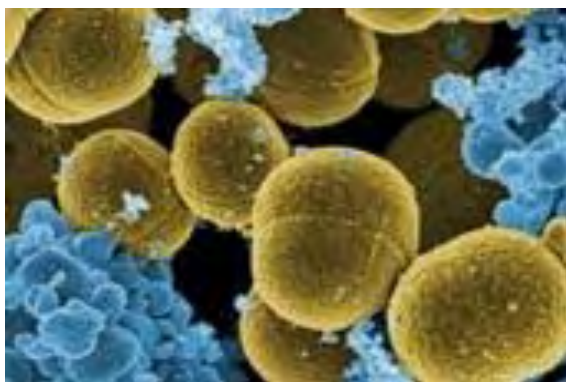
## 10. ΣΤΑΦΥΛΟΚΚΟΚΙΚΗ ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΝΗ Β (SEB):

### 10.1 Ιστορικά δεδομένα:

Από το 1943 έως το 1966 οι Η.Π.Α. είχαν ένα πρόγραμμα επίθεσης με βιολογικούς παράγοντες και η SEB ήταν ένας από αυτούς τους παράγοντες που αποθηκευτήκαν σε μεγάλες ποσότητες, καθόσον οι επιστήμονες γνώριζαν ότι η SEB θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό όπλο όταν απελευθερώνεται ως αεροζόλ. Η τοξίνη παραμένει σταθερή όταν αερολύεται και η δόση που απαιτείται για να θέσει σε ανικανότητα τον εχθρού είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή που απαιτείται για να τον σκοτώσει. Εκτιμήθηκε ότι μια αποτελεσματική επίθεση θα μπορούσε να καταστήσει το 80% ή και περισσότερο του εκτεθειμένου αντιπάλου να μην είναι σε θέση να εκτελέσει την αποστολή του για έως 2 εβδομάδες<sup>65</sup>.

### 10.2 Οργανισμοί προέλευσης

Η SEB παράγεται από τα πολύ διαδεδομένα Gram θετικά βακτήρια *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*). Τα *S. Aureus* μορφολογικά είναι κόκκοι διαμέτρου περίπου 1μm, σχηματίζουν αποικίες και η γενετική πληροφορία που κωδικοποιεί την παράγωγή της SEB μπορεί να είναι χρωμοσωμική ή πλασμιδιακή. Σε καλλιέργειες *S.Aureus* είναι δυνατή η παραγωγή σημαντικής ποσότητας SEB.



Εικόνα 13. Αποικία *Staphylococcus aureus*

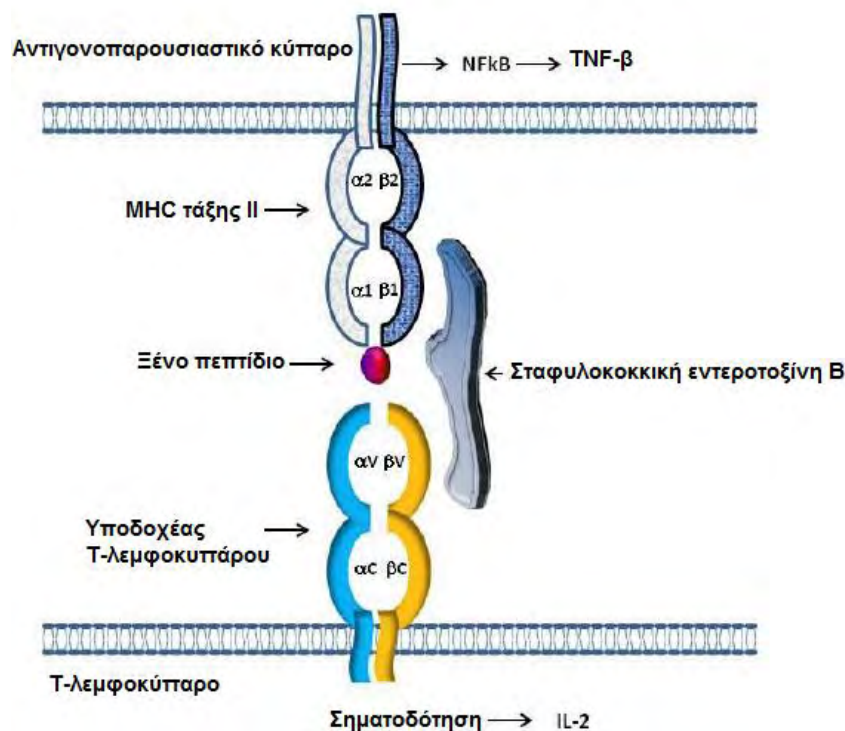
### 10.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:

Η SEB είναι μια εξωτοξίνη και ανήκει στις εντεροτοξίνες. Είναι πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους 28 kDa αποτελείται από 239 αμινοξέα, είναι υδατοδιαλυτή, εμφανίζει σταθερότητα στη θέρμανση και σε υδατικό διάλυμα και αντέχει ακόμη και στο σημείο βρασμού του νερού για λίγα λεπτά. Η SEB επιπλέον παρουσιάζει αρκετά μεγάλη σταθερότητα έναντι σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε μεγάλο εύρος pH. Υπάρχουν εννέα καλά καθορισμένες σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες ως προς την αντιγονικότητα τους, οι A,B,C,D E,F,G,H και η I εκ των οποίων η

περισσότερο δραστική και μελετημένη είναι η B (Chemical Abstracts Service Registry Number: CAS 11100-45-1).

#### 10.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Πολλές από τις παρενέργειες της (SEB) οφείλονται στη διέγερση των T λεμφοκυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Η τοξίνη δεσμεύεται άμεσα στις πρωτεΐνες της κύριας σύμπλεξης ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό μεγάλου αριθμού T λεμφοκυττάρων. Οι SEB αποτελούν ένα «βακτηριακό υπεραντιγόνο» επειδή μπορεί να σχηματίσει μια «γέφυρα» μεταξύ των πρωτεϊνών MHC II στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τους υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων στα CD4 και CD8 T κύτταρα, παρακάμπτοντας έτσι τον κανονικό μηχανισμό επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνου. Αυτή η επίδραση της SEB προκαλεί απελευθέρωση τεράστιων ποσοτήτων κυτοκινών, συγκεκριμένα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2), παράγοντα νέκρωσης όγκων  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) και ιντερφερονών. Οι κυτοκίνες όχι μόνο προκαλούν την ενεργοποίηση πρόσθετων φλεγμονωδών κυττάρων αλλά υπάρχει σχετική ανεπαρκής ενεργοποίηση αρνητικών αντιρρυθμιστικών βρόχων ανάδρασης. Λαμβανόμενα αυτά υπόψιν, η φλεγμονώδης αντίδραση του σώματος πιθανότατα διαμεσολαβεί σε πολλές από τις τοξικές επιδράσεις της SEB.



Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση τρόπου δράσης SEB

Η SEB είναι κυρίως γνωστή λόγω της δράσης της στο γαστρεντερικό σύστημα και προκαλεί συμπτώματα δηλητηρίασης όπως εμετό, διάρροια, κοιλιακός πόνος, πυρετός και εξάντληση.

Το εντερικό επιθήλιο είναι ένα στρώμα κυττάρων που διαχωρίζει τον αυλό από τα κύτταρα του ανοσοβιολογικού συστήματος κύτταρα, παρέχοντας ένα φραγμό στην τεράστια ποσότητα αντιγόνων τροφίμων, βακτηρίων και ιών στα οποία εκτίθεται το έντερο. Η εκτεταμένη φλεγμονή που προκαλείται από την ανοσολογική απόκριση στη SEB οδηγεί σε αύξηση του εντερική διαπερατότητα του επιθηλίου και μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών σύνδεσης. Η διαταραχή της λειτουργίας του φραγμού οδηγεί σε μια ροή αντιγόνων μέσω του βλεννογόνου στρώματος, ενεργοποιώντας περαιτέρω τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε αυτά τα αντιγόνα καθώς αυτά αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η SEB είναι σε θέση να διασχίσει το επιθηλιακό φράγμα άθικτο και να αποκτήσει πρόσβαση στα T λεμφοκύτταρα<sup>66</sup>.

Η δράση της SEB οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας των ιόντων χλωρίου στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων του βλενογόνου των εντέρων. Οι πόροι των μεμβρανών ενεργοποιούνται και διαστέλλονται είτε με την αύξηση της cAMP είτε με την αύξηση των ιόντων ασβεστίου ενδοκυτταρικά με άμεσο αντίκτυπο στην οσμωτικότητα γαστρεντερικού σωλήνα. Η αύξηση της διαπερατότητας των χλωριούχων ιόντων οδηγεί σε απώλεια υγρών στο γαστρεντερικό σωλήνα και συμπαράσυρση νερού και νατρίου με αποτέλεσμα τις προαναφερθείσες παρενέργειες σε 1 έως 6 ώρες από την κατάποση της SEB κυρίως από τρόφιμα.

Η κύρια επικινδυνότητα της SEB όμως δεν προκαλείται από την κατάποση της καθώς οι παρενέργειες σε αυτή την περίπτωση είναι παροδικές και σχετικά ελαφρές αλλά με την εισπνοή όπου τα κλινικά συμπτώματα είναι διαφορετικά και πιο σοβαρά απενεργοποιώντας τον λήπτη. Κατά την εισπνοή η SEB ενεργοποιεί την μαζική παραγωγή από τον οργανισμό κυτοκίνων οι οποίες αποτελούν τον μεσολαβητή στην τοξική της δράση. Επιπλέον εμφανίζεται ανάλογη δράση στη βλεννογόνο του αναπνευστικού με αυτή της βλενογόνου του γαστρεντερικού. Τα συμπτώματα τοξικότητας της SEB κατόπιν εισπνοής εμφανίζονται μεταξύ 3 έως 12 ωρών με πυρετό, πονοκέφαλο, ρίγος, μυαλγία και βήχα χωρίς φλέγματα. Σε ορισμένες βαρύτερες περιπτώσεις παρατηρείται δύσπνοια και οπισθοστερνικός πόνος και μπορεί να προκληθεί πνευμονικό οίδημα. Ο πυρετός και το ρίγος μπορούν να κρατήσουν έως και 5 ημέρες με τον βήχα να επιμένει έως και 4 εβδομάδες.

Η δόση SEB που μπορεί να προκαλέσει απενεργοποίηση στον άνθρωπο μέσω εισπνοής υπολογίζεται σε 0,4ng ανά κιλό σωματικού βάρους ενώ η αντίστοιχη θανατηφόρα δόση υπολογίζεται σε 50 φορές μεγαλύτερη δηλαδή περί τα 20ng ανά κιλό σωματικού βάρους<sup>67</sup>.

## 10.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Η SEB αποτελεί παράγοντα βιοτρομοκρατίας κυρίως για απενεργοποίηση ατόμου ή πληθυσμού στόχου παρά για θανάτωση ή πρόκληση μόνιμης αναπηρίας. Ανήκει στην Β κατηγορία της CDC και στη λίστα AG επιπλέον αποτελεί απαγορευμένη ουσία του Biological Weapons Convention. Αποτελεί την μοναδική εκ των σταφυλοκοκκικών τοξίνων η οποία μελετήθηκε και ως βιοόπλο.

Οι παράγοντες που θα έκαναν πιθανή τη χρήση των SE από τρομοκράτες είναι οι εξής:

- Ευκολία και χαμηλό κόστος παραγωγής καθόσον τα βακτήρια που τις παράγουν είναι ευρέως διαθέσιμα και δύναται με χαμηλό κόστος καλλιέργειας τους να παράγουν ικανοποιητικές ποσότητες εντεροτοξίνης.
- Η σταθερότητα τους στη θερμοκρασία, υδατικά διαλύματα, πρωτεολυτικά ένζυμα και ευρύ pH
- Η δυνατότητα χρήση της τόσο σε νερό και τρόφιμα όσο και στην πολύ δραστική και αποτελεσματική μορφή αεροζόλ.
- Το γεγονός ότι μια χαμηλή δόση SEB είναι επαρκής για να απενεργοποιήσει και να προκαλέσει ανικανότητα στον άνθρωπο είναι ένας άλλος παράγοντας που το καθιστά πιθανό όπλο βιοτρομοκρατίας.

## 10.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
ELISA -Sandwich	Χρήση διπλών αντισώματα και ανίχνευση με χρωματογραφική μέτρηση.	0,1ng/ml στα ούρα και 0,5ng/ml στα διαλύματα των δειγμάτων τροφών	ανθρώπινα ούρα, από καλλιέργειες και διαλύματα των δειγμάτων τροφών	68
LC-SRM	Ανίχνευση 8 διαφορετικών τοξινών CBRN. Διάρκεια 20-24 ώρες.	200 ng της A αλυσίδας της RT	Μίγμα «Κινέζικης» σούπας με προσθήκη LysC/trypsin	44
Bead-Assisted Displacement Immunoassay on a Microchip	Μια ανοσοδοκιμασία μετατόπισης με βάση μικροσίπ για την ανίχνευση φθορισμού της SEB με χρήση λέιζερ.	28.5 fg/mL	αλβουμίνη βόειου ορού, καζεΐνη και γάλα	69
Lab-on-a-chip (LOC) assay	Χρήση αντισωμάτων εναντίον SNAP-25 και VAMP2 με χρήση SPR. Διάρκεια 20 λεπτά.	1pg	BoNT/A	70
PCR-ELISA	Χρήση ολιγονουκλετιδίων σηματοδότη με βιοτίνη.	1pg ή 250 αντίγραφα DNA του <i>S. aureus</i>	διάλυμα PBS που περιέχει 1% άπαχο γάλα και 0,1% PBSMT	71
ELISA-on-a-chip (EOC)	Φορητή συσκευή. Διάρκεια 20 λεπτά.	2ng/ml	BoNT/A	72
Immunoassay biosensor	Ακίνητοποίηση του αντισώματος σε οπτική ίνα.	5ng/ml	BoNT/A σε διάλυμα PBS	73

Πίνακας 5 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευση SEB από βιβλιογραφικές πηγές.

## 11.ΤΟΞΙΝΕΣ SHIGA (Stx) ΚΑΙ SHIGA-LIKE (SLtx)

### 11.1 Ιστορικά δεδομένα:

Οι τοξίνες Shiga πήραν την ονομασία τους από τον Ιάπωνα φυσιολόγο-βακτηριολόγο Kiyoshi Shiga, ο οποίος το 1897 περιέγραψε για πρώτη φορά την βακτηριακή προέλευση της δυσεντερίας που προκαλείται από το βακτήριο *Shigella dysenteriae*.

Το 1977 από απομόνωση προϊόντων που παρήγαγαν συγκεκριμένα στελέχη *E. Coli* βρέθηκε ότι αυτά παράγουν μια τοξίνη η οποία ήταν ικανή να σκοτώσει κύτταρα Vero σε καλλιέργεια. Η τοξίνη ονομάστηκε βεροτοξίνη και τα βακτηρίδια *E. coli* που την παρήγαγαν ονομάστηκαν VTEC (Vero Toxin E Coli).

Οι τοξίνες Stx και SLtx αποδείχθηκε ότι σχετίζονται πολύ μεταξύ τους δομικά και λειτουργικά και μελετώνται μαζί ως οικογένεια τοξινών Shiga<sup>74</sup>.

### 11.2 Οργανισμοί προέλευσης

Οι πιο κοινές πηγές για την τοξίνη Stx είναι τα βακτήρια *Shigella dysenteriae* και οι shigatoxigenic ορότυποι της *Escherichia coli* (STEC), η οποία περιλαμβάνει τους ορότυπους O157:H7 (ο κυριότερος), O104:H4 O26:H11, O103:H2, O104:H21, O111:H-, και O145:H-. που φέρεται να προκαλούν βλάβες στην υγεία των ανθρώπων, άλλα και η εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC).<sup>75</sup>



Εικόνα 14. *Shigella dysenteriae*



Εικόνα 15. *Escherichia coli* (STEC) O157:H7

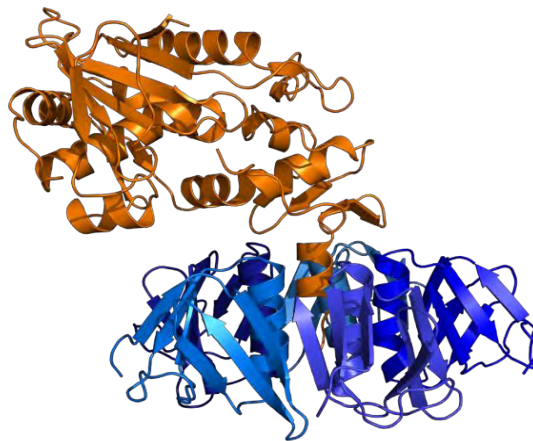
Οι βεροτοξίνες (Shiga-like) 1 και 2 (SLtx -1 και SLtx -2) είναι Shiga τοξίνες που παράγονται από ορισμένα στελέχη *E.coli* (Verocytotoxin-producing *E. Coli* -VTEC) όπως το O157:H7. Η ομάδα SLtx -1 είναι ταυτόσημη με STX ή διαφέρει κατά ένα μόνο αμινοξύ. Η Stx -2 έχει ίδια αλληλουχία αμινοξέων κατά 56% με STX.



### 11.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες

Οι Shiga τοξίνες με μείζονες ομάδες τις Stx και SLtx -1 και SLtx -2 ανήκουν στις πρωτεΐνες ριβοσομικής απενεργοποίησης RIPs (ribosome inactivating proteins) όπως η Ρικίνη και η Αμπρίνη .

Η Stx τοξίνη έχει δύο υπομονάδες την A μοριακού βάρους 32 kDa και τη B μοριακού βάρους 7,7 kDa που περιλαμβάνει ένα πενταμερή δακτύλιο όπου τυλίγεται η έλικα του C άκρου μιας υπομονάδας A. Οι Stx και SLtx -1 και SLtx -2 αποτελούν τοξίνες της κατηγορίας AB5 όπου δομικά αποτελούνται από δύο υπομονάδες την A και την B και εξ'αυτών η A αποτελείται από ένα δομικό στοιχείο ενώ η B από πέντε δομικά στοιχεία.



Σχήμα 12. Τρισδιάστατη σχηματική απεικόνιση (ribbon diagram) της STX (με πορτοκαλί χρώμα η A αλυσίδα και με μπλε η B)

### 11.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

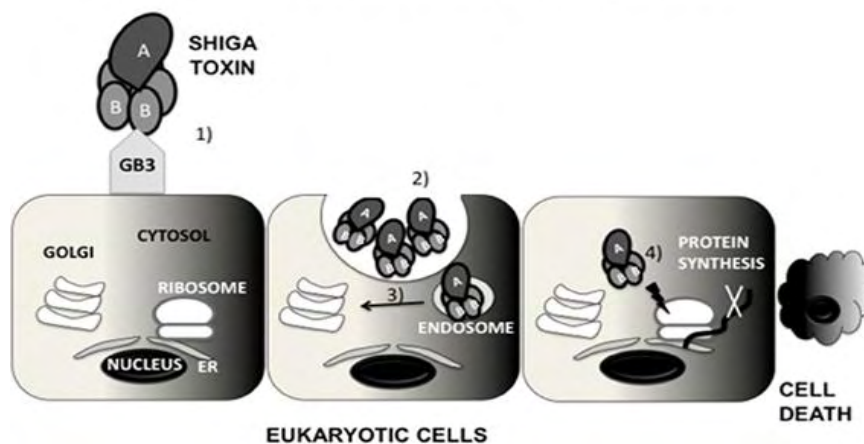
Οι τοξίνες Shiga δρουν αναστέλλουν τη σύνθεση πρωτεϊνών εντός κυττάρων-στόχων με ένα μηχανισμό παρόμοιο με εκείνο της ρικίνης και αμπρίνης, είναι RNA N-γλυκοσιδάσες που απενεργοποιούν επιλεκτικά και μη αναστρέψιμα τα ευκαρυωτικά ριβοσωμάτα με διάσπαση ενός διατηρούμενου υπολείμματος αδενοσίνης εντός του λεγόμενου sarcin-ricin loop (SRL) του 28S rRN στην υπομονάδα 60S του ριβοσώματος. Η εισαγωγή στο κύτταρο των τοξινών Shiga γίνεται μέσω ενός μακροπυρηνοσώματος.

Η υπομονάδα B των τοξινών Shiga είναι ένα πενταμερές που δεσμεύεται σε συγκεκριμένες γλυκολιπίδια επί του κυττάρου-ξενιστή και συγκεκριμένα στο Gb3. Κατόπιν δέσμευσης της B υπομονάδας η A υπομονάδα εσωτερικοποιείται και διασπάται σε δύο μέρη τα A1 και A2. Το A1 κατόπιν προσδένεται στην υπομονάδα 60S του ευκαρυωτικού ριβοσώματος με N-γλυκοσιδικό δεσμό και αφαιρώντας μια αδενοσίνη από το 28S RNA της υπομονάδας 60S διαταράσσει την πρωτεϊνική σύνθεση με μη αντιστρεπτό τρόπο. Η Stx1 έχει δέκα φορές μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα της σειράς Vero από την Stx2 παρόλα αυτά σε πειράματα με ποντίκια έχουμε αντίστροφα αποτελέσματα όπου η Stx1 είναι 100–400 φορές

λιγότερο τοξική από την Stx2, αν και σε *in vitro* μελέτες και οι δύο εμφανίζουν παραπλήσια ενζυματική δράση ανά ηg πρωτεΐνης<sup>76</sup>.

Το γλυκολιπίδιο Gb3 υπάρχει σε μεγαλύτερες ποσότητες στο νεφρικό επιθηλιακό ιστό, στο οποίο μπορεί να αποδοθεί η νεφρική τοξικότητα της τοξίνης Shiga. Gb3 βρίσκεται επίσης στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος και το ενδοθήλιο και μπορεί να οδηγήσει σε νευροτοξικότητα. Η Stx-2 είναι επίσης γνωστό ότι αυξάνει την έκφραση των GB3 υποδοχέα του και να προκαλέσει νευρωνική δυσλειτουργία.

### Mechanism of action of Shiga Toxin



Σχήμα 13. Σχηματική απεικόνιση μηχανισμού δράσης STX<sup>77</sup>

Η τοξίνη απαιτεί εξαιρετικά ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων για να προσκολληθεί και να εισέλθουν στο κύτταρο. Ορισμένα είδη ζώων όπως βοοειδή, χοίροι, και ελάφια τα οποία δεν φέρουν αυτούς τους υποδοχείς μπορεί φιλοξενούν τοξικογενή βακτήρια που παράγουν και εκκρίνουν τοξίνες Shiga χωρίς να υφίστανται τις αρνητικές παρενέργειες, ρίχνοντας τις σε περιπτώματα τους, από τα οποία μπορεί να μολυνθούν άνθρωποι.

Η κύρια συμπτωματολογία από των τοξινών Shiga είναι η διάρροια, η αιμορραγική κολίτιδα και το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (hemolytic uremic syndrome HUS) και την αιμορραγική κολίτιδα (HC). Συγκεκριμένα μετά από μια περίοδο επώασης διάρκειας 3-5 ημερών, τα χαρακτηριστικά στοιχεία της προσβολής από τον σερότυπο O157:H7 περιλαμβάνουν κοιλιακές κράμπες και διάρροια χωρίς αίμα που σε πολλές περιπτώσεις προχωράει σε αιμορραγική κολίτιδα, μια κατάσταση διαφορετική από τη φλεγμονώδη κολίτιδα. Ο Πυρετός και εμετός δεν είναι εξέχοντα χαρακτηριστικά. Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, που ορίζεται από την τριάδα των χαρακτηριστικών οξείας νεφρικής ανεπάρκεια, θρομβοπενία και μικροαγγειακή αιμολυτική αναιμία, αναπτύσσεται σε περίπου το ένα δέκατο έως το ένα τέταρτο των περιπτώσεων. Η σοβαρότητα του HUS κυμαίνεται από ήπια κλινική εικόνα του ασθενή έως σοβαρή και κεραυνοβόλο νόσος με εμπλοκή πολλαπλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του εντέρου, της καρδιάς, των πνευμόνων, του παγκρέατος, και του κεντρικού νευρικού συστήματος<sup>78</sup>.

Η LD<sub>50</sub> για την Stx και την SLtx στα ποντίκια είναι από 28ng/Kg<sup>79</sup> σωματικού βάρους έως 400ng/Kg<sup>80</sup> ανεξάρτητα αν η χορήγηση έγινε ενδοφλέβια ή ενδοπεριτοναϊκά

### 11.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές για χρήση των Stx και SLtx σε περιστατικό βιοτρομοκρατίας. Ο ορότυπος O157: H7 της *Escherichia coli* (STEC) ανήκει στην κατηγορία B του CDC και στη λίστα AG. Πιθανός τρόπος χρήσης των Stx και SLtx από τρομοκράτες λαμβάνοντας υπόψιν την υψηλή τους τοξικότητα είναι η μόλυνση της τροφικής αλυσίδας είτε με καθαρές τοξίνες είτε μέσω στελεχών των βακτηρίων που τις παράγουν και η μόλυνση νερού προς πόση.

## 11.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
LC-SRM	Ανίχνευση 8 διαφορετικών τοξινών CBRN. Διάρκεια 20-24 ώρες.	2,24μg για την STX1 και 81ng για την STX2	Μίγμα «Κινέζικης» σούπας με προσθήκη LysC/trypsin	44
Cytotoxicity cell bioassay	Τεστ κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα VERO (επιθηλιακά κύτταρα νεφρού από τον πίθηκο Cercopithecus aethiops) Τα κύτταρα VERO έχουν υψηλή συγκέντρωση σε υποδοχείς Gb3 στην πλασματική τους μεμβράνη αλλά και Gb4 στα οποία συνδέονται εκλεκτικά οι STX	1 CFU (Colony-forming unit) ανά 100	Κόπρανα	81
ELISA Stx enzyme immunoassay (EIA)	Εμπορικά διαθέσιμο κιτ (Premier EHEC ELISA). Ανίχνευση των Stx1 και Stx2 που προέρχονται από την STEC σε περίπου 90 λεπτά	10 <sup>6</sup> CFU/ml	Κόπρανα	82
PCR	Ως δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και βιολογικά υγρά ή τρόφιμα αρκεί να μην περιέχουν ουσίες που να αναστέλλουν τη δράση της πολυμεράσης Taq. Ο απαιτούμενος χρόνος εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο (αριθμός κύκλων, χρόνος επώασης σε κάθε θερμοκρασία) με ελάχιστο τις 4 ώρες και μέγιστο 12-24 ώρες.	10 <sup>2</sup> CFU/ml	Κόπρανα	83

Πίνακας 6. Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευση Stx και SLtx από βιβλιογραφικές πηγές.

## 12. T-2 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΗ (T-2)

### 12.1 Ιστορικά δεδομένα:

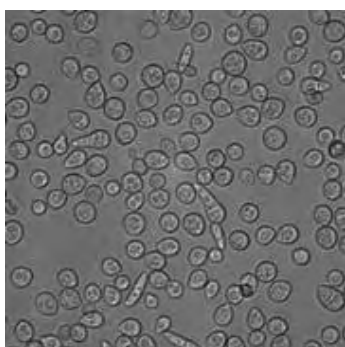
Η πεπτική τοξική αλευκία (Alimentary toxic aleukia -ATA), είναι μια ασθένεια που προκλήθηκε από την T-2 μυκοτοξίνη και σκότωσε χιλιάδες στρατιώτες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ το 1940 στην περιοχή Ορενμπούργκ της Ρωσίας. Υπάρχουν αναφορές ότι το η θνησιμότητα έφτασε το 10% του συνολικού πληθυσμού της περιοχής. Σε μεταγενέστερες έρευνες τη δεκαετία του '70 ως εξήγηση για τον μαζικό θάνατο του συγκεκριμένου πληθυσμού προτάθηκε ότι επήλθε από μαζική δηλητηρίαση μέσω μολυσμένων τροφίμων. Στον 2<sup>ο</sup> παγκόσμιο πόλεμο η συγκομιβή των σιτηρών καθυστέρησε και υπήρχε έλλειψη τροφίμων και χρησιμοποιήθηκαν ως τρόφιμα σιπρά προγενέστερων ετών που είχαν μολυνθεί με μύκητες του γένους *Fusarium* που παρήγαγαν την T-2 μυκοτοξίνη,

Αν και δεν έχει αποδειχθεί, υπάρχουν υποψίες ότι T-2 μυκοτοξίνη χρησιμοποιήθηκε ως βιοχημικός παράγοντας από τη δεκαετία του '70 έως τη δεκαετία του '90. Οι υποψίες βασίζονται σε περιγραφές αυτοπτών μαρτύρων και θυμάτων με αναφορές για ρίψεις T-2 μυκοτοξίνης από αεροπλάνα που σε χαμηλές πτήσεις απελευθέρωναν ένα κίτρινο ελαιώδες υγρό, φαινόμενο το οποίο ονομάστηκε «κίτρινη βροχή». Το 1982 ο γενικός γραμματέας των ΗΠΑ Alexander Haig αρμόδιος για θέματα εξωτερικής πολιτικής και ο διάδοχός του George P. Shultz κατηγορήσαν την τότε Σοβιετική Ένωση ότι χρησιμοποίησε T-2 μυκοτοξίνη στο Λάος (1975–81) την Καμπότζη (1975–81) και το Αφγανιστάν (1979–81) προκαλώντας χιλιάδες απώλειες ανθρώπων. Αν και δείγματα «κίτρινης βροχής» βρέθηκαν στο Λάος και ταυτοποιήθηκαν ως T-2 η έκθεση των κατοίκων σε αυτή δεν αποδείχθηκε ότι προήλθε από στρατιωτική ή τρομοκρατική επίθεση και υπάρχει ενδεχόμενο να προήλθε από περιπτώματα μελισσών.

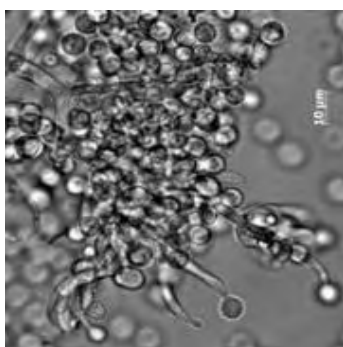
Υποψίες επίσης υπάρχουν ότι η T-2 μυκοτοξίνη ήταν ένας από τους παράγοντες του «Συνδρόμου του Κόλπου». Οι Αμερικάνοι στρατιώτες υπέφεραν από συμπτώματα που προσομοιάζουν με αυτά της δηλητηρίασης από T-2 μετά από έκρηξη ενός Ιρακινού πυραύλου σε στρατόπεδο των Αμερικάνων στη Σαουδική Αραβία κατά τη διάρκεια της επιχείρησης «Καταιγίδα της ερήμου» στον Περσικό Κόλπο το 1991. Τα περισσότερα στοιχεία της συγκεκριμένης υπόθεσης παραμένουν απόρρητα.

## 12.2 Οργανισμοί προέλευσης

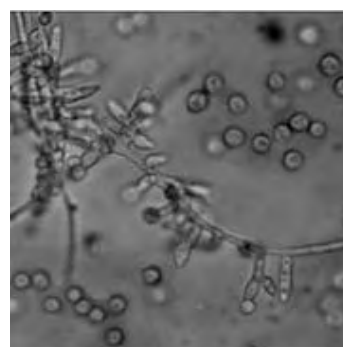
Η T-2 παράγεται (αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη) από μύκητες του γένους *Fusarium* των οποίων είναι τα πιο σημαντικά είδη είναι τα :*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum* και *F. roae*. Οι συγκεκριμένοι μύκητες βρίσκονται σε δημητριακά όπως το κριθάρι, το σιτάρι και η βρώμη. Η T-2 όπως και οι υπόλοιπες τριχοθήκινες συνολικά ξεπερνούν τις 140 με βάση τα σημερινά δεδομένα. Η παραγωγή της T-2 για την έρευνα και εμπορικούς σκοπούς γενικά επιτυγχάνεται με την καλλιέργεια κάποιου στελέχους του T-2 μυκοτοξίνη που παράγουν οι μύκητες σε πλάκες άγαρ. Σε αυτές τις πλάκες άγαρ οι μύκητες εμφανίζονται σε μορφή σκόνης με αυτή την τεχνική καλλιέργειας μπορούν να παραχθούν σημαντικές ποσότητες T-2. Δεν υπάρχει προς το παρόν γνωστή μέθοδος για τη χημική σύνθεση T-2.



Εικόνα 16. *F. Sporotrichioides*



Εικόνα 17. *F. Langsethiae*



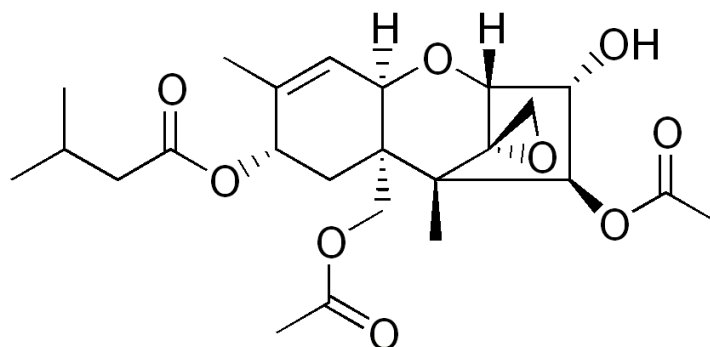
Εικόνα 18. *F. roae*

## 12.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες:

Η T-2 (Chemical Abstracts Service Registry Number: CAS21259-20-1), ανήκει στις μυκοτοξίνες και είναι μια κυτταροτοξίνη. Η T-2 τοξίνη έχει μοριακό βάρος 465,53 g/mol, έχει ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων σεσκιτερπενίου (12,13-εποξυτριχοθηκίνη) και κατατάσσεται λόγω δομικών χαρακτηριστικών στις A-τριχοθηκίνες (συνολικά υπάρχουν 4 κατηγορίες τριχοθηκίνων βάσει της λειτουργικής τους ομάδας οι A,B,C,D).

Η T-2 είναι μη πτητική, είναι γενικά πολύ σταθερή και δεν αποικοδομείται κατά την αποθήκευση, άλεσης, μαγείρεμα και επεξεργασία τροφών που την περιέχουν. Δεν καταστρέφεται σε υψηλές θερμοκρασίες (οι τριχοθηκίνες για να απενεργοποιηθούν απαιτούν θέρμανση στους 482 °C σε έντονα όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον για 10 λεπτά ή θέρμανση στους 260 °C για 30 λεπτά<sup>84</sup>) και είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη και το χλωροφόρμιο. Η T-2 έχει ένα δακτύλιο εποξειδίου, με αρκετές ομάδες ακετυλίου και υδροξυλίου σε πλευρικές αλυσίδες της. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι κυρίως υπεύθυνα για τη βιολογική δραστηριότητα της ένωσης που την καθιστούν ιδιαίτερα τοξική. T-2 μυκοτοξίνες είναι ικανή να αναστείλει DNA και RNA σύνθεση in vivo και in vitro [10]

και μπορούν να επάγουν απόπτωση. Ωστόσο, in vivo η ένωση μεταβολίζει γρήγορα σε HT-2 μυκοτοξίνες (ένας κύριος μεταβολίτης).



Σχήμα 14. Σχηματική απεικόνιση χημικής δομής της T-2 μυκοτοξίνης

#### 12.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Η T-2 μυκοτοξίνη είναι ικανή να αναστείλει τη σύνθεση DNA και RNA τόσο in vivo όσο και in vitro και μπορεί να επάγει την απόπτωση του κυττάρου, ωστόσο, in vivo η ένωση μεταβολίζεται γρήγορα σε HT-2 μυκοτοξίνη (ένας κύριος μεταβολίτης).

Η τοξικότητα της T-2 τοξίνης οφείλεται στη δομή της και συγκεκριμένα στον 12,13-εποξυ δακτύλιο της. Τα εποξειδία είναι εν γένει τοξικές ενώσεις, αντιδρούν με πυρηνόφιλα και στη συνέχεια υποβάλλονται σε περαιτέρω ενζυματικές αντιδράσεις. Η δραστηριότητα των εποξειδίων μπορεί να οδηγήσει σε αντιδράσεις με ενδογενείς ενώσεις και κυτταρικά συστατικά όπως βάσεις του DNA και πρωτεΐνες. Ο 12,13-εποξυ δακτύλιος της μυκοτοξίνης επηρεάζει το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης του κυττάρου, οδηγεί σε αύξηση των υπεροξειδασών στα λιπίδια ήπατος και έχει ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα επί της σύνθεσης DNA και RNA. Επιπλέον, μπορεί να συνδέεται προς ένα αναπόσπαστο μέρος της ριβοσωμικής υπομονάδας 60s, πεπτιδυλοτρανσφεράσης, αναστέλλοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτές οι επιδράσεις πιστεύεται ότι είναι η εξήγηση για το γεγονός ότι η T-2 τοξίνη επάγει κυτταρική απόπτωση σε διαφορετικούς ιστούς, όπως το ανοσοποιητικό σύστημα, το γαστρεντερικό ιστό και επίσης εμβρυϊκό ιστό.

Η είσοδος της T-2 μυκοτοξίνης στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να γίνει είτε μέσω κατάποσης τροφής και νερού είτε μέσω της αναπνευστικής οδού. Επιπλέον η συγκεκριμένη τοξίνη μπορεί να περάσει στον ανθρώπινο οργανισμό και από ασυνέχεια του δέρματος λόγω τραύματος. Η ισχυρότερη τοξική επίδραση προκαλείται με την εισπνοή, διότι με την κατάποση και την είσοδο από το δέρμα απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα και επιπλέον μεταβολίζεται ευκολότερα.

Η T-2 είναι εξαιρετικά τοξική όταν εισπνέεται. Τα οξεία τοξικά συμπτώματα περιλαμβάνουν έμετο, διάρροια, ερεθισμό του δέρματος, κνησμός, εξάνθημα, φουσκάλες, αιμορραγία και δύσπνοια. Αν το άτομο εκτίθεται σε T-2 για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αναπτύσσεται τοξική πεπτικού αλευκία (ATA).



Στην κοινή συμπτωματολογία ανεξαρτήτως τρόπου εισόδου έχουμε τα εξής: Στην αρχή ο ασθενής βιώνει μια αίσθηση καψίματος στο στόμα, το λαιμό και το στομάχι. Μετά από μερικές μέρες το πρόσωπο που θα υποφέρουν από οξεία γαστρεντερίτιδα που θα διαρκέσει για 3-9 ημέρες. Εντός 9 εβδομάδων ο μυελός των οστών σταδιακά θα εκφυλιστεί. Το δέρμα αρχίζει να αιμορραγεί και ο συνολικός αριθμός των λευκοκυττάρων μειώνεται. Δύναται να προκύψουν προβλήματα και στη λειτουργία του νευρικού συστήματος.

Στο τέλος τα ακόλουθα συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν: υψηλός πυρετός, πετεχειώδεις αιμορραγία, νέκρωση των μυών και του δέρματος, βακτηριακές λοιμώξεις των νεκρωθέντων ιστών, διόγκωση των λεμφαδένων. Υπάρχει επιπλέον κίνδυνος ασφυξίας εξαιτίας λαρυγγικού οίδημα και στένωσης της γλωττίδας. Σε αντίθετη περίπτωση ο ασθενής θα πεθάνει του βρογχική πνευμονία και αιμορραγία των πνευμόνων.

Η LD<sub>50</sub> της T-2 σε ποντίκια είναι περί τα 0,85 mg/Kg σωματικού βάρους και στα κουνέλια 1,10 mg/Kg σωματικού βάρους<sup>85</sup>.

## 12.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Η T-2 περιλαμβάνεται στη λίστα AG, έχει ήδη χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός παράγων σε πόλεμο όπως αναφέρθηκε στα ιστορικά στοιχεία, αρά υπάρχει σύνδεση και για χρήση σε βιοτρομοκρατία. Οι παράγοντες που θα έκαναν πιθανή τη χρήση της T-2 από τρομοκράτες είναι οι εξής:

- Η υψηλή της τοξικότητα.
- Η σταθερότητα της τοξίνης και η ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντικές συνθήκες
- Η δυνατότητα εύκολης και χαμηλού κόστους μαζική παραγωγής της
- Η δυνατότητα να εισαχθεί σε τρόφιμα, νερό και αεροζόλ χωρίς να χάσει την δραστικότητα της.



## 12.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
Membrane-based immunofiltration -ELISA	Χρήση μεμβράνης για ανοσοδιήθηση και ακολούθως ELISA. Διάρκεια 22 λεπτά	12,5-25 µg/Kg	Αλεύρι – τροφή πουλερικών	86
Monoclonal immunoassay-ELISA	Χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων για ανίχνευση της T2. Διάρκεια 2 ώρες.	30 ng/g	πυρήνες σιταριού	87
GC-FID	Χρήση αέριας χρωματογραφίας με ανίχνευση μέσω flame ionization	75 µg/Kg	Άλευρα	88
GC-ECD	Χρήση αέριας χρωματογραφίας με ανίχνευση μέσω electron capture.	40 µg /Kg	Δημητριακά	89
HPLC-FD/MS	Χρήση αέριας χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ανίχνευση μέσω Field desorption MS	0,0005 µg /g	Δημητριακά	90
HPLC-ESI/MS	Χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ανίχνευση μέσω electrospray ionisation MS	5 ng/g	Αλεύρι σίτου	91
HPTLC	Χρήση υγρής χρωματογραφίας λεπτού υμένα και ποσοτικοποίηση με υπέρυθο φθορισμό. Διάρκεια περίπου 2 ώρες.	0,005 µg/Kg	Ρύζι	92

Πίνακας 7. Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευση T-2 τοξίνης από βιβλιογραφικές πηγές

## 13. ΤΕΤΡΟΔΟΤΟΞΙΝΗ (ΤΤΧ)

### 13.1 Ιστορικά δεδομένα:

Η ΤΤΧ απομονώθηκε τον Ιούλιο του 1884 από τον Dr Yoshizumi Tahara από υδατικό εκχύλισμα αυγών του ψαριού τετραοδοντιδές (*puffer fish*) και πήρε το όνομά της από την τάξη που ανήκει ταξινομικά το συγκεκριμένο ψάρι. Το *puffer fish* αποτελεί το κύριο συστατικό του γαστρονομικού εδέσματος *fugu* που είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στην Ιαπωνία και στο περελθόν έχουν εκδηλωθεί πολλά περιστατικά δηλητηρίασης με ΤΤΧ λόγω κατανάλωσης *fugu* που ονομάζεται PFP (Pufferfish Poisoning) πλέον τέτοια περιστατικά σπανίζουν καθόσον υπάρχουν ειδικοί σεφ για την προετοιμασία του *fugu*.

Από τα πρώτα καταγεγραμμένα περιστατικά δηλητηρίασης από ΤΤΧ εικάζεται ότι είναι η δηλητηρίαση του γνωστού καπετάνιου Cook (captain cook) και μέλη του πληρώματος του το Σεπτέμβριο του 1774 καθώς εξερευνούσε νησιά του Ανταρκτικού Ωκεανού κάτι που έγραψε στο βιβλίο του «A voyage towards the South Pole and around the world». Εκεί μαγείρεψαν τοπικά ψάρια πιθανότατα λαγοκέφαλους και δηλητηριάστηκαν με συμπτώματα ΤΤΧ μάλιστα πετάξαν τα αποφάγια των ψαριών σε γουρούνια, τα οποία επίσης δηλητηριάστηκαν και ένα πέθανε<sup>93</sup>.

### 13.2 Οργανισμοί προέλευσης

Οι ΤΤΧ βρίσκονται κυρίως στο συκώτι και τους γόνους ορισμένων ψαριών όπως τα *puffer fish*, ο λαγοκέφαλος (*Lagocephalus sceleratus*) *globefish*, και *toadfish* της τάξης των τετραοδοντιδων αλλά και σε εντελώς διαφορετικά είδη οργανισμών όπως καβούρια (*Atergatis floridus*) αμφίβια, χταπόδια (*Octopus maculosus*) αστερίες (*Astropecten polyacanthus*) και οστρακοειδή. Το εύρος των οργανισμών όπου ανιχνεύεται η ΤΤΧ κάνει τους επιστήμονες να πιστεύουν ότι δεν είναι οι οργανισμοί αυτοί που παράγουν την ΤΤΧ αλλά παράγεται από ενδοσυμβιωτικά σε αυτούς βακτήρια όπως το *Enterococcus faecium* *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, *Serratia marcescens*, και *Providentia rettgeri*<sup>94</sup>



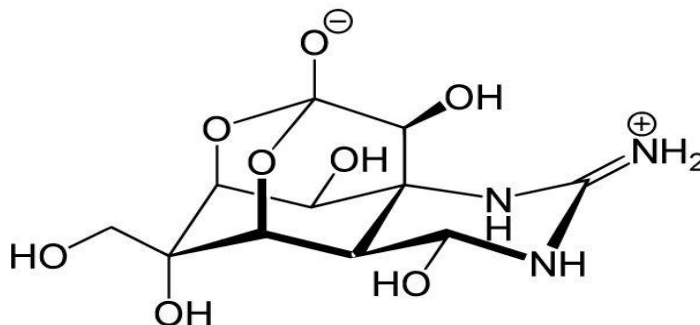
Εικόνα 19. Puffer fish



Εικόνα 20. Λαγοκέφαλος

### 13.3 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες

Η TTX (CAS 4368-28-9), ανήκει στις θαλάσσιες νευροτοξίνες και δεν είναι πρωτεΐνη όπως οι περισσότερες τοξίνες. Πρόκειται για μια λιπόφιλη, μικρού μοριακού βάρους 319.27 g/mol οργανική ένωση, λευκή σκόνη με χαρακτηριστική κρυσταλλική δομή κλωβού, σημείο τήξης τους 225 °C διαλυτή στο νερό, σταθερή σε βρασμό εκτός από αλκαλικά διαλύματα με pH άνω του 8.5 και όξινα με pH κάτω του 3<sup>95</sup>. Οι τρεις αζωτομάδες δημιουργούν μια θετικά φορτισμένη ομάδα γουανιδίου, ενώ οι υδροξυλομάδες στον δακτύλιο αυξάνουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με υδατικό περιβάλλον.



Σχήμα 15. Σχηματική απεικόνιση χημικής δομής τετροδοτοξίνης (TTX)

### 13.4 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Η TTX ως νευροτοξίνη μπλοκάρει το δυναμικό δράσης των νευρώνων με το να προσκολλάται στα ταχέως ρυθμιζόμενα από διαφορά δυναμικού κανάλια ιόντων Νατρίου τύπου 1 στην μεμβράνη των νευρικών κυττάρων στο άνοιγμα των κυτταρικών πόρων όπως η σαξιτοξίνη. Με τον τρόπο αυτό όλα τα νεύρα στα οποία έχει προσκολληθεί η TTX δεν μπορούν να στείλουν νευρικές ώσεις στους μύες μπλοκάροντας τα κανάλια που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη διεργασία όπως μια τάπα κλείνει ένα μπουκάλι και δεν μπορεί να μπει ή να βγει κάτι από αυτό. Το σημείο πρόσδεσης της TTX εντοπίζεται στο σημείο που ανοίγει ο πόρος του τασεορυθμιζόμενου καναλιού Na<sup>+96</sup> Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμφανιστεί σύντομα (σε

λιγότερο από 8 ώρες ) αδυναμία και παράλυση των μυών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της αναπνευστικής οδού που μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική ανακοπή και θάνατο<sup>97</sup>.

Αναλυτικά σε περίπτωση κατάποσης TTX υπάρχουν δύο στάδια συμπτωματολογίας<sup>98</sup>.

Στο πρώτο στάδιο έχουμε μούδιασμα και αίσθηση τσιμπήματός και τσουξίματος (παραίσθησία) στα χείλη και τη γλώσσα ακολουθούμενη από παραισθησία στο κρανίο με τα ίδια συμπτώματα, πονοκέφαλο, αίσθηση ελαφρότητας και ναυτία, έντονη εφίδρωση, ζαλάδα, εξαγωγή σάλιου, έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος, δυσκολία στην κίνηση (δυσλειτουργία κινητικών νευρώνων) αδυναμία και δυσκολία στην ομιλία.

Σε δεύτερο στάδιο έχουμε αυξημένη παράλυση που ξεκινά από τα άκρα και προχωρά προς όλο το σώμα και καταλήγει στους αναπνευστικούς μύες. Δύσπνοια, ανώμαλος καρδιακός ρυθμός (δυσρυθμία ή αρρυθμία), υπόταση, μυδρίαση κώμα, σπασμούς, αναπνευστική ανακοπή και τέλος θάνατο.

Η βιβλιογραφία είναι εκτεταμένη σχετικά με την κατάποση TTX καθώς υπάρχουν πολλά περιστατικά που αφορούν δηλητηρίαση λόγω κατανάλωσης ψαριών που περιέχουν TTX όπως το puffer fish αλλά και ψαριών που μπορεί να βρεθούν και στη χώρα μας όπως ο λαγοκέφαλος ή διαβολόψαρο<sup>99</sup>. Η τοξικότητα της TTX είναι υψηλή σε ενδοφλέβια ένεση σε θηλαστικά ( $LD_{50} = 2-10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) και στον άνθρωπο, με ελάχιστη θανατηφόρο δόση (MLD) να υπολογίζεται περί τα 2 mg καθαρής κρυσταλλικής TTX<sup>100</sup>. Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για εισπνοή TTX.

### 13.5 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Η TTX είναι ιδιαίτερος τοξική και θανατηφόρα με παρενέργειες που εμφανίζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα και ανήκει στη λίστα AG. Οι παράγοντες που θα έκαναν πιθανή τη χρήση των SE από τρομοκράτες είναι οι εξής:

-Υπάρχει ήδη εμπορικά διαθέσιμη<sup>101</sup> και θα μπορούσε με παράνομο τρόπο να φτάσει στα χέρια τρομοκρατών αλλά και να απομονωθεί από οργανισμούς που την περιέχουν.

-Υπάρχουν διαθέσιμες συνθετικές μέθοδοι παρασκευής TTX

-Έχει σταθερότητα και διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα

-Έχει αποδεδειγμένη δράση και οι θανατηφόρες σε πολλές περιπτώσεις παρενέργειες της είναι γνωστές λόγω των περιστατικών δηλητηριάσεων από κατανάλωση τροφίμων που περιείχαν TTX όπως το puffer fish.

-Δεν αποκλείεται η χρήση της σε μορφή αεροζόλ εφόσον παραχθεί σε επαρκή ποσότητα.

### 13.6 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
UPLC-MS/MS	Χρήση υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας και ακολούθως συζευγμένου φασματογράφου μάζας.	100 µg/kg	Ελληνικά μύδια	102
HPLC-FLD	Χρήση υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας και ανίχνευση της TTX μέσω ανίχνευσης φθορισμού.	5–20 ng/ml	Ούρα και πλάσμα αίματος	103
LC/ESI-MS	LC-MS με χρήση selected ion monitoring (SIM) και tandem mass spectrometry (MS/MS)	50 - 1000 pmol	Διάλυμα TTX από puffer fish	104
tissue culture bioassay (TCBA)	Τεστ κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιώντας τις κυτταρικές σειρές N2A ποντικών με εφαρμογή σε βακτηριακές καλλιέργειες	6.6 nM	Διάλυμα TTX	105
mouse bioassay-MBA	Ο υπολογισμός της τοξικότητας μετριέται σε μέσους χρόνους θανάτου ανά μονάδα ποντικού (MU). Ένεση δείγματος σε αρσενικά ποντίκια συγκεκριμένου βάρους	1 MU = 0.22 µg TTX	Δείγμα TTX	106
direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA) kit	Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα για τη δέσμευση στην TTX που σημάνθηκε με ένζυμο horseradish peroxidase (HRP). Διάρκεια 90 λεπτά.	1.1 ng/ml	Διάλυμα TTX	107
TTX-IC Rapid Test	Εμπορικό κίτ με χρήση τεχνολογίας ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής. Διάρκεια λίγα λεπτά.	2 mg/kg	Σάρκα από puffer fish	108
Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor	Ηλεκτροφυσιολογικά τεστ ανίχνευσης με χρήση οπτικών βιοαισθητήρων SPR. Ανάλυση 40 δειγμάτων ανά ώρα	100 µg/kg	Θαλάσσιο σαλιγκάρι Charonia lampas lampas	109
surface-enhanced Raman scattering (SERS)	Χρήση SERS με νανοσωματίδια αργύρου στα οποία προσροφήθηκε η TTX.	0.9 ng/mL	Διάλυμα TTX	110
Fluidic Force Discrimination (FFD)	Συνδυαστική πειραματική τεχνική με στοιχεία από ELISA και κυτταρομετρία ροής.	15 ng/mL	Διάλυμα TTX	111

Πίνακας 8. ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης TTX από βιβλιογραφικές πηγές.

## 14. ΣΑΞΙΤΟΞΙΝΗ (STX)

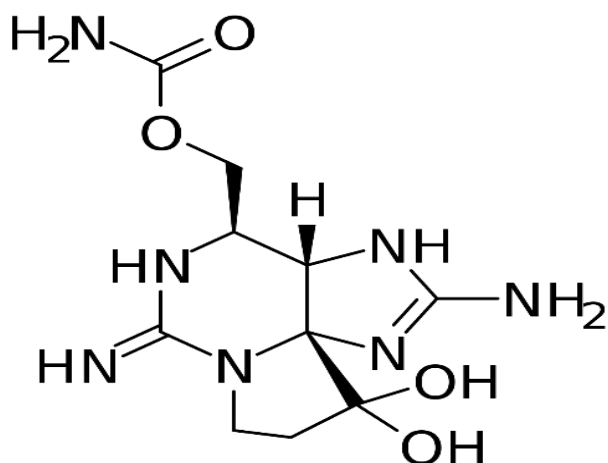
### 14.1 Οργανισμοί προέλευσης

Η STX παράγεται από συγκεκριμένα είδη θαλάσσιου φυτοπλαγκτόν και συγκεκριμένα τα ευκαρυωτικά δεινοφύκη *Alexandrium* , *Gymnodinium* , *Pyrodinium* .

Επιπλέον η STX παράγεται και από τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια του γλυκού νερού *Aphanizomenon* , *Cylindrospermopsis* , *Lyngbya* , *Planktothrix* . Σε περιόδους υπέρμετρης ανάπτυξης των ανωτέρω ειδών εμφανίζονται μαζικοί θάνατοι ψαριών, αλλά και άλλων ζώων λόγω μόλυνσης των κοιτασμάτων νερού.

### 14.2 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες

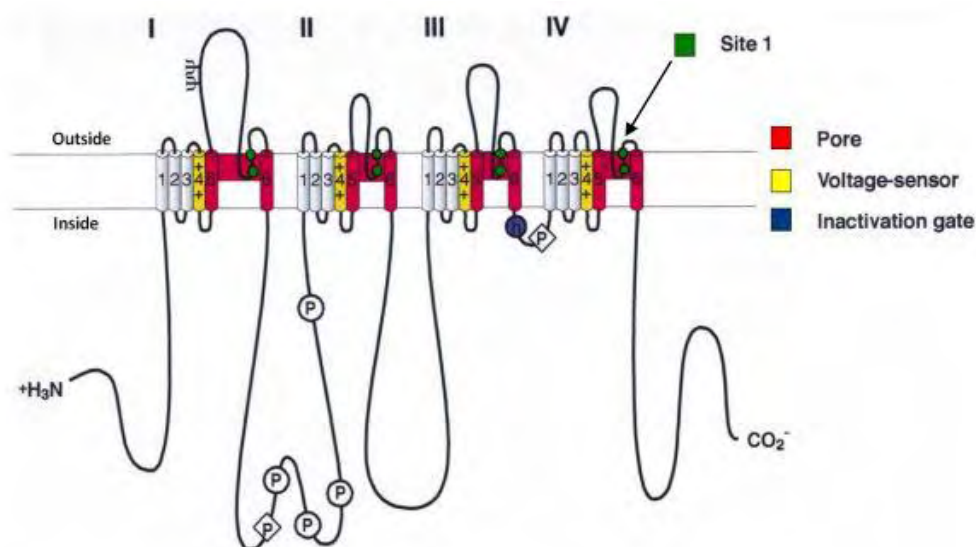
Η STX (CAS 35523-89-8) , ανήκει στις θαλάσσιες νευροτοξίνες και δεν είναι πρωτεΐνη όπως οι περισσότερες τοξίνες. Πρόκειται για μια μικρού μοριακού βάρους 299.291 g/mol οργανική ένωση, με υψηλή πολικότητα, άμορφη, άγευστη, υδροσκοπικό στερεό , διαλυτή στο νερό , σταθερή σε βρασμό εκτός από αλκαλικά διαλύματα με pH άνω του 8.5 και όξινα με pH κάτω του 3 και δεν καταστρέφεται με το μαγείρεμα. Δομικά η STX ανήκει στα τρικυκλικά αλκαλοειδή γουανιδίνης.



Σχήμα 16. Σχηματική απεικόνιση χημικής δομής σαξιτοξίνης (STX)

### 14.3 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Η STX προκαλεί το παραλυτικό σύνδρομο δηλητηρίασης από αστρακόδεσμα (Paralytic shellfish poisoning -PSP). Η Σαξιτοξίνη, όπως και η Τετροδοτοξίνη και οι παρόμοιου τύπου τοξίνες επιδρούν επί του κεντρικού νευρικού συστήματος προκαλώντας κατ' αρχήν σπασμούς και ανωμαλίες στην λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. Η δράση τους οφείλεται στον αποκλεισμό των διόδων των ιόντων  $\text{Na}^+$ , που ευρίσκονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων και μυϊκών κυττάρων με αποτέλεσμα να μην μεταβιβάζεται το ερέθισμα στα κύτταρα αυτά, αφού δεν μπορεί να δημιουργηθεί η απαραίτητη διαφορά δυναμικού στις νευρικές συνάψεις. Η STX συνδέεται αντιστρεπτά με το διάλυο ιόντων  $\text{Na}^+$  σε ισομοριακή αναλογία λόγω αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικά φορτισμένων ομάδων γουανιδινίου του STX με αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλικές ομάδες στη θέση 1 του διαύλου ιόντων  $\text{Na}^+$  εμποδίζοντας τη διέλευση των ιόντων.



Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση τρόπου δράσης STX. Η STX απεικονίζεται με πράσινο χρώμα, ο διάλυος  $\text{Na}^+$  απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, ο ρυθμιστής της τάσης του διαύλου με κίτρινο και η πύλη απενεργοποίησης με μπλε. Η PSP προκαλείται από την αλληλεπίδραση της STX και το μπλοκάρισμα της θέσης (site) 1.

Δηλητηρίαση με φυσικό τρόπο από STX συμβαίνει στον άνθρωπο συνήθως με κατανάλωση οστρακοειδών μολυσμένα με STX και συνήθως δεν είναι θανατηφόρες λόγω της μικρής ποσότητας STX που εμπεριέχεται.

Τα κλινικά συμπτώματα της STX εμφανίζονται από λίγα λεπτά έως 72 ώρες από την είσοδο της στον ανθρώπινο οργανισμό και είναι δοσοεξαρτώμενα. Τα πρώτα συμπτώματα μετά την κατάποση περιλαμβάνουν μυρμηγκιασμα στα χείλη και τη γλώσσα που προχωρά στα δάχτυλα των χεριών και των ποδιών. Η STX διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μπλοκάρει τις διόδους των ιόντων  $\text{Na}^+$  στο κεντρικό νευρικό σύστημα και εκεί οφείλονται οι κύριες παραλυτικές τις παρενέργειες<sup>112</sup>. Ακολούθως επέρχεται απώλεια ελέγχου των χεριών και των ποδιών. Επιπλέον εμφανίζεται δυσκολία στην αναπνοή λόγω παράλυσης των μυών του



στήθους και της κοιλιακής χώρας κάτι που σε υψηλές δόσεις STX οδηγεί στο θάνατο από ασφυξία. Σε περίπτωση λήψης της STX από το στόμα εμφανίζονται και συμπτώματα όπως κοιλιακός πόνος, διάρροια, ναυτία και έμετος<sup>113</sup>. Έχει αναφερθεί θανατηφόρα δόση STX στον άνθρωπο λιγότερο από 1 mg που είναι προσεγγιστικά 1.000 φορές τοξικότερη από το αέριο sarin<sup>114</sup>

#### 14.4 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Η STX ανήκει στη λίστα AG, επιπλέον αποτελεί απαγορευμένη ουσία ταυτόχρονα του Chemical Weapons Convention και του Biological Weapons Convention. Είναι πιθανός παράγοντας βιοτρομοκρατίας καθόσον:

- Υπάρχει δυνατότητα να χορηγηθεί με κατάποση ή με εισπνοή.
- Εμφανίζει αυξημένης δραστηριότητας μέσω της αναπνευστικής οδού και γρήγορη ανάπτυξης τοξικής συμπτωματολογίας.
- Υπάρχει δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε περίβλημα όπλων προώθησης όπως σφαίρες
- Δεν υπάρχει αντίδοτο και ειδική θεραπεία για την STX .

### 14.5 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
Proficient test	Μίξη παράλληλων τεχνικών HPLC-FLD, LC-MS/MS, ELISA και mouse bioassay ώστε να επιτευχθεί ανίχνευση διασφαλισμένης ποιότητας ανίχνευσης της STX από το πρόγραμμα EQUATOX	4.7 ng/mL	Toxic Freeze-Dried Algal Sample, Toxic Algal Extracts, Toxic Mussel Sample	115
LC-MS/MS	Υγρή χρωματογραφία για την απομόνωση της STX και συζευγμένη φασματοσκοπία μαζών.	1-5 ng/mL	Ούρα και νερό	116
high-performance ion-exchange chromatography and fluorescence detection	Παράλληλη ανίχνευση 7 τοξίνων που προκαλούν PSP συμπεριλαμβανομένης της STX με χρωματογραφία ανταλλαγής όντων για απομόνωση και κατόπιν εντοπισμό με μέτρηση φθορισμού. Διάρκεια περίπου 1 ώρα	0,03 ng/mL	Ομογενοποιημένα κύτταρα Alexandrium sp και ομογενοποιημένος ιστός shellfish	117
high-performance ion-exchange chromatography and turbo ion spray (TIS)/ MS detection	Παράλληλη ανίχνευση 7 τοξίνων που προκαλούν PSP συμπεριλαμβανομένης της STX με χρωματογραφία ανταλλαγής όντων για απομόνωση και κατόπιν εντοπισμό με φασματογραφία μαζών αφού προηγηθεί ιονισμός με turbo ion spray. Διάρκεια περίπου 1 ώρα	0.5 ng/mL	Ομογενοποιημένα κύτταρα Alexandrium sp και ομογενοποιημένος ιστός shellfish	-/-
Mouse bioassay (MBA)	Σε ποντίκια βάρους 20gr εγχέονται 1 ml όξινου εκχυλίσματος ιστού οστρακοειδών και καταγράφεται ο χρόνος που απαιτείται για το ζώο να πεθάνει. Τα εξαιρετικά τοξικά εκχυλίσματα αραιώνονται για να διασφαλιστεί ότι η θνησιμότητα εμφανίζεται εντός 5 έως 15 λεπτών.. Στις περισσότερες χώρες, το επίπεδο δράσης για το κλείσιμο της αλιείας είναι 400 MU / 100 g οστρακοειδών (1 MU είναι η ποσότητα τοξίνης που θα εγχύσει, η οποία θα σκότωνε ένα ποντίκι 20 g σε 15 λεπτά και ισοδυναμεί με 0,18 mg STX)	40 µg STX/100g	Επεξεργασμένος ιστός οστρακοειδών	118
Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format	Χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης και σε ταινίες ελέγχου. Διάρκεια 2 ώρες για τα πλακίδια και 30 λεπτά για τις ταινίες	3 και 4 ng/g αντίστοιχα	Επεξεργασμένος ιστός οστρακοειδών	119

Πίνακας 9. Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης STX από βιβλιογραφικές πηγές.

## 15. ΕΨΙΛΟΝ ΤΟΞΙΝΗ (ETX)

### 15.1 Οργανισμοί προέλευσης

Η ETX παράγεται από τους τύπους B και D του Gram θετικού βακτηρίου *Clostridium perfringens* (Κλωστηρίδιο το διαθλαστικό) κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Το εν λόγω βακτήριο απαντάται σε τουλάχιστον 6 ορότυπους και παράγει συνολικά περί τις 20 τοξίνες που ονομάζονται με τα γράμματα του Ελληνικού αλφαβήτου, εκ των οποίων θανατηφόρα δράση παρουσιάζουν η άλφα, η βήτα, η έψιλον και η γιώτα με δραστικότερη όλων την έψιλον.

Το *Clostridium perfringens* βρίσκεται στο φυσικό περιβάλλον στο έδαφος, τη σκόνη, σε σκουπίδια, σε πτώματα αλλά και στο γαστρεντερικό σωλήνα υγιών ζώων σε πολύ χαμηλό αριθμό.



Εικόνα 21. Αποικία *Clostridium perfringens*

### 15.2 Δομή-κατηγοριοποίηση-φυσικοχημικές ιδιότητες

Η ETX είναι μια πρωτεΐνη που αρχικά παράγεται ως προτοξίνη και έχει μοριακό βάρος μοριακού βάρους περί τα 32-33 kDa. Η ενεργή τοξίνη προκύπτει με αφαίρεση του N- άκρου (11-13 αμινοξέα) C-άκρου (22-29 αμινοξέα) από πρωτεάσες (κύρια αναφέρονται η α-χυμοθρυψίνη, η θρυψίνη και η λ-πρωτεάση) η οποία έχει μοριακό βάρος περί τα 28,6 kDa. Η ETX αποτελεί την τρίτη πιο δηλητηριώδεις έως τώρα γνωστή τοξίνη μετά την τοξίνη της αλλαντίασης και την νευροτοξίνη του τέτανου με πολύ υψηλή θνησιμότητα και θανατηφόρα δόση στα ποντίκια 70 ng/Kg (400,000 νεκρά ποντίκια ανά mg ETX)<sup>120</sup>

### 15.3 Τρόπος δράσης-κύριες παρενέργειες

Η ETX είναι μια κυτταροτοξίνη που παράγεται σε ρυθμό γεωμετρικής προόδου από το *Clostridium perfringens* ως προτοξίνη και κατόπιν όπως αναφέρθηκε μετατρέπεται σε ενεργή τοξίνη με τη δράση πρωτεασών στα έντερα.

Η ETX αποτελεί μια πρωτεΐνη που σχηματίζει πόρους στο κύτταρο στόχο και αυξάνει έτσι τη διαπερατότητα του σε μικρά μόρια και ιόντα. Αρχικά η τοξίνη προσδένεται σε κυτταρικούς υποδοχείς σε υπομονάδες της πλασματικής μεμβράνης πλούσιες σε χοληστερόλη, γνωστές ως σχεδίες λιπιδίων (lipid rafts) που προάγουν την συσσωμάτωση μονομερών τοξίνης σε ομοεπταμερή, ακολουθεί πολυμερισμός της τοξίνης που δίνει ένα επταμερές στην επιφάνεια της μεμβράνης και τελικά το επταμερές ενσωματώνεται στην μεμβράνη όπου ο διαμεμβρανικός πόρος που δημιουργεί και είναι μεγέθους  $\geq 2$  nm επιτρέπει την είσοδο ιόντων και μορίων έως περίπου 0,5-1 kDa, μειώνει τα ενδοκυτταρικά αποθέματα ιόντων Καλίου και αυξάνει τα ενδοκυτταρικά αποθέματα ιόντων Νατρίου και Χλωρίου. Επιπλέον οι πόροι που σχηματίζονται από τη ETX προκαλούν και κυτταροσκελετική δυσλειτουργία επηρεάζοντας την ακεραιότητα των κυτταρικών μονοστοιβάδων<sup>121</sup>

Κύριος τρόπος εισόδου της στον οργανισμό της ETX είναι με κατάποση. Αρχικά η δράση της ETX είναι τοπική στα έντερα με αύξηση της διαπερατότητας του βλενογόνου και κατόπιν η ETX περνάει και διαχέεται και σε άλλα όργανα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος προκαλώντας μικροαγγειακές ενδοθηλιακές αλλοιώσεις κυρίως στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες και τα νεφρά οδηγώντας σε τοξικό σοκ και τον θάνατο. Στα έντερα η ETX προκαλείται εντεροτοξαιμία. Στα νεφρά προκαλεί διάμεση αιμορραγία με οίδημα και εκφυλισμό του σωληνωτού επιθήλιου. Στον εγκέφαλο μεταβάλλει τη σταθερότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού προκαλώντας διμερείς συμμετρικές αλλοιώσεις με οίδημα σε πολλαπλά σημεία του εγκεφάλου με αποτέλεσμα αιμορραγία βλάβη και νέκρωση νευρώνων<sup>122</sup>.

Υπάρχει δυνατότητα η ETX να εισαχθεί στον οργανισμό από την αναπνευστική οδό σε μορφή αεροζόλ καθόσον είναι σταθερή σε φυσιολογικές περιβαλλοντικές συνθήκες για χρονικό διάστημα 8 ωρών και η έκθεση με εισπνοή έστω και για ένα λεπτό σε δόση 1 μg/kg μπορεί να είναι θανατηφόρα<sup>123</sup>. Στην εισπνοή η ETX προκαλεί σοβαρές βλάβες στους πνεύμονες με αιμορραγία, αιμόλυση, θρομβοκυτοπενία, όμως δεν υπάρχουν έως τώρα έρευνες για την ακριβείς παρενέργειες ειδικά σε εισπνοή και τα δεδομένα έχουν εξαχθεί από έρευνες σε ζώα.

#### 15.4 Συσχέτιση με βιοτρομοκρατία

Η ETX θεωρείται παράγων βιοτρομοκρατίας και ανήκει στην κατηγορία B του CDC και στο AG λόγω της υψηλότατης δραστικότητας, θνησιμότητας και σταθερότητας της. Επιπλέον υπάρχει δυνατότητα έκφρασης της ETX με ανασυνδυασμένο DNA σε *Escherichia coli* ώστε είναι δυνατή η παραγωγή συγκριτικά με την τοξικότητα της υψηλής ποσότητας. Πιθανοί οδοί έκθεσης σε ένα τρομοκρατικό χτύπημα θα ήταν η διασπορά της σε αεροζόλ και η χορήγηση της μέσω τροφίμων ή νερού. Δεν υπάρχει εγκεκριμένη θεραπεία για δηλητηρίασης από ETX.

## 15.5 Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης

Μέθοδος ανίχνευσης	Παρατηρήσεις	Όριο ανίχνευσης	Είδος δείγματος	παρ απο μπή
LC-SRM	Ανίχνευση 8 διαφορετικών τοξινών CBRN. Διάρκεια 20-24 ώρες.	20ng	Μίγμα «Κινέζικης» σούπας με προσθήκη LysC/trypsin	44
real-time PCR	Ανίχνευση γονιδίων του Clostridium perfringens	<50 αντίγραφα γενετικού υλικού	Καλλιεργείς που περιείχαν C. perfringens	124
Polyclonal capture enzyme-linked immunosorbent assay (PC-ELISA)	ELISA με χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων. Διάρκεια 2-3 ώρες.	0.075 mouse lethal dose (MLD)50/ml	Τοξίνη έψιλον σε περιεχόμενο εντόσθιων και σωματικά υγρά προβάτων και κατσικιών	125
Monoclonal capture ELISA (MC-ELISA)	ELISA με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Διάρκεια 2 ώρες	6 mouse lethal dose (MLD)50/ml	Τοξίνη έψιλον σε περιεχόμενο εντόσθιων και σωματικά υγρά προβάτων και κατσικιών	124
Mouse neutralization test (MNT)	Ενδοπεριτονιακή χορήγηση μίγματος θρυψίνης-τοξίνης ε κατάλληλα προετοιμασμένου σε ποντίκια. Διάρκεια 48 ώρες.	25 mouse lethal dose (MLD)50/ml	Τοξίνη έψιλον σε περιεχόμενο εντόσθιων και σωματικά υγρά προβάτων και κατσικιών	124
Counterimmunoelectrophoresis (CIEP)	Ηλεκτροφόρηση κατόπιν σύνδεσης αντισώματος με τη τοξίνη έψιλον. Διάρκεια 60 λεπτά και επανάληψη μετά από 8 ώρες.	50 mouse lethal dose (MLD)50/ml	Τοξίνη έψιλον σε περιεχόμενο εντόσθιων και σωματικά υγρά προβάτων και κατσικιών	124

Πίνακας 10. Ενδεικτικοί μέθοδοι ανίχνευσης ETX από βιβλιογραφικές πηγές.

## 16. Επίλογος

Ο συνδυασμός της τρομοκρατίας και των τοξινών οδηγεί σε μια μορφή βιοτρομοκρατίας ιδιαίτερα επικίνδυνη για την ανθρωπότητα. Μπορεί η χρήση τοξινών σε ένα τρομοκρατικό επεισόδιο να είναι ένα σενάριο χαμηλής πιθανότητας, είναι όμως ιδιαίτερα υψηλού κινδύνου και καταστροφικών συνεπειών κάτι για το οποίο υπάρχουν δυστυχώς και πολλά ιστορικά γεγονότα να μας το επιβεβαιώνουν.

Σύμφωνα με ένα λατινικό ρητό *Si vis pacem, para bellum* (αν θες ειρήνη, να ετοιμάζεσαι για πόλεμο) και κύριο όπλο στην μάχη ενάντια στην βιοτρομοκρατία είναι η πρόληψη και η έγκαιρη αντιμετώπιση της, που για να επιτευχθεί, απαιτεί την δυνατότητα ανίχνευσης των όπλων που χρησιμοποιούνται μεταξύ των οποίων κύρια θέση κατέχουν οι τοξίνες.

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν 10 κατηγορίες τοξινών που από άποψη τοξικότητας, ιστορικού χρήσης στο παρελθόν, φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και τρόπου παραγωγής είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν σε βιοτρομοκρατικές ενέργειες. Επιπλέον αναλύθηκε ο τρόπος δράσης των τοξινών αυτών καθώς και ενδεικτικοί τρόποι ανίχνευσης τους.

Δεν αποκλείεται η χρήση από τρομοκράτες άλλων τοξινών από τις χιλιάδες που υπάρχουν στη φύση όπως επίσης και η δημιουργία νέων γενετικά κατασκευασμένων με «βελτιωμένα» χαρακτηριστικά όπως και η συνδυαστική δράση τοξινών με άλλες μορφές όπλων.

Η ανίχνευση των τοξινών είναι ένα πρόβλημα δύσκολο στην επίλυση καθόσον εμπλέκονται πολλοί παράγοντες, για αυτό άλλωστε υπάρχουν και τόσες πολλές διαφορετικές τεχνικές και τεχνολογίες που προσπαθούν να παρακάμψουν προβλήματα που προκύπτουν όσον αφορά την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους σε διαφορετικά μέσα και περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το μέλλον της ανίχνευσης των τοξινών φαίνεται να προχωρά προς δύο κατευθύνσεις. Η μια αφορά τη χρήση φορητών συστημάτων που να μπορούν να ανιχνεύουν πολλαπλές τοξίνες σε διαφορετικά υποστρώματα, σε πραγματικές συνθήκες, μικρό χρονικό διάστημα με υψηλή ακρίβεια, χαμηλό όριο ανίχνευσης, επαναληψιμότητα και δυνατότητα παραμετροποίησης ώστε να μπορούν να ανιχνεύσουν και νέες τοξίνες. Τέτοια συστήματα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τους πρώτους ανταποκριτές που καλούνται να διερευνήσουν περιστατικά βιοτρομοκρατίας αλλά και για προληπτικές δράσεις. Σίγουρα ο στόχος αυτός είναι δύσκολος και ακόμη δεν υπάρχουν πιστοποιημένες μέθοδοι ανίχνευσης του συνόλου ή έστω της πλειονότητας των επικίνδυνων για βιοτρομοκρατίας τοξινών. Όμως η τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα της ανίχνευσης τελευταία δεκαετία και ειδικά στους βιοαισθητήρες και τα φορητά kit LOC (labs on chip) είναι ραγδαία και επιταχυνόμενη και είναι ορατή η συγχώνευση των χαρακτηριστικών που υπάρχουν σε υπάρχουσες τεχνολογίες σε φορητές συσκευές μεγέθους παλάμης σε αντιστοιχία με τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές, τις κάμερες, τις φωτογραφικές μηχανές και τα κινητά τηλέφωνα που συμπυχθήκαν σε smartphones. Η δεύτερη κατεύθυνση αφορά τη χρήση σταθερών συστημάτων στα πλαίσια της βιοπαρακολούθησης τα οποία να είναι τοποθετημένα

σε σημεία όπου είναι πιθανή η δράση βιοτρομοκρατών όπως για παράδειγμα αεροδρόμια ,μετρό, λιμάνια, κεντρικά σημεία πόλεων, εγκαταστάσεις υδροδότησης κλπ τα οποία να εκτελούν συνεχείς μετρήσεις και να ειδοποιούν έγκαιρα σε περίπτωση ανίχνευσης κάποιου παράγοντα κινδύνου.

Επειδή η βιοτρομοκρατία δεν είναι κάτι για το οποίο μπορούν να ληφθούν μέτρα σε ατομικό επίπεδο (εκτός και εάν κάποιος ζει σε ειδικά διαμορφωμένο καταφύγιο ή κυκλοφορεί με κατάλληλα προφυλακτικά μέσα όπως στην εικόνα) ,απαιτείται πέραν του νομοθετικού πλαισίου , δράσεις του συνόλου των κρατών και χρηματοδότηση για έρευνα και ανάπτυξη συστημάτων ανίχνευσης ώστε οι εμπλεκόμενοι φορείς να έχουν αξιόπιστα μέσα για να εντοπίσουν, να αποτρέψουν και να μειώσουν τις συνέπειες ενός πιθανού βιοτρομοκρατικού χτυπήματος.



Εικόνα 22. Σύστημα πλήρους κάλυψης ανθρώπου ,επιπέδου C2, ειδικά σχεδιασμένο για περιστατικά βιοπολέμου-βιοτρομοκρατίας.



## ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. EUR-Lex - 32000L0054 - EL. Eur-lex.europa.eu. 2017. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32000L0054&from=EN>. Accessed August 12, 2017.
2. Federal Select Agent Program - Select Agents and Toxins List. Selectagentsgov. 2017. Available at: <https://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html>. Accessed August 12, 2017.
3. The Australia Group - Biological Agents. Australia.group.net. 2017. Available at: [http://www.australiagroup.net/en/human\\_animal\\_pathogens.html](http://www.australiagroup.net/en/human_animal_pathogens.html). Accessed August 12, 2017.
4. Terrorist CBRN: Materials and Effects — Central Intelligence Agency. Ciagov. 2017. Available at: [https://www.cia.gov/library/reports/general-reports-1/terrorist\\_cbrn/terrorist\\_CBRN.htm](https://www.cia.gov/library/reports/general-reports-1/terrorist_cbrn/terrorist_CBRN.htm). Accessed August 16, 2017.
5. Bacon D. Biological warfare: an historical perspective. *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*. 2003;22(4):224-229. doi:10.1053/s0277-0326(03)00039-4.
6. Richardt A. CBRN Protection. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2013:21.
7. The Biological Weapons Convention – UNODA. Unorg. 2017. Available at: <https://www.un.org/disarmament/geneva/bwc/>. Accessed September 1, 2017.
8. EQuATox project. Equatoxeu. 2017. Available at: [http://www.equatox.eu/equatox\\_project/index.html](http://www.equatox.eu/equatox_project/index.html). Accessed September 17, 2017.
9. Lim D, Simpson J, Kearns E, Kramer M. Current and Developing Technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and Biowarfare. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(4):583-607. doi:10.1128/cmr.18.4.583-607.2005.
10. xMAP® Biothreat Toxin Panel Product Details. Luminex Corporation. 2017. Available at: <https://www.luminexcorp.com/research/applied-markets/biodefense/xmap-biothreat-toxin-panel/product-details/>. Accessed September 27, 2017.
11. Hartmann, E. M., & Halden, R. U. (2011). Challenges of detecting bioterrorism agents in complex matrices. In *Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism* (pp. 149-162). (NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology).
12. Schwartz M. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: A short history of anthrax. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30(6):347-355. doi:10.1016/j.mam.2009.06.004.
- 13 2001 anthrax attacks. Enwikipediaorg. 2017. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/2001\\_anthrax\\_attacks](https://en.wikipedia.org/wiki/2001_anthrax_attacks). Accessed September 6, 2017.
14. Brossier F, Mock M. Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*. 2001;39(11):1747-1755. doi:10.1016/s0041-0101(01)00161-1.
15. Anthrax | CDC. Cdcgov. 2017. Available at: <https://www.cdc.gov/anthrax/index.html>. Accessed August 10, 2017.
16. Abrami L, Reig N, van der Goot F. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends in Microbiology*. 2005;13(2):72-78. doi:10.1016/j.tim.2004.12.004.
17. Arnon S, Schechter R, Inglesby T et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. *JAMA*. 2001;285(8):1059. doi:10.1001/jama.285.8.1059.

- 
18. Eurosurveillance - An outbreak of infection with *Bacillus anthracis* in injecting drug users in Scotland. Eurosurveillance.org. 2017. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19465>. Accessed August 11, 2017.
  19. Kalb S, Boyer A, Barr J. Mass Spectrometric Detection of Bacterial Protein Toxins and Their Enzymatic Activity. *Toxins*. 2015;7(9):3497-3511. doi:10.3390/toxins7093497.
  20. P. CIEŚLIK et al. Real-Time PCR Identification of Unique *Bacillus anthracis* Sequences. *Folia Biologica (Praha)* 61,178-183 (2015)
  21. Qi Y, Patra G, Liang X et al. Utilization of the *rpoB* Gene as a Specific Chromosomal Marker for Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(8):3720-3727. doi:10.1128/aem.67.8.3720-3727.2001.
  22. Biagini R, Sammons D, Smith J et al. Rapid, Sensitive, and Specific Lateral-Flow Immunochromatographic Device To Measure Anti-Anthrax Protective Antigen Immunoglobulin G in Serum and Whole Blood. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006;13(5):541-546. doi:10.1128/cvi.13.5.541-546.2006.
  23. Kuklenyik Z, Boyer A, Lins R et al. Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for Endopeptidase Activity-Based Quantification of Anthrax Lethal Factor in Serum. *Analytical Chemistry*. 2011;83(5):1760-1765. doi:10.1021/ac1030144.
  24. Shlyakhov E, Rubinstein E. Rapid Bioassay for Detection of *Bacillus anthracis* in Mice. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1995;42(1-10):361-368. doi:10.1111/j.1439-0450.1995.tb00722.x.
  25. van Ermengem, E., 1979. Classics in infectious disease: a new anaerobic bacillus and its relationship to botulism (translation of original 1897 article). *Reviews of Infectious Diseases* 1, 701e719.
  26. Peck M, Stringer S, Carter A. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiology*. 2011;28(2):183-191. doi:10.1016/j.fm.2010.03.005.
  27. Botulinum Toxin: Overview, History, Mechanism of Action. Emedicine.medscape.com. 2017. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/325451-overview#a3>. Accessed September 1, 2017.
  28. Smith T, Lou J, Geren I et al. Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization. *Infection and Immunity*. 2005;73(9):5450-5457. doi:10.1128/iai.73.9.5450-5457.2005.
  29. Havaselvam, D., & Vijayaraghavan, R. (2010). Biological warfare agents. *J Pharm Bioallied Sci*, 2(3), 179-188. doi:10.4103/0975-7406.68499
  30. Team B. BioModels Database. Ebiacuk. 2017. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/static-pages.do?page=ModelMonth%2F2010-08>. Accessed September 19, 2017.
  31. Arnon S, Schechter R, Inglesby T et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. *JAMA*. 2001;285(8):1059. doi:10.1001/jama.285.8.1059.
  32. Botulism. World Health Organization. 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/en/>. Accessed July 28, 2017.
  - 33 Stony Brook University. Stonybrookedu. 2017. Available at: [http://www.stonybrook.edu/commcms/ojima\\_group/research/BoNT.html](http://www.stonybrook.edu/commcms/ojima_group/research/BoNT.html). Accessed September 1, 2017.

- 
34. Arnon S, Schechter R, Inglesby T et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. *JAMA*. 2001;285(8):1059. doi:10.1001/jama.285.8.1059.
  35. Schantz EJ, Kautter DA. Standardized assay for Clostridium botulinum toxins. *J Assoc Off Anal Chem*. 1978;61:96–9.
  36. Ferreira J, Eilasberg S, Edmonds P, Harrison M. Comparison of the Mouse Bioassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedures for the Detection of Type A Botulinal Toxin in Food. *Journal of Food Protection*. 2004;67(1):203-206. doi:10.4315/0362-028x-67.1.203.
  37. Zhang Y, Lou J, Jenko K, Marks J, Varnum S. Simultaneous and sensitive detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using enzyme-linked immunosorbent assay-based protein antibody microarrays. *Analytical Biochemistry*. 2012;430(2):185-192. doi:10.1016/j.ab.2012.08.021.
  38. Kalb S, Goodnough M, Malizio C, Pirkle J, Barr J. Detection of Botulinum Neurotoxin A in a Spiked Milk Sample with Subtype Identification through Toxin Proteomics. *Analytical Chemistry*. 2005;77(19):6140-6146. doi:10.1021/ac0511748.
  39. Wu, Huang, Lai, Huang, Shaio. Detection of Clostridium botulinum neurotoxin type A using immuno-PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 2001;32(5):321-325. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00909.x.
  40. Ahn-Yoon S, DeCory T, Durst R. Ganglioside?liposome immunoassay for the detection of botulinum toxin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004;378(1):68-75. doi:10.1007/s00216-003-2365-4.
  41. Boroff, D. A., & Shu-Chen, G. (1973). Radioimmunoassay for Type A Toxin of Clostridium botulinum. *Applied Microbiology*, 25(4), 545–549
  42. Crompton R, Gall D. Georgi Markov: death in a pellet. *Med Leg J*. 1980;48:51-62
  43. Zilinskas R. Iraq's Biological Weapons. *JAMA*. 1997;278(5):418. doi:10.1001/jama.1997.03550050080037.
  44. Investigation of a Ricin-Containing Envelope at a Postal Facility --- South Carolina, 2003. Cdcgov. 2017. Available at: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5246a5.htm>. Accessed August 8, 2017.
  45. Balint G. Ricin: The toxic protein of castor oil seeds. *Toxicology*. 1974;2(1):77-102. doi:10.1016/0300-483x(74)90044-4.
  46. Ishiguro M, Tomi M, Funatsu G, Funatsu M. Isolation and chemical properties of a ricin variant from castor bean. *Toxicon*. 1976;14(3):157-165. doi:10.1016/0041-0101(76)90001-5.
  47. Public Health Response To Biological And Chemical Weapons. Geneva: WHO; 2004:225.
  48. Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*. 2004;44(4):361-370. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.003.
  49. Alhamdani, M., Brown, B., & Narula, P. (2015). Abrin Poisoning in an 18-Month-Old Child. *The American Journal of Case Reports*, 16, 146–148. <http://doi.org/10.12659/AJCR.892917>
  50. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin Poisoning. *JAMA*. 2005;294(18):2342. doi:10.1001/jama.294.18.2342.
  51. Zhang, T., Kang, L., Gao, S., Yang, H., Xin, W., Wang, J., ... Wang, J. (2014). Truncated abrin A chain expressed in Escherichia coli: A promising vaccine candidate. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(9), 2648–2655. <http://doi.org/10.4161/hv.29645>

- 
52. Koja N, Shibata T, Mochida K. Enzyme-linked immunoassay of ricin. *Toxicon*. 1980;18(5-6):611-618. doi:10.1016/0041-0101(80)90088-4.
53. Poli M, Rivera V, Hewetson J, Merrill G. Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA. *Toxicon*. 1994;32(11):1371-1377. doi:10.1016/0041-0101(94)90409-x.
54. Narang U, Anderson G, Ligler F, Burans J. Fiber optic-based biosensor for ricin. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997;12(9-10):937-945. doi:10.1016/s0956-5663(97)00027-4.
55. Simonova M, Valyakina T, Petrova E et al. Development of xMAP Assay for Detection of Six Protein Toxins. *Analytical Chemistry*. 2012;84(15):6326-6330. doi:10.1021/ac301525q.
56. Tran H, Leong C, Loke W, Dogovski C, Liu C. Surface plasmon resonance detection of ricin and horticultural ricin variants in environmental samples. *Toxicon*. 2008;52(4):582-588. doi:10.1016/j.toxicon.2008.07.008.
57. Feltis B, Sexton B, Glenn F, Best M, Wilkins M, Davis T. A hand-held surface plasmon resonance biosensor for the detection of ricin and other biological agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008;23(7):1131-1136. doi:10.1016/j.bios.2007.11.005.
58. HE X, McMahon S, McKeon T, Brandon D. Development of a Novel Immuno-PCR Assay for Detection of Ricin in Ground Beef, Liquid Chicken Egg, and Milk. *Journal of Food Protection*. 2010;73(4):695-700. doi:10.4315/0362-028x-73.4.695.
59. Duriez E, Fenaille F, Tabet J et al. Detection of Ricin in Complex Samples by Immunocapture and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(9):4154-4163. doi:10.1021/pr8003437.
60. Zhan J, Zhou P. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicology*. 2003;186(1-2):119-123. doi:10.1016/s0300-483x(02)00726-6.
61. Kanamori-Kataoka M, Kato H, Uzawa H et al. Determination of ricin by nano liquid chromatography/mass spectrometry after extraction using lactose-immobilized monolithic silica spin column. *Journal of Mass Spectrometry*. 2011;46(8):821-829. doi:10.1002/jms.1953.
62. Felder, E., Mossbrugger, I., Lange, M., & Wölfel, R. (2012). Simultaneous Detection of Ricin and Abrin DNA by Real-Time PCR (qPCR). *Toxins*, 4(9), 633–642. <http://doi.org/10.3390/toxins4090633>
63. Pauly D, Worbs S, Kirchner S, Shatohina O, Dorner M, Dorner B. Real-Time Cytotoxicity Assay for Rapid and Sensitive Detection of Ricin from Complex Matrices. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35360. doi:10.1371/journal.pone.0035360.
64. Gilquin B, Jaquinod M, Louwagie M et al. A proteomics assay to detect eight CBRN-relevant toxins in food. *PROTEOMICS*. 2016;17(1-2):1600357. doi:10.1002/pmic.201600357.
65. Dembek Z, Alves D. *USAMRIID's Medical Management Of Biological Casualties Handbook*. Fort Detrick, Md.: U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases; 2011:136.
66. Pinchuk I, Beswick E, Reyes V. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*. 2010;2(8):2177-2197. doi:10.3390/toxins2082177.
67. CBRNE - Staphylococcal Enterotoxin B: Background, Pathophysiology, Epidemiology. *Emedicinemedscapecom*. 2017. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/830715-overview>. Accessed September 1, 2017.
68. Poli M, Rivera V, Neal D. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. *Toxicon*. 2002;40(12):1723-1726. doi:10.1016/s0041-0101(02)00202-7.

- 
69. Haes A, Terray A, Collins G. Bead-Assisted Displacement Immunoassay for Staphylococcal Enterotoxin B on a Microchip. *Analytical Chemistry*. 2006;78(24):8412-8420. doi:10.1021/ac061057s.
70. Marconi S, Ferracci G, Berthomieu M et al. A protein chip membrane-capture assay for botulinum neurotoxin activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008;233(3):439-446. doi:10.1016/j.taap.2008.09.005.
71. Gilligan K, Shipley M, Stiles B, Hadfield T, Sofi Ibrahim M. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Molecular and Cellular Probes*. 2000;14(2):71-78. doi:10.1006/mcpr.2000.0286.
72. Sapsford K, Taitt C, Loo N, Ligler F. Biosensor Detection of Botulinum Toxoid A and Staphylococcal Enterotoxin B in Food. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(9):5590-5592. doi:10.1128/aem.71.9.5590-5592.2005.
73. K.D. King, G.P. Anderson, K.E. Bullock, M.J. Regina, E.W. Saaski, F.S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 163.
74. Tumer N, Li X. Interaction of Ricin and Shiga Toxins with Ribosomes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2011:1-18. doi:10.1007/82\_2011\_174.
75. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 73: *E. coli: Shiga Toxin Methods and Protocols* Edited by: D. Philpott and F. Ebel © Humana Press Inc., Totowa, NJ
76. Tesh, V. L., Burris, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolkowski, E. A., O'Brien, A. D., & Samuel, J. E. (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infection and Immunity*, 61(8), 3392–3402.
77. Pacheco A, Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00081.
78. Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum*, 2(2), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
79. Yutsudo T, Honda T, Miwatani T, Takeda Y. Characterization of Purified Shiga Toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Microbiology and Immunology*. 1986;30(11):1115-1127. doi:10.1111/j.1348-0421.1986.tb03041.x.
80. Tesh, V. L., Burris, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolkowski, E. A., O'Brien, A. D., & Samuel, J. E. (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infection and Immunity*, 61(8), 3392–3402.
81. Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Cheung, R., and Arbus, G. S. (1985) Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 22, 614–619.
82. Meridian Bioscience, Inc. Meridianbioscience.com. 2017. Available at: <http://www.meridianbioscience.com/diagnostic-products/foodborne/premier/premier-ehec.aspx>. Accessed August 11, 2017.
83. Vallieres E, Saint-Jean M, Rallu F. Comparison of Three Different Methods for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in a Tertiary Pediatric Care Center. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;51(2):481-486. doi:10.1128/jcm.02219-12.

- 
84. Wannemacher, R.W., Wiener, S.L., 1997. Trichothecene mycotoxins. In: Sidell, F.R., Takafuji, E.T., Franz, D.R. (Eds.), *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Office of the Surgeon General at TMM Publications, Washington, DC, USA, pp. 655–676
85. Chan, P.K.C., Gentry, P.A., 1984. LD50 values and serum biochemical changes induced by T-2 toxin in rats and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 402–410.
86. Pal A, Acharya D, Saha D, Dhar T. Development of a Membrane-Based Immunofiltration Assay for the Detection of T-2 Toxin. *Analytical Chemistry*. 2004;76(14):4237-4240. doi:10.1021/ac049631s.
87. T. Yoshizawa, H. Kohno, K. Ikeda, et al. A Practical Method for Measuring Deoxynivalenol, Nivalenol, and T-2 + HT-2 Toxin in Foods by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2004;68(10):2076-2085. doi:10.1271/bbb.68.2076.
88. Schothorst R, Jekel A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry*. 2001;73(1):111-117. doi:10.1016/s03088146(00)00321-6.
89. Kotal F, Holadová K, Hajšlová J, Poustka J, Radová Z. Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A*. 1999;830(1):219-225. doi:10.1016/s0021-9673(98)00720-1.
90. Schmidt R. HPLC of trichothecenes — Separation of neosolaniol, NT-1 toxin, and NT-2 toxin. *Mycotoxin Research*. 1986;2(1):39-43. doi:10.1007/bf03191961.
91. Biancardi A, Gasparini M, Dall'Asta C, Marchelli R. A rapid multiresidual determination of type A and type B trichothecenes in wheat flour by HPLC-ESI-MS. *Food Additives and Contaminants*. 2005;22(3):251-258. doi:10.1080/02652030500110923.
92. Dawlatana M, Coker R, Nagler M, Gibbs J, Blunden G. An HPTLC method for the quantitative determination of T-2 toxin and deoxynivalenol in rice. *Chromatographia*. 1999;49(9-10):547-551. doi:10.1007/bf02467757.
93. Captain Cook — food poisoning victim. *Pharmaceutical Journal*. 2017. Available at: <http://www.pharmaceutical-journal.com/opinion/blogs/captain-cook-food-poisoning-victim/20066211.blog>. Accessed August 20, 2017.
94. Nguyen T, Nguyen H, Nghe D, Nguyen K. Biological Activities of Tetrodotoxin-Producing *Enterococcus faecium* AD1 Isolated from Puffer Fishes. *BioMed Research International*. 2015;2015:1-8. doi:10.1155/2015/973235.
95. Tetrodotoxin. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2017. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tetrodotoxin#section=Top>. Accessed August 5, 2017.
96. Tetrodotoxin - Toxipedia. Toxipedia.org. 2017. Available at: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Tetrodotoxin>. Accessed August 5, 2017.
97. CDC - The Emergency Response Safety and Health Database: Biotxin: TETRODOTOXIN - NIOSH. Cdcgov. 2017. Available at: [https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard\\_29750019.html](https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750019.html). Accessed August 5, 2017.
98. CDC - The Emergency Response Safety and Health Database: Biotxin: TETRODOTOXIN - NIOSH. Cdcgov. 2017. Available at: [https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard\\_29750019.html](https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750019.html). Accessed August 12, 2017.

- 
99. Ψάρεψαν δηλητηριώδη λαγοκέφαλο στη Νάξο. Protothemagr. 2017. Available at: <http://www.protothema.gr/environment/article/314254/psarepsan-dilitiriodi-lagokefalo-sti-naxo/>. Accessed August 9, 2017.
100. Noguchi, T., Ebesu, J.S.M., 2001. Puffer poisoning: epidemiology and treatment. *Toxin Rev.* 20, 1–10.
101. Tetrodotoxin T8024. Sigma-Aldrich. 2017. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8024?lang=en&region=GR>. Accessed August 9, 2017.
102. Vlamis A, Katikou P, Rodriguez I et al. First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins*. 2015;7(5):1779-1807. doi:10.3390/toxins7051779.
103. Yu C, Yu C, Tam S, Hoi-Fu Yu P. Rapid screening of tetrodotoxin in urine and plasma of patients with puffer fish poisoning by HPLC with creatinine correction. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2010;27(1):89-96. doi:10.1080/02652030903207250.
104. Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T, Yasumoto T. Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetrodotoxin and Its Analogs: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Tandem Mass Spectrometry, and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2001;290(1):10-17. doi:10.1006/abio.2000.4953.
105. Hamasaki K, Kogure K, Ohwada K. A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): Tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon*. 1996;34(4):490-495. doi:10.1016/0041-0101(95)00151-4.
106. Kawabata T. Food Hygiene Examination Manual, Vol. II. Japan Food Hygiene Association; Tokyo, Japan: 1978. Assay Method for Tetrodotoxin; pp. 232–240
107. Zhong Q, Huang A, Wang B, Dong X. Development of Direct Competitive ELISA Kit for the Detection of Tetrodotoxin Using HRP Labeled Antigen. *Advanced Materials Research*. 2011;236-238:2820-2824. doi:10.4028/www.scientific.net/amr.236-238.2820.
108. Thattiyaphong A, Unahalekhaka J, Mekha N, Nispa W, Kluengklangdon P, Rojanapantip L. Efficiency of a rapid test for detection of tetrodotoxin in puffer fish. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2013;35(2):111-119. doi:10.1080/15321819.2013.802698.
109. Barnes P., Campbell K., Haughey S., Elliott C., Higgins C.H., Botana L.M., Vasconcelos V. Single laboratory validation of a screening method for detection of Tetrodotoxin in *Charonica lampas lampas* using a Surface Plasmon Resonance Biosensor; Proceeding of the AOAC Marine and Freshwater Taskforce Meeting; Vigo, Spain. 1–5 May 2011
110. Lin W.C., Jen H.C., Chen C.L., Hwang D.F., Chang R., Hwang J.S., Chiang H.P. SERS study of Tetrodotoxin (TTX) by using silver nanoparticles arrays. *Plasmonics*. 2009;4:187–192. doi: 10.1007/s11468-009-9090-6.
111. Fluidic force discrimination assays: a new technology for tetrodotoxin detection. *Yakes BJ, Etheridge SM, Mulvaney SP, Tamanaha CR Mar Drugs*. 2010 Mar 10; 8(3):565-76.
112. Van der Merwe D. Freshwater cyanotoxins. *Biomarkers in Toxicology*. 2014:539-548. doi:10.1016/b978-0-12-404630-6.00031-2.
113. Wood S, Longley-Wood K, Reenstra W. Marine Toxin Attack. *Ciottone's Disaster Medicine*. 2016:798-800. doi:10.1016/b978-0-323-28665-7.00156-4.



- 
114. Osterbauer P, Dobbs M. Neurobiological Weapons. *Clinical Neurotoxicology*. 2009;631-645. doi:10.1016/b978-032305260-3.50061-7.
115. Harju K, Rapinoja M, Avondet M et al. Results of a Saxitoxin Proficiency Test Including Characterization of Reference Material and Stability Studies. *Toxins*. 2015;7(12):4852-4867. doi:10.3390/toxins7124852.
116. Johnson R, Kalb S, Barr J. Toxin Analysis Using Mass Spectrometry. *Microbial Forensics*. 2011;405-420. doi:10.1016/b978-0-12-382006-8.00024-4.
117. Jaime E, Hummert C, Hess P, Luckas B. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001;929(1-2):43-49. doi:10.1016/s0021-9673(01)01181-5.
118. Marine biotoxins. *Fao.org*. 2017. Available at: <http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e07.htm>. Accessed September 21, 2017.
119. Usleber E, Schneider E, Terplan G. Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish. *Letters in Applied Microbiology*. 1991;13(6):275-277. doi:10.1111/j.1472-765x.1991.tb00627.x.
120. Wioland L, Dupont J, Bossu J, Popoff M, Poulain B. Attack of the nervous system by *Clostridium perfringens* Epsilon toxin: From disease to mode of action on neural cells. *Toxicon*. 2013;75:122-135. doi:10.1016/j.toxicon.2013.04.003.
121. Stiles B, Barth G, Barth H, Popoff M. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man?. *Toxins*. 2013;5(11):2138-2160. doi:10.3390/toxins5112138.
122. Berger T, Eisenkraft A, Bar-Haim E, Kassirer M, Aran A, Fogel I. Toxins as biological weapons for terror—characteristics, challenges and medical countermeasures: a mini-review. *Disaster and Military Medicine*. 2016;2(1). doi:10.1186/s40696-016-0017-4.
123. Barkley Brunett L. *Clostridium perfringens* toxin (epsilon toxin) attack. In: Ciottone GR, Anderson PD, editors. *Disaster medicine*. 1. Maryland Heights: Mosby Inc.; 2006. p. 705.
124. Doggett N, Gans J, Henrie M, Dighe P, Wolinsky M. In silico design and experimental screening of real-time PCR assays for the detection of *Clostridium perfringens* and *Clostridium tetani* toxin genes. *Toxicon*. 2013;68:84. doi:10.1016/j.toxicon.2012.07.076.
125. Uzal F, Kelly W, Thomas R, Hornitzky M, Galea F. Comparison of Four Techniques for the Detection of *Clostridium Perfringens* Type D Epsilon Toxin in Intestinal Contents and other Body Fluids of Sheep and Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2003;15(2):94-99. doi:10.1177/104063870301500202.