

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

Toxinas biológicas como potenciais armas biológicas – características e métodos de diagnóstico

Biological toxins as potential biological weapons – characteristics and diagnostic methods

/ I. Lopes de Carvalho¹ / R. Cordeiro¹
/ W. Antunes² / A. Pelerito¹ / M.S. Núncio¹

¹Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Doenças Infecciosas.

²Ministério da Defesa Nacional, Laboratório de Defesa Biológica e Química.

Patrocínios:

O presente estudo não foi patrocinado por qualquer entidade

Correspondência:

Isabel Lopes de Carvalho
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal
Tel.: +351 217 519 207
Fax: +351 217 526 400
Email: isabel.carvalho@insa.min-saude.pt

Artigo recebido em
08/05/2018

Artigo aceite para publicação em
25/05/2018

/ Resumo

As toxinas biológicas são relevantes nos setores da saúde, alimentação e segurança por causarem intoxicações em todo o mundo, algumas delas provocando doenças graves e recorrentes. A facilidade relativa na obtenção e preparação das toxinas torna-as potenciais agentes de bioterrorismo, sendo necessário um conhecimento detalhado das suas propriedades, por forma a mitigar as suas consequências em caso de uso deliberado.

Esta revisão centra-se nas quatro toxinas biológicas mais prováveis de serem utilizáveis em ações de uso intencional: neurotoxina botulínica, enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*, ricina e saxitoxina. Aqui são discutidos em detalhe o diagnóstico laboratorial, bem como a origem, patogénese, manifestações clínicas associadas e sua utilização como arma biológica.

Palavras-chave: Toxinas biológicas, diagnóstico, bioterrorismo

/ Abstract

Biological toxins are relevant in the health, food and safety sectors because they cause natural intoxications around the world, and some of them cause serious and recurring illnesses. The relative ease in obtained and preparing toxins make them potential agents of bioterrorism.

This review focuses essentially on four biological toxins: botulinum neurotoxin, staphylococcal enterotoxin B, ricin and saxitoxin. It discusses in detail the laboratory diagnosis as well as the origin, pathogenesis, associated clinical signs and symptoms and use as biological weapon.

Key-words: Biological toxins, diagnostic, bioterrorism

/ Introdução

O número de incidentes envolvendo agentes biológicos tem aumentado nas últimas décadas, indicando um crescente interesse nesta tipologia de agentes, capazes de serem utilizados em ações de bioterrorismo¹. Entre os diferentes microrganismos e toxinas que podem ser utilizados para fins ilícitos, destacam-se as toxinas de origem biológica.

As toxinas são compostos orgânicos que se comportam como agentes químicos, com origem biológica, detendo a capacidade de provocar doença no Homem. Esta propriedade pode ser explorada para fins destrutivos, nomeadamente como armas biológicas. A variedade de toxinas existentes na natureza é vasta; no entanto, as mais prováveis de serem utilizadas em ações de terrorismo ou de guerra biológica, devido ao seu potencial tóxico, disponibilidade e facilidade de preparação, ou uso anterior são: 1) neurotoxina botulínica (BoNT); 2) enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*; 3) ricina; e 4) saxitoxina.

O tratamento dos processos de intoxicação requer o conhecimento, por parte da comunidade médica, dos sinais e sintomas associados ao agente e respetiva via de exposição, para além do diagnóstico laboratorial.

A deteção laboratorial de toxinas é um desafio devido à sua natureza proteica, pois em alguns casos não permite a aplicação de técnicas com elevada sensibilidade, nomeadamente o PCR quantitativo, na rápida identificação do agente causal.

Uma resposta eficaz num potencial ataque de bioterrorismo necessita de ser célere e só possui valor clínico se o caso suspeito for rapidamente confirmado pelo laboratório e a fonte de intoxicação for prontamente eliminada, após investigação epidemiológica.

A Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação (UREB) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é o laboratório de referência para resposta a eventos biológicos. A UREB tem disponível métodos de diagnóstico rápido para microrganismos passíveis de serem utilizados como agentes de bioterrorismo. As metodologias instaladas recorrem ao uso de técnicas diversas, nomeadamente: microbiologia, imunologia e biologia molecular (Quadro I).

/ 1. Neurotoxina botulínica (BoNT)

Origem da toxina

A BoNT é uma potente neurotoxina produzida por *Clostridium botulinum*, uma bactéria gram-positiva, responsável pelo botulismo humano. As neurotoxinas que são conhecidas distribuem-se por sete serotipos bacterianos (designados por A, B, C, D, E, F e G), sendo os serotipos A, B e E os responsáveis por provocar a maioria dos casos de botulismo. O serotipo F pode originar doença no Homem, no entanto os casos reportados são raros².

Patogénese

A principal via de entrada, responsável pela ocorrência da maioria das intoxicações por BoNT, é a via oral. Os principais casos estão associados à ingestão de alimentos adulterados, contaminados com a toxina pré-formada (botulismos de origem alimentar), resultante de uma preservação inadequada dos alimentos. A ingestão de esporos de *C. botulinum* está associada à doença em determinados grupos de risco, nomeadamente em lactantes (botulismo infantil) devido à imaturidade do trato gastrointestinal dos neonatos; ou em indivíduos com doença gastrointestinal (botulismo por colonização em adultos), associado a processos de disbiose recorrentes. O botulismo pode ainda ocorrer por via cutânea, associado à contaminação de feridas necróticas, onde ocorra um excessivo crescimento bacteriano. A via respiratória é uma via possível para o desenvolvimento de botulismo, no entanto requer a administração da toxina BoNT através de aerossóis, situação impossível de ocorrer de forma natural, estando sempre associada a ações deliberadas (ataques de terrorismo).

Em qualquer caso, a doença desenvolve-se entre 12h e 36h a partir do momento em que a toxina entra no organismo, independentemente da via de exposição³. A neurotoxina atua bloqueando irreversivelmente a libertação de acetilcolina, impedindo a comunicação ao nível neuronal e levando a um quadro típico de paralisia flácida.

Manifestações clínicas

Todas as formas de botulismo levam a uma síndrome clínica de neuropatia craniana simétrica, incluindo diplopia, ptose, disfagia, xerostomia, disfonia ou disfasia, em conjunto com paralisia descendente simétrica, não havendo na maioria dos casos febre. Ocasionalmente, sintomas gastrointestinais podem preceder a apresentação neurológica, como dor abdominal, náuseas, vômitos ou diarreia. A paralisia pode progredir e incluir os músculos respiratórios, originando insuficiência respiratória^{3,4}.

Diagnóstico

O diagnóstico clínico do botulismo é baseado na história clínica e no exame ao estado geral do paciente. No botulismo natural, a bactéria pode ser isolada de fezes, sangue ou amostras de alimentos. Num cenário de bioterrorismo, quando os indivíduos são expostos a uma toxina aerossolizada, os testes microbiológicos tradicionais não são úteis. A eletromiografia é uma técnica complementar de diagnóstico clínico, capaz de revelar um padrão típico para o botulismo. As análises hematológicas de rotina e imagens cerebrais são geralmente normais, mas podem servir para descartar outros diagnósticos³.

No diagnóstico laboratorial, a técnica *gold standard* é o bioensaio⁵, através de injeções intraperitoniais em ratinhos, e seguindo os seus efeitos ao longo do tempo. No entanto, vários estudos estão a ser realizados com o objetivo de o substituir por um método *in vitro*. No botulismo natural e onde ocorre infeção

QUADRO I - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DISPONÍVEL NO INSA

| DOENÇA | AGENTE ETIOLÓGICO | DETEÇÃO DO AGENTE OU TOXINA/OU ÁCIDOS NUCLEICOS |
|--|---|---|
| Botulismo | Toxinas de <i>Clostridium botulinum</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Grupo I: A, B, F • Grupo II: B, E, F • Grupo III: C, D • Grupo IV: G | Amostras: <ul style="list-style-type: none"> - Soro, fezes, fluido gástrico, alimentos, amostras ambientais, tecidos, zaragatoas e pus. Métodos: <ul style="list-style-type: none"> - PCR tempo-real - Sequenciação - ELISA - Testes rápidos de fluxo lateral - Bioensaio |
| - | Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i> (SEB) | Amostras: <ul style="list-style-type: none"> - Fezes, fluido gástrico e alimentos. Métodos: <ul style="list-style-type: none"> - EFLA (Ensaio imunológico com revelação fluorescente) - VIDAS 2 - ELISA |
| - | Ricina (<i>Ricinus communis</i>) | Amostras: <ul style="list-style-type: none"> - Soro, fezes, fluido gástrico, alimentos, amostras ambientais, tecidos. Métodos: <ul style="list-style-type: none"> - ELISA |
| Intoxicação Paralisante por moluscos (PSP) | Saxitoxina | Amostras: <ul style="list-style-type: none"> - Soro, fezes, fluido gástrico, alimentos, amostras ambientais. Métodos: <ul style="list-style-type: none"> - ELISA |

do paciente, a bactéria pode ser isolada de fezes, sangue ou amostras de alimentos⁶. No entanto, estes métodos são usados sobretudo para confirmar diagnósticos em intoxicações hospitalares, sendo bastante morosos. O início do tratamento nunca deve ser atrasado pela confirmação do diagnóstico laboratorial⁷. O diagnóstico diferencial nos adultos inclui síndrome Guillain-Barré e acidente cerebrovascular.

Em cenários de bioterrorismo, existe urgência em detetar a natureza do agente etiológico, a estirpe ou o subtipo de toxina. O PCR é o método mais rápido, específico e sensível, dentro da relação custo-benefício, para a identificação rápida de agentes de bioterrorismo ao nível laboratorial. Contudo, tem sérias limitações na identificação de agentes com natureza proteica, nomeadamente toxinas pré-formadas. Neste caso são preferíveis outras metodologias, nomeadamente a identificação baseada em anticorpos, capaz de dar respostas rápidas (até 15 minutos), mas com limitações ao nível da sensibilidade e da especificidade. Um método alternativo, mais específico e sensível que os métodos imunológicos, é a espectrometria de massa; no entanto os equipamentos são muito onerosos e requerem pessoal técnico com elevada diferenciação. Todavia, é um método promissor que

aborda as limitações do bioensaio⁸. Os estudos metagenómicos podem ser interessantes nos casos onde seja possível proceder ao isolamento de DNA do agente biológico, visto apresentarem maior sensibilidade e resolução. Contudo os seus custos tornam-nos inibitórios como primeira linha de resposta, sendo reservados para fases mais avançadas da resposta⁹.

Utilização como arma biológica

A BoNT foi inicialmente utilizada como agente de guerra biológica pelos japoneses, durante a Segunda Guerra Mundial. Posteriormente, foi produzida por outros países, incluindo EUA, antiga URSS e Iraque. A capacidade de produção de BoNT à escala industrial torna esta toxina num agente com elevado risco, para uso futuro com fins maliciosos.

A toxicidade destas toxinas é muito elevada e estima-se que a DL₅₀ (Dose Letal capaz de matar 50% da população exposta) é de aproximadamente 1 ng/kg. No entanto, alguns estudos indicam que a sua toxicidade é ligeiramente reduzida (DL₅₀ de 3 ng/kg), quando a sua exposição é realizada pela via respiratória¹⁰.

/ 2. Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB)

Origem da toxina

A enterotoxina B (SEB) é produzida pela bactéria *Staphylococcus aureus*¹¹, uma bactéria gram-positiva anaeróbia facultativa, não esporulada. O *S. aureus* existe na pele e nas mucosas dos seres humanos e animais, podendo ser encontrado na flora do trato respiratório de 25%-50% da população, em estado fisiológico¹². Este microrganismo produz uma série de fatores de virulência, onde se destacam as enterotoxinas, caracterizando-se por exercer a sua ação maioritária sobre o sistema imunitário, atuando como superantígenos.

O *S. aureus* produz cinco serotipos distintos de toxinas, designadas por A, B, C, D e E, que pertencem a uma família de proteínas termoestáveis com pesos moleculares compreendidos entre 23 e 29 kDa¹³. Desta gama de toxinas a mais importante, devido às suas propriedades tóxicas, é a SEB que se caracteriza por ser a mais potente das proteínas termoestáveis e a única classificada como agente de bioterrorismo ou de guerra biológica.

Patogénese

A intoxicação por SEB ocorre principalmente pela via oral, através do consumo de alimentos ou águas contaminadas, sendo considerada uma ameaça biológica devido ao potencial uso como agente de terrorismo alimentar. As portas de entrada alternativas são: a via respiratória, a via vaginal e a via da mucosa ocular (causando conjuntivite). A exposição inalatória à enterotoxina B é extremamente rara e qualquer evento deve levantar imediatamente suspeitas de intenção maliciosa¹⁴. No entanto, como arma biológica é considerada um agente incapacitante, mais do que propriamente um agente letal⁷.

Manifestações clínicas

A maioria das enterotoxinas de *S. aureus* está associada a fenómenos de intoxicação alimentares, que se caracterizam por quadros de vômitos e diarreias nas formas mais benignas. Esta sintomatologia ocorre geralmente entre 1h e 8h após a exposição, resultando em quadros incapacitantes, maioritariamente sem febre. A exposição a doses elevadas de enterotoxina B geralmente tem um desfecho fatal, podendo culminar em situações de choque tóxico, associado a um quadro respiratório¹⁵.

Os sintomas da intoxicação por SEB dependem da via de exposição. A toxina é mais perigosa quando inalada, causando febre, dispneia e dor torácica. Os sintomas geralmente desaparecem após 24h a 48h^{12,16,17}. A febre pode durar 2-5 dias e a tosse até 4 semanas. A inalação de doses altas pode levar a síndrome de dificuldade respiratória aguda (ARDS), choque e falência de vários órgãos^{12,16,17}. No geral, os efeitos respiratórios não ocorrem antes de 48h após a exposição¹⁸. Não existe tratamento específico para SEB, sendo o tratamento apenas sintomático e de suporte.

Diagnóstico

A SEB pode ser detetada, por métodos imunológicos, em amostras de sangue, urina ou expetoração até 12h a 24h de exposição¹⁹. Após este período é indetetável nos fluidos corporais^{11,12}. Nos produtos alimentares sólidos ou líquidos, a SEB é detetável mesmo em pequenas concentrações. Ocasionalmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é útil para detetar o DNA bacteriano residual em amostras de água e alimentos ou amostras clínicas.

As enterotoxinas são bastante resistentes ao calor e estáveis, têm uma ampla gama de pH e são resistentes à pepsina, tripsina, renina e papaína⁷.

/ 3. Ricina

Origem da toxina

A toxina ricina é uma glicoproteína isolada das sementes do *Ricinus communis*, uma planta nativa de África, mas introduzida e cultivada em regiões tropicais e subtropicais. É cultivada em muitas zonas temperadas como planta ornamental ou para fins medicinais, encontrando-se amplamente disseminada em diferentes regiões do globo, incluindo Portugal, sendo de fácil acesso⁴.

Patogénese

A ricina é extraída em fase aquosa e o produto final da extração pode acondicionar-se na forma líquida ou sólida. A via natural de exposição é a oral, geralmente através de alimentos, água ou fórmulas magistrais de catárticos naturais²⁰. As restantes vias de exposição (respiratória, transcutânea) geralmente são intencionais, não ocorrendo transmissão de pessoa a pessoa²¹. A toxina ricina é muito tóxica, especialmente quando inalada; no entanto, é considerada menos tóxica comparativamente com as anteriormente descritas²².

O mecanismo de ação da toxina ricina caracteriza-se pelo bloqueio da síntese proteica nas células do organismo, inativando irreversivelmente a subunidade ribossomal 28S das células eucariotas.

Manifestações clínicas

A apresentação clínica de uma intoxicação por ricina depende da dosagem e da via de exposição. Os sintomas da exposição inalatória aparecem após 4h a 8h e são inespecíficos, incluindo febre, tosse, dispneia, náuseas, diaforese e artralgia⁴.

Estudos em animais expostos à inalação de ricina apresentaram mudanças fisiopatológicas como necrose e edema pulmonar, levando à morte por ARDS e insuficiência respiratória em 36h-72h²³. Os sintomas respiratórios não ocorrem quando a intoxicação acontece por outras vias de exposição, embora o edema pulmonar possa desenvolver-se devido a síndrome de extravasamento capilar sistémico.

A exposição à ricina através do contacto direto da pele ou mucosas não é típica e pode levar à ocorrência de eritema e dor^{20,21,22}.

A injeção intramuscular de ricina leva a necrose muscular local e linfadenopatia regional com envolvimento mínimo de órgãos internos. Após a ingestão de ricina, as manifestações clínicas incluem: náuseas e vômitos, diarreia, hipotensão, hematuria e insuficiência renal. Outros testes revelam necrose das células epiteliais intestinais, hemorragia e necrose do fígado, baço e rins. Alguns doentes apresentam alucinações, convulsões e falhas de múltiplos órgãos levando à morte. Os achados nas análises clínicas ao sangue e à urina não são específicos: níveis elevados de transaminases, lactato desidrogenase e bilirrubina; leucocitose, acidose metabólica, hipoglicemia ou hiperglicemia; aumento da creatina quinase e proteinúria; e pode haver também alterações no eletrocardiograma⁴.

Diagnóstico

A suspeita clínica de exposição inalatória à ricina é baseada no aparecimento de uma síndrome respiratória grave em grupos de indivíduos saudáveis, com antecedentes epidemiológicos comuns. O diagnóstico é feito por imunoenaios de amostras clínicas retiradas da mucosa nasal, pele ou sangue, ou amostras ambientais retiradas no local suspeito da dispersão.

O diagnóstico diferencial para ingestão de ricina inclui microrganismos entéricos, fungos tóxicos (pe. *Amanita phalloides*), cáusticos (ácidos e bases), ferro metálico e arsénio²⁴.

Os níveis de ricina podem ser avaliados na urina num período de dois dias após a exposição⁴. Ocasionalmente, o DNA da planta de *R. communis* pode ser detetado em produtos que contenham ricina²².

Utilização como agente de bioterrorismo

A ricina foi investigada como agente de guerra biológica na década de 1940 nos EUA e foi utilizada no assassinato do jornalista búlgaro Georgi Markov em 1978. A ricina pode também ter sido utilizada na guerra Irão-Iraque na década de 1980. Recentemente, foram enviados envelopes contendo pó de ricina por organizações terroristas a funcionários do governo na Grã-Bretanha e nos EUA²⁵.

/ 4. Saxitoxina (STX)

Origem da toxina

A saxitoxina (STX) é uma neurotoxina conhecida pelo seu papel na intoxicação paralisante aguda, impedindo a geração de potenciais de ação em células neuronais¹⁵. A exposição natural à doença é feita através da ingestão de moluscos bivalves contaminados com algas, sendo por isso estas toxinas encontradas em ambientes marinhos e de água doce. A saxitoxina é também conhecida por intoxicação paralisante por moluscos (*paralytical shellfish poisoning*-PSP).

Patogénese

A saxitoxina inibe os canais de sódio nos neurónios, bloqueando a passagem dos impulsos nervosos. Sinais e sintomas de envenenamento incluem parestesias, uma "sensação flutuante", fraqueza muscular e disfunção do nervo craniano. A morte pode ocorrer por asfixia, através da paralisia do músculo do diafragma^{15,26}.

Até hoje, não foram registradas intoxicações agudas no Homem através de água doce, mas já houve registo de mortes em animais²⁷. No entanto, cerca de 2000 casos de PSP são relatados anualmente em todo o mundo com uma taxa de mortalidade de 15%²⁸.

Manifestações clínicas

Após a exposição a STX, os potenciais de ação nas fibras nervosas e musculares são interrompidos.

Os sintomas podem ser tanto gastrointestinais como neurológicos, incluindo parestesia, náuseas, vômitos, diarreia, fraqueza, ataxia, falta de ar, disartria, disfagia, hipotensão; dependendo da quantidade de toxina consumida, pode resultar em paralisia total e morte por paragem respiratória^{29,30}. O resultado da exposição às PSP é variável entre os indivíduos, sendo as crianças mais suscetíveis, com uma maior taxa de mortalidade associada²⁹.

As primeiras 24h são cruciais para a taxa de sobrevivência e para uma recuperação completa sem sequelas³¹. O tratamento é sintomático baseando-se na respiração assistida e na correção de fluido e eletrólitos³². A utilização de carvão ativado também já foi utilizado como tratamento de intoxicações por PSP^{31,33}.

Diagnóstico

Atualmente, estão definidos quatro métodos como metodologias-padrão de análise de toxinas PSP. O primeiro método aprovado para a deteção de toxinas PSP foi o bioensaio que deteta a toxicidade de amostras após injeção intraperitoneal (i.p.) em ratinhos³⁴. Preocupações éticas e questões técnicas promoveram o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e seletivos. Dois métodos são baseados em cromatografia líquida de alta performance com deteção por fluorescência (HPLC-FLD) das PSP e derivados. Ambos os métodos de cromatografia são bastante complexos e demorados, e a quantificação de toxinas PSP baseia-se nos cálculos em equivalentes de toxicidade.

Vários métodos de imunensaio, biossensores e pesquisa molecular de genes da STX também foram utilizados para análise de toxinas PSP³⁵. Estas ferramentas são adequadas para monitorização e análises *in situ*, mas são insuficientes para identificação e verificação inequívoca de STX devido às reações cruzadas com outras toxinas PSP. Recentemente, foram desenvolvidos esforços no desenvolvimento de métodos de espectrometria de massa em cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC LC-MS / MS) para toxinas PSP³⁶.

Utilização como agente de bioterrorismo

Apesar de a STX ser mais estável do que a BoNT quando disseminada no ar, é difícil de produzir em grandes quantidades. No entanto, a sua elevada toxicidade contribuiu para que continue a fazer parte da lista de toxinas potencialmente utilizadas em bioterrorismo.

/ Conclusões

Os principais quadros de intoxicação por toxinas biológicas, nomeadamente: BoNT, SEB, ricina e saxitoxina estão associados a casos de exposição com origem natural ou acidental, mais especificamente à ingestão de alimentos contaminados ou a contaminações ocupacionais (ex.: técnicos de laboratório). O presente trabalho teve como objetivos apresentar os principais cenários de exposição às diferentes toxinas, explorando em cada uma delas a hipótese do seu uso intencional como agente de bioterrorismo ou de biocrime³⁷.

Esta revisão destaca características importantes das toxinas biológicas (BoNT, SEB, ricina e saxitoxina) num contexto de bioterrorismo, diferenciadas de agentes patogénicos vivos e de agentes de guerra química. Essas diferenças exigem diferentes meios de preparação, diagnóstico, tratamento, contenção e prevenção. A deteção de um grupo de indivíduos inicialmente saudáveis com sintomas respiratórios graves na ausência de um agente causal conhecido e no contexto epidemiológico apropriado deve suscitar suspeitas clínicas de exposição a uma toxina.

O diagnóstico precoce pode minimizar o impacto em saúde pública, garantindo a aplicação atempada do tratamento. Os clínicos precisam de estar familiarizados com as características das toxinas e respetivas manifestações clínicas, a fim de administrar os tratamentos mais indicados para cada situação específica.

/ Bibliografia

1. Martin JW, Christopher GW, Edward M, Eitzen J. History of Biological Weapons: from poisoned darts to intentional epidemics. In: Medical aspects of Biological Warfare. Lenhart MK, Lounsbury DE, Martin JW, editors, Washington DC: Office of the Surgeon General US Army Medical Department Center and School Borden Institute. 2007. p. 1-21.
2. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulinum toxin. In: Medical aspects of Biological Warfare. Lenhart MK, Lounsbury DE, Martin JW, editors, Washington DC: Office of the Surgeon General US Army Medical Department Center and School Borden Institute, 2007. p. 337-354.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism: information for Health Professionals. <https://www.cdc.gov/botulism/health-professional.html>.
4. Berger T, Eisenkraft A, Bar-Haim E, Kassirer M, Aran AA, Fogel I. Toxins as biological weapons for terror-characteristics, challenges and medical countermeasures: a mini-review. *Disaster Mil Med.* 2016; 29:2-7.
5. Dorner MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG. Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 364:219-55.
6. Strohl WA, Rouse H, Fisher MD. Lippincott's illustrated microbiology. 2001. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins.
7. Anderson PD. Emergency management of chemical weapons injuries. *J Pharm Pract.* 2012; 25:61-8.
8. Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1578-1583.
9. Eikmeyer FG, Rademacher A, Hanreich A, Hennig M, Jaenicke S, Maus I, et al. Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas producing microbial communities residing in biogas reactors does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms. *Biotechnol Biofuels.* 2013; 4:6-49.
10. Middlebrook JL, Franz DR. Botulinum toxins. In: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, editors, Washington DC: Office of the Surgeon General Department of the Army, United States of America, 1997; p. 643-654.
11. Rusnak JM, Kortepeter M, Ulrich R, Poli M, Boudreau E. Laboratory exposures to staphylococcal enterotoxin B. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1544-1549.
12. Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev.* 2008; 225:226-43.
13. Luther E, Lindler FJ, Lebeda GK. In: Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism. Humana Press, 2005.
14. Rajagopalan G, Sen MM, Singh M, Murali NS, Nath KA, Iijima K, et al. Intranasal exposure to staphylococcal enterotoxin B elicits an acute systemic inflammatory response. *Shock* 2006; 25:647-656.
15. Anderson PD. Bioterrorism: toxins as weapons. *J Pharm Pract.* 2012; 25:121-129.
16. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. *Toxins.* 2010; 2:2177-97.
17. Ohlsen K, Lorenz U. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300:402-410.
18. Rusnak JM, Kortepeter M, Ulrich R, Poli M, Boudreau E. Laboratory exposures to staphylococcal enterotoxin B. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1544-1549.
19. Cook E, Wang X, Robiou N, Fries BC. Measurement of staphylococcal enterotoxin B in serum and culture supernatant with a capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:1094-1101.
20. Bradberry S, Dickers KJ, Rice P, Griffiths GD, Vale JA. Ricin poisoning. *Toxicol Rev.* 2003; 22:65-70.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Facts about ricin. <https://emergency.cdc.gov/agent/ricin/facts.asp>.
22. Poli MA, Roy C, Huebner KD, Franz DA, Jaax NK. Ricin. In Medical aspects of Biological Warfare. Lenhart Martha K, Lounsbury Dave E. and Martin James W. Washington, DC: Office of The Surgeon General US Army Medical Department Center and School Borden Institute, 2007.
23. Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, Iandolo JJ, Jackson R, Slater LN, et al. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *Am J Med Sci.* 2002; 323:326-340.
24. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning a comprehensive review. *JAMA.* 2005; 294:2342-2351.

25. Doner BG, Rummel A. Preface Biological toxins – Ancient molecules posing a current threat toxins. 2015; 7:5320-5321.
26. Centers for Disease Control and Prevention. <https://emergency.cdc.gov/agent/saxitoxin/casedef.asp>.
27. Negri AP, Jones GJ, Hindmarsh M. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon*. 1995; 33:1321-9.
28. Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*. 1993; 32:79-99.
29. Carvalho M, Jacinto J, Ramos N, Oliveira V, Melo TP, Sá J. Paralytic shellfish poisoning: clinical and electrophysiological observations. *J Neurol*. 1998; 245:551-554.
30. Etheridge SM. Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon*. 2010; 56:108-22.
31. Dorner BG, Zeleny R, Harju K, Hennekinne J-K, Vanninen P, Schimmel H, et al. Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology. *Trends Analyt Chem*. 2016; 85:89-102.
32. Llewellyn LE. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat Prod Rep*. 2006; 23:200-222.
33. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*. 2010; 8:1650-1680.
34. AOAC Official, Method 959.08, Paralytic Shellfish Poison, Biological Method, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 1959.
35. Humpage AR, Magalhaes VF, Froschio SM. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 397:1655-1671.
36. Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam MA. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J Chromatogr*. 2005; 1081:190-201.
37. Davidson RK, Antunes W, Madslien EH, Belenguer J, Gerevini M, Perez TT, et al. From food defence to food supply chain integrity. *Br Food J*. 2017;119:52-66.