

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

kan rekvireres fra Virologisk Afdeling, Statens Serum Institut. På Virologisk Afdeling undersøges der samtidig for de hyppigste dirrefentialdiagnostiske virus (herpes zoster og herpes simplex virus type I og II).

**Feltmæssig udredningsstøtte**

Mistanke om udlægning (type 1-situation) af koppevirus eller andet biologisk kampstof som led i et terroranslag i Danmark eller ved en udsendt dansk militær enhed i udlandet medfører indsættelse af et udredningshold fra Center for Biologisk Beredskab. Prøvetagning fra udlægningsområdet og efterfølgende laboratorieanalyse samt spredningsvurdering lægges til grund for de relevante myndigheders beslutning om indsats.

Ved klinisk mistanke (type 2-situation) om koppesygdom hos en patient skal den behandlende læge kontakte den vagthavende embedslæge, som herefter konsulterer Center for Biologisk Beredskabs døgnvagt for yderligere tiltag som f.eks. indlæggelse på et sygehus. Herved kan der umiddelbart opnås rådgivning om trusselsbilledet, diagnosen og eventuel prøvetagning.

Med henblik på at sikre hurtig diagnostik og inddæmning af uafklarede kliniske og veterinære sygdomsudbrud med humanpatogen interesse af væsentligt omfang eller af alvorlig karakter er der foreslået etablering af en operativ ekspertise til afklaring af ætiologi, kilde og risiko [9].

Korrespondance: Erik Heegaard, Center for Biologisk Beredskab, Statens Serum Institut, DK-2330 København S. E-mail: erh@ssi.dk

Antaget: 21. februar 2005  
Interessekonflikter: Ingen angivet

**Litteratur**

1. Tucker JB, Zilinskas RA. The 1971 Smallpox Epidemic in Aralsk, Kazakhstan, and the Soviet Biological Warfare Program. 2002. <http://cns.miiis.edu/pubs/opapers/op9/index.htm> /feb. 2005.
2. Statens Serum Institut, Sundhedsstyrelsen. Operationel plan ved trussel om eller forekomst af koppeudbrud i eller uden for Danmark. 2004. [http://www.sst.dk/publ/Publ2004/Koppeplan\\_juni\\_2004\\_SST.pdf](http://www.sst.dk/publ/Publ2004/Koppeplan_juni_2004_SST.pdf) /feb. 2005.
3. Protecting Americans: Smallpox Vaccination Program. 2002. <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/vaccination/vaccination-program-statement.asp> /feb. 2005.
4. Gibson WA. Mass smallpox immunization program in a deployed military setting. *Am J Emerg Med* 2004;22:267-9.
5. Health Protection Agency. Smallpox. 2004. [http://www.hpa.org.uk/infections/topics\\_az/smallpox/menu.htm](http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/smallpox/menu.htm) /feb. 2005.
6. Harrison SC, Alberts B, Ehrenfeld E et al. Discovery of antivirals against smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11178-92.
7. De Clercq E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Res* 2002;55:1-13.
8. Lofquist JM, Weimert NA, Hayney MS. Smallpox: a review of clinical disease and vaccination. *Am J Health Syst Pharm* 2003;60:749-56.
9. Heegaard ED, Hansen JS. Den biologiske trussel og det biologiske beredskab i Danmark. *Ugeskr Læger* 2005;167:3381-4.

## Botulinum- og ricintoksiner

Overlæge Niels Henrik H. Heegaard,  
cand.scient. Natascha Helena Beyer,  
laboratorietekniker Ewa Kogutowska,  
laborant Julia T. Tanassi,  
laboratoriefuldægtig Søren Munk Jensen,  
cand.scient. Keld Andresen &  
overlæge Jens Jørgen Christensen

Statens Serum Institut, Autoimmunafdelingen og  
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, og  
Danmarks Fødevarerforskning, Veterinær Diagnostik og Forskning

**Resume**

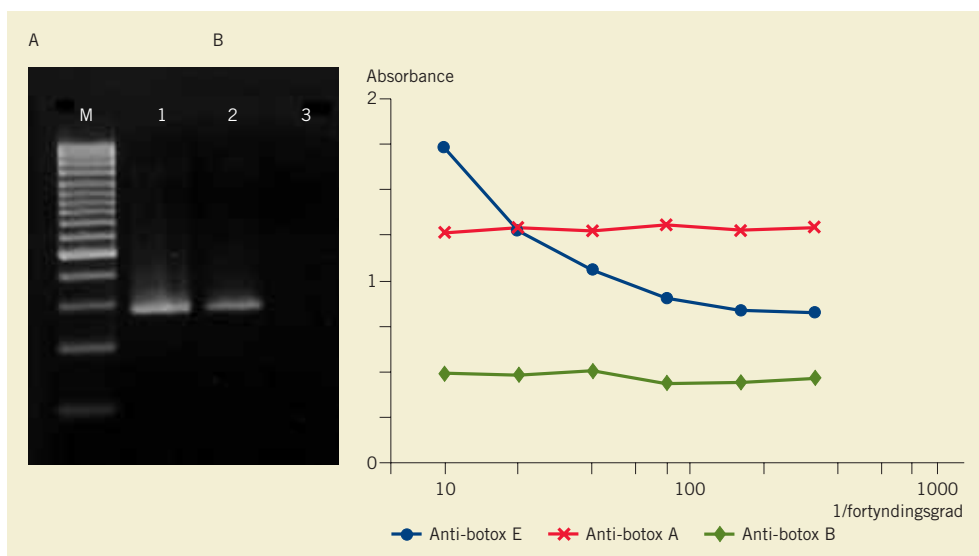
De toksiner, der er mest aktuelle i forbindelse med biologisk terrorisme, er ricin og toksinerne fra *Clostridium botulinum*. Dette skyldes deres ekstreme, akutte giftighed, deres relativt lette tilgængelighed og de aktuelle og historiske eksempler på deres anvendelse.

Der gives her en oversigt over de to grupper af toksiner, deres forekomst, forgiftningernes symptomatologi og de diagnostiske muligheder med specielt fokus på miljøprøver. Illustration af anvendelsen af de forskellige diagnostiske metoder gives i forbindelse med to situationer, hvor der var mistanke om tilstedeværelse af toksin i henholdsvis fødevarer (gærede sælluffer) og en pulverprøve.

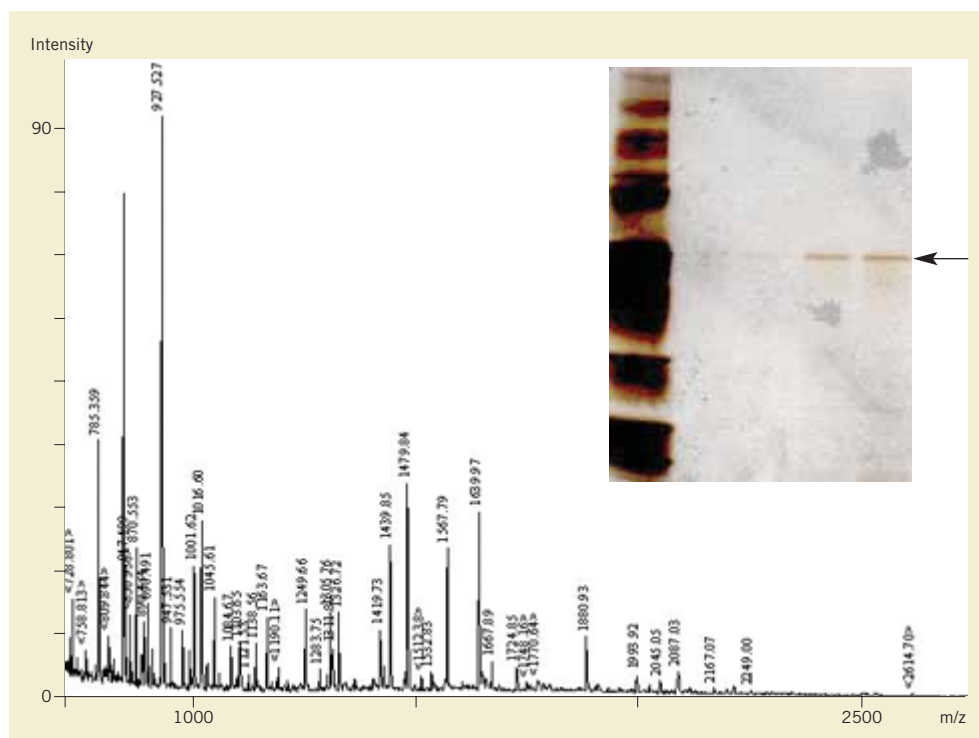
Ricin og toksinerne fra *Clostridium botulinum* er blandt verdens mest potente gifte [1]. Letal dosis (LD<sub>50</sub>) ved parenteral indgift hos mus af botulinumtoksin er ca. 1 ng/kg [1], hvorfor 0,1 µg er en potentielt dødelig dosis for en voksen person. Ricin, toksinet fra *ricinus communis* (kristpalme), er ca. 1.000 gange mindre giftigt med en anslået LD<sub>50</sub> på 0,1-1,0 µg/kg afhængigt af administrationsmåden [2].

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

**Figur 1.** Botulinumtoksinpåvisning. **A.** Polymerasekædereaktion for *Clostridium botulinum*, type E på en sælluffe. M = 100 bp DNA-markør; 1 = sælluffe; 2 = positiv kontrol; 3 = negativ kontrol. Der ses et specifikt botulinumtoksin type E-amplicon på 279 bp i den ukendte prøve (lane 1) og i den positive kontrol (lane 2). **B.** Capture *immune-assay* for botulinumtoksin i ekstrakt af en sælluffe. Anti-A-signalet ligger på et højt niveau, men signalet udviser ingen udtitrering med stigende prøvefortynding i modsætning til anti-E-signalet.



**Figur 2.** Undersøgelse af en bioterrormistænkelig prøve. Massespektrometrisk analyse af fragmenter fra gelbånd. Der er stor sekvensdækning, som muliggør en sikker identifikation af materialet fra gelen (bånd markeret med pil) som bovint serumalbumin.



Centers for Disease Control and Prevention (CDC) har placeret botulinumtoksiner i kategori A, dvs. de farligste bioterrormidler. Botulinumtoksin til våbenbrug blev fundet i Irak og er blevet forsøgt udviklet i Japan [3]. Toksinerne er neurotoksiske og rammer den neuromuskulære transmission. Resultatet, paralyse og død, skyldes lammelser af respirationsmuskulaturen i et klinisk syndrom benævnt botulisme (pølseforgiftning, botulus betyder pølse). Ricin er placeret i CDC's kategori B og har flere gange været anvendt til mord og mordforsøg [3], ligesom der i England og Frankrig er optrevet terrorceller, der bl.a. oprenede ricin. Det kliniske billede ved

ricinforgiftning er i modsætning til botulismeforgiftning ukarakteristisk og præget af organsvigt. Symptomerne kan være blodig diare og opkast, letargi og respirationsbesvær. Aerosoludsættelse er mindst lige så dødelig som systemisk indgift. Histologisk ses der organskade som følge af multiple fokale blødninger.

I beredskabet mod bioterrorisme har udvikling af botulinumtoksin- og ricintoksin-*assays* høj prioritet, og Statens Serum Institut (SSI) har derfor udviklet immun-*assays* for botulinumtoksin type A-F til supplement til de sædvanlige musebaserede bio-*assays* bl.a. for at sikre simple og hurtige under-

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

søgelse. SSI har ligeledes udviklet såvel immunkemiske som massespektrometriske metoder til påvisning af ricin. Vi vil her illustrere eksempler på disse metoders anvendelse.

### Toksinanalyser ved kliniske tilfælde og i pulverprøver Botulismetilfælde

Forgiftning med botulinumtoksin er under normale forhold meget usædvanlig. Af de syv botulinumtoksintyper A-G er A, B, E og i sjældne tilfælde type F årsag til forgiftninger hos mennesket [4]. Sporadiske tilfælde opstår typisk i forbindelse med indtagelse af jordbakterieforurenede fødevarer, som har kunnet inkubere under anaerobe forhold, specielt marine produkter og grøntsager [5]. I Danmark kan mange tilfælde af botulisme relateres til fødeemner, der er blevet behandlet på traditionel grønlandsk vis. Identifikationen af toksinet i sin rene form – dvs. uden tilstedeværende *Clostridii*-bakterier – kan ikke ske med DNA-baserede metoder, men fordrer et *bio-assay* med neutraliserende antistoffer eller immun- og proteinkemiske *assays*. De udviklede immun-*assays* har i øjeblikket den nødvendige specificitet, men kræver videreudvikling for at opnå detektionsgrænser, hvor f.eks. fødevarer eller væsker, der er under mistanke for at være tilsat botulinumtoksin, med sikkerhed kan erklæres for ufarlige.

### Sygehistorie

En 60-årig grønlandsk kvinde, der tidligere havde været indlagt for botulisme, havde nu atter symptomer derpå efter indtagelse af hengemt (fermenteret) sælkød. En del af det tiloversblevne sælkød blev sendt til SSI, hvor der blev dyrket *Clostridium botulinum*. Polymerasekædereaktion udført på det tilsendte kød og på den isolerede bakterie viste begge tilstedeværelse af genet for botulinumtoksin, type E (Figur 1A). Biologiske undersøgelser (injektion i mus med og uden tilsætning af neutraliserende antistoffer, udført på Danmarks Fødevarerforsknings og protein- og immunkemiske analyser (Figur 1B) viste høje koncentrationer af botulinumtoksin, type E i ekstrakt fra kødet. I *bio-assayet* døde begge mus af 1:20.000 fortyndet ekstrakt, og anti-E-antiserum neutraliserede specifikt effekten.

### Ricinmistænkelig bioterrorprøve

Bioterrormistænkelige prøver med ukendt indhold og uden erkendte relaterede kliniske tilfælde analyseres efter en fast strategi for bedst muligt at udelukke tilstedeværelse af patogener mikroorganismer i prøvematerialet, før toksinundersøgelserne udføres. De immunkemiske ricintoxin-*assays*, der er udviklet på SSI, har en detektionsgrænse på ca. 50 ng/ml. *Assayet* er under videreoptimering, men blev bl.a. i sin nuværende form anvendt på indholdet af et pulverbrev, der blev fremsendt med en trusselsnote til den amerikanske ambassade i København. Disse undersøgelser var inkonklusive (ikke vist). Pulveret blev derfor videreanalyseret ved hjælp af detergent (SDS)-polyakrylamid gelelektroforese. Ved denne undersø-

gelse blev der fundet et distinkt bånd, dvs. en proteinkomponent med en molekylvægt på ca. 64.000 (Figur 2). Da intakt ricin har en tilsvarende molekylvægt, var det nødvendigt at forsøge identifikation af indholdsstoffet i pulveret med massespektrometriske metoder. Båndet blev skåret ud af gelen, og proteinet blev nedbrudt til fragmenter ved trypsinbehandling, der spalter efter specifikke aminosyrerester i polypeptidkæder. Efterfølgende måling af fragmenterne blev ved hjælp af massespektrometri udført med en nøjagtighed, der muliggør identifikation af ukendte proteiner ud fra deres massefingeraftryk (Figur 2). Disse analyser viste entydigt, at det udskårne bånd ikke indeholdt ricin, men derimod bovint serumalbumin (BSA). BSA har en molekylvægt på ca. 64.000 og imiterer således ricin ved størrelsesafhængig gelelektroforese, men er i modsætning til ricin et ufarligt og hyppigt anvendt stof i biokemiske laboratorier.

### Diskussion

Baseret på faktiske hændelser [3], stoffernes tilgængelighed og deres akutte toksicitet er ricin- og botulinumtoksinerne blandt de mest aktuelle toksintrusler i bioterrorssammenhæng. Både mht. klinik, behandling og diagnostiske muligheder adskiller de to grupper af toksiner sig meget. Botulisme har i klassiske tilfælde en ret karakteristisk klinik, kan forsøges behandlet med antitoxin og diagnosticeres bl.a. ved hjælp af et *bio-assay*, der er baseret på anvendelse af forsøgsdyr og typespecifikke antisera. Hurtigdiagnostik kan nu foretages med immunkemiske og massespektrometriske metoder.

Ricinforgiftning har derimod en ukarakteristisk klinik. Der er ingen specifik behandling og intet *bio-assay*, men med udviklingen af ricinspecifikke immunreagenser er der udviklet immun-*assays*. Ricinpåvisning i miljøprøver er særlig relevant, fordi ricin ikke umiddelbart kan påvises i kliniske prøver.

De massespektrometriske metoders store fordel er, at de er uafhængige af antagelser om arten af en ukendt prøve og uafhængige af tilstedeværelsen af specifikke epitoper, som kan være nødvendige for et givet antistofs binding, og som kan være fjernet f.eks. i gensplejsede toksiner.

Korrespondance: Niels Henrik H. Heegaard, Autoimmunafdelingen, Statens Serum Institut, DK-2300 København S. E-mail: nhe@ssi.dk

Antaget: 18. februar 2005

Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelser: Tak til Kristian Møller og Anna S. Schmidt, Danmarks Fødevarerforsknings for uvurderlig hjælp til validering af botulinumantistoffer.

Artiklen bygger på en større gennemgang. En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatterne.

### Litteratur

1. Schechter R, Arnon SS. Extreme potency of botulinum toxin. *Lancet* 2000;355:237-8.
2. Miller DJ, Ravikumara K, Shen H et al. Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and shiga toxin inhibition. *J Med Chem* 2002;45:90-8.
3. Hawley RJ, Eitzen EM Jr. Biological weapons – a primer for microbiologists. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:235-53.
4. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1998.
5. Olsnes S, Kozlov JV. Ricin – *Toxicon* 2001;39:1723-8.