



**Universidad  
Zaragoza**

## Trabajo Fin de Grado

Revisión actualizada sobre el diagnóstico de las  
enfermedades priónicas y el desarrollo  
de nuevas metodologías para  
su detección *ante mortem*

Updated review on the diagnosis of prion diseases and  
development of new methodologies for their *ante mortem*  
detection

Autora:  
**Arelysa Delgado Allegues**

Directora:  
**Marta Monzón Garcés**

---

Facultad de Medicina. Departamento de Anatomía e Histología  
Humanas

2017-2018

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. <i>ABSTRACT</i> .....	4
3. MATERIALY MÉTODOS.....	5
4. INTRODUCCIÓN	
4.1. Enfermedades priónicas.....	5
4.2. Historia y biología de la proteína prión.....	6
4.3. Epidemiología.....	8
4.4. Prionopatías humanas: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.....	9
4.4.1. Clasificación.....	9
4.4.2. Diagnóstico.....	10
5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	18
6. RESULTADOS DE LA REVISIÓN SOBRE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL DIAGNÓSTICO	
6.1. Técnica PMCA.....	18
6.1.1. Detección en muestras de orina.....	19
6.2. Técnica RT-QuIC.....	20
6.2.1. Detección en muestras de LCR.....	22
6.2.2. Detección en mucosa olfatoria.....	23
6.3. Técnica RT-QuIC 2ª generación.....	25
6.3.1. Detección en muestras de piel.....	26
6.4. Biomarcadores AMPc y GMPC.....	27
6.5. Técnica DDA.....	28
6.5.1. Detección en muestras de orina.....	28
6.5.2. Detección en muestras de sangre.....	29
7. CONCLUSIONES.....	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## 1. RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles o enfermedades priónicas son un grupo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación de una proteína con una conformación incorrecta denominada proteína prión, que pueden afectar tanto a los animales como a los seres humanos. Cursan a lo largo del tiempo con demencia rápidamente progresiva y tienen siempre un desenlace fatal. En la especie humana, existen varios tipos de enfermedad, siendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica la más frecuente. El diagnóstico de este grupo de enfermedades requiere en la actualidad una serie de pruebas complementarias como el electroencefalograma, la resonancia magnética, la punción lumbar y pruebas genéticas para ayudar en el diagnóstico diferencial de la demencia rápidamente progresiva. Sin embargo, la confirmación del diagnóstico sólo se logra a través de la valoración microscópica de tejido nervioso *post mortem*.

Por este motivo, el objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre los ensayos más relevantes que han sido publicados en el ámbito científico en los últimos años teniendo como finalidad lograr un diagnóstico *ante mortem* de las enfermedades priónicas.

La aplicación de técnicas recientemente desarrolladas como *PMCA (Protein misfolding cyclic amplification)* o *RT-QuIC (Real-time Quaking-induced Conversion)* sobre líquido cefalorraquídeo, mucosa olfatoria, orina o piel proporcionan una herramienta útil para la evaluación de ensayos terapéuticos planteados para este grupo de enfermedades aún no tratables, así como una base científica que pudiera llegar al establecimiento de un diagnóstico definitivo de la enfermedad *in vivo*. También se reduciría el riesgo de transmisión del agente causal.

**Palabras clave:** Enfermedades priónicas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, diagnóstico de Creutzfeldt-Jakob, diagnóstico Creutzfeldt-Jakob esporádica.

## 2. ABSTRACT

Transmissible Spongiform Encephalopathies or prion diseases are neurodegenerative diseases associated to misfolded proteins, which can affect animals and human beings alike. It will course with rapidly progressive dementia and will always have a fatal outcome. The most frequent form in human beings is sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. The diagnosis for this group of diseases currently requires a series of complementary tests such as the electroencephalogram, magnetic resonance imaging, lumbar puncture and genetic testing to help with the differential diagnosis for rapidly progressive dementia. Nevertheless, diagnostic confirmation is only achieved through microscopic evaluation of tissue *post mortem*.

For this reason, the objective of this paper is to develop a bibliographic review on the most relevant assays which have been recently published in the scientific world, looking to achieve an *ante mortem* diagnosis of prion diseases.

The application of recently developed techniques such as *PMCA* (*Protein misfolding cyclic amplification*) or *RT-QuIC* (*Real-time Quaking-induced Conversion*) on CSF, olfactory mucosa, urine or skin offers a useful tool for the evaluation of therapeutic assays proposed for this group of untreatable diseases, as well as a scientific base that could establish a definite diagnosis of the diseases *in vivo*. Risk of transmission from the causing agent would also be reduced.

**Keywords:** *Prion diseases, Creutzfeldt-Jakob disease, Creutzfeldt-Jakob diagnosis, sporadic Creutzfeldt-Jakob diagnosis.*

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica utilizando principalmente las bases de datos: *PubMed*, *Scielo*, *ScienceDirect* y Google Académico. Fueron incluidos los artículos y documentos publicados, relacionados con aquellos ensayos más relevantes dirigidos a la búsqueda de un diagnóstico *ante mortem* de las enfermedades priónicas en los últimos años. Las palabras clave utilizadas para esta búsqueda han sido: *Prion diseases*, *Transmissible spongiform encephalopathy*, *rapid progressive dementia*, *Creutzfeldt-Jakob disease*, *Creutzfeldt-Jakob diagnosis*, *sporadic Creutzfeldt-Jakob diagnosis*, *neuroinflammatory markers*.

Los criterios de inclusión de artículos fueron los siguientes: publicados desde 2012 a 2017, a texto completo, en inglés y español, pero principalmente en inglés por ser la lengua predominante en investigación biomédica.

Con respecto al tipo de documentos seleccionados, se eligieron artículos de revisión, meta-análisis y estudios experimentales publicados en revistas de ámbito científico.

En la base de datos se utilizaron las palabras claves mencionadas anteriormente con diferentes combinaciones. Además de referencias de interés extraídas a partir de la bibliografía obtenida a través de la búsqueda descrita, se añadieron también otras fuentes como páginas web oficiales (Euro CJD, Instituto Salud Carlos III...).

### 4. INTRODUCCIÓN

#### 4.1 ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) o enfermedades priónicas, son un grupo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación de una isoforma aberrante de la proteína PrP<sup>c</sup> denominada proteína prión patológica (PrP<sup>Sc</sup>; 1). La hipótesis más aceptada establece que estas partículas infecciosas de naturaleza proteica constituyen el agente causal de la enfermedad, dando lugar a los procesos neurodegenerativos característicos de la patología priónica cuando se acumulan en el sistema nervioso central (SNC; 2).

Afectan a seres humanos y animales durante un período de incubación prolongado (desde meses hasta años), con carácter transmisible y evolución clínica fatal. De incidencia muy baja, se caracterizan por la vacuolización de determinadas áreas del encéfalo de los individuos afectados causado por la replicación y acumulación de PrP<sup>Sc</sup>

que dan una apariencia espongiiforme característica cuando se observan al microscopio. Los principales hallazgos encontrados tras el examen anatomopatológico son vacuolización en el neuropilo (cambio espongiiforme) y/o pericarion neuronal, pérdida neuronal y activación de las células gliales. Entre sus manifestaciones clínicas destacan: demencia, ataxia, insomnio, parestesias y conductas anormales (1,3).

Los dos grandes problemas de este grupo de enfermedades que constituyen un desafío para la comunidad científica radican por un lado en la inexistencia actual de terapias que curen, mejoren o controlen estas afecciones; y por otro, a la falta de un método diagnóstico precoz, preciso y definitivo de la enfermedad para el que no se requiera tejido *post mortem* (1).

#### **4.2 HISTORIA Y BIOLOGÍA DEL PRIÓN**

Las primeras referencias de las enfermedades priónicas se recogen en el siglo XVIII por los ganaderos europeos, quienes describían una enfermedad neurodegenerativa que afectaba a ovejas y cabras, denominada “tembladera” (*Scrapie*). En 1920 y 1921 se reportaron los primeros casos de la enfermedad humana por los científicos Creutzfeldt y Jakob, motivo por el cual se le denominó así. La enfermedad cursaba con una demencia progresiva y se asociaba con alteraciones microscópicas de apariencia espongiiforme en la sustancia gris. Cabe destacar la investigación de Vincent Zigas en 1956 (1,4), sobre una enfermedad rara llamada kuru, que afectaba exclusivamente a un grupo indígena. Posteriormente, se asoció a un ritual canibalista (en el que ingerían tejido cerebral, donde se acumula el agente causal. De hecho, la enfermedad desapareció con el cese de los rituales.

En 1960, el equipo de Gajdusek demostró su transmisibilidad. Posteriormente, también se pudo confirmar de forma accidental el contagio vía iatrogénica mediante trasplante de diversos tejidos como la córnea o duramadre, o la administración de determinados productos biológicos, como hormonas hipofisarias (hormona del crecimiento) y gonadotropina. Estas fuentes primarias de transmisión iatrogénica se encuentran actualmente controladas al haber sido sustituidas por material equivalente de origen diferente. Más recientemente, también se ha evidenciado la transmisibilidad del agente causal a través de intervenciones neuroquirúrgicas con instrumental contaminado. Aunque la preocupación actual en relación con esta vía de transmisión

se centra en la sangre. En 1982 Stanley Prusiner determinó como agente patógeno de estas enfermedades la proteína prión (PrPsc), demostrando que se trataba de partículas puramente proteicas sin ácido nucleico, trabajo por el cual le fue otorgado el Premio Nobel de Medicina (1,4).

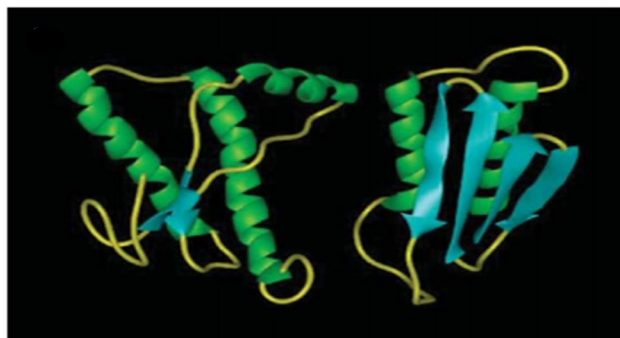
La última EET descubierta en animales fue la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en 1985, conocida popularmente como “enfermedad de las vacas locas”. No fue hasta 10 años más tarde, cuando se describió la denominada nueva variante, posteriormente variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en la especie humana, que se relacionó con el consumo de productos cárnicos de origen bovino infectados por EEB (5).

Esta proteína, PrPsc (*Proteinaceous infectious particles*), es una forma anormalmente plegada de una proteína celular, no patogénica (PrPc), expresada mayoritariamente en SNC. Ese cambio de conformación tridimensional la convierte en la isoforma anómala (PrPsc, proteína prión de Scrapie) que le permite propagarse induciendo el plegamiento anómalo de PrPc a PrPsc. Como consecuencia de su acumulación en el SNC, se produce muerte neuronal y consecuentemente, la neurodegeneración característica de la enfermedad (2,6).

La PrPc es codificada en el hombre por un gen situado en el brazo corto del cromosoma 20, el gen PRPN. Sus mutaciones originan las formas hereditarias de estas enfermedades (3). Aunque su disposición en la membrana ha sido asociada a procesos de transducción de señales celulares, plasticidad sináptica, control de la apoptosis, regulación de los ciclos circadianos, metabolismo del Cu<sup>2+</sup> y el estrés oxidativo, se desconoce todavía la funcionalidad completa que desarrolla la PrPc (7).

En condiciones fisiológicas, la PrPc se encuentra anclada a la membrana neuronal por un grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Presenta una estructura compacta de cuatro hélices- $\alpha$  (42% de hélices- $\alpha$  y un 3% de lámina- $\beta$ ; **Figura 1**), por lo que es sensible a proteasas. La isoforma patógena (PrPsc), a diferencia de la celular, presenta una gran proporción de lámina  $\beta$  (43% de lámina  $\beta$  y 30% de hélices  $\alpha$ ) que conlleva una serie de propiedades específicas a la proteína aberrante (1,8). Está presente de forma libre en la célula y tiene tendencia a agregarse extracelularmente, causando la degeneración neuronal. La estructura química que adquiere le confiere su carácter insoluble, su

resistencia a las proteasas, así como a métodos de desinfección normalmente eficaces que se utilizan en los laboratorios (7).



**Figura 1.** Comparación de la estructura tridimensional de la proteína PrPc (izquierda) y PrPsc (derecha). En la PrPc, se aprecian las tres hélices  $\alpha$  y una pequeñísima lámina  $\beta$  y a la derecha PrPsc, con alto porcentaje de lámina  $\beta$  representada en color azul (1).

#### 4.3 EPIDEMIOLOGÍA

Las enfermedades priónicas humanas son muy poco frecuentes, con incidencias de entre 1-2 casos por millón de habitantes y año en el mundo. El diagnóstico en algunos casos pasa inadvertido entre los pacientes ancianos que fallecen con demencia, ya que no es común pensar en ellas por su baja frecuencia. Cabe destacar la elevada tasa anual registrada en la comunidad del País Vasco, la cual se mantiene por encima de 2 casos por cada millón de habitantes desde el año 2001, la más alta de toda Europa (9). Aproximadamente el 85-90 % de los casos de ECJ ocurren esporádicamente. La ECJ de origen familiar representa alrededor del 10-15% del total de los casos, mientras que las enfermedades priónicas adquiridas, que incluyen la vECJ y la ECJ iatrogénica (ECJi), se observan en 2-5% del total de los casos (3).

La unidad europea de vigilancia internacional de las EET humanas en Edimburgo (CJD *International Surveillance Network*, EuroCJD) ha publicado en sus últimos datos (1993-2013), que los países con mayor tasa anual de mortalidad por millón de todas las formas de ECJ excluyendo la variante, son Israel, Eslovaquia, Francia y Suiza (alcanzando valores de 2.41, 2, 1.78 y 1.72, respectivamente; 10). En España, según los datos del Registro Nacional de EET humanas del Instituto de Salud Carlos III (15 de Septiembre de 2017), demuestran que la forma más común, al igual que el resto de países, es la ECJ esporádica (ECJe), con una incidencia anual de 1,1 casos por millón de habitantes/año. A excepción de la gran incidencia del Insomnio Familiar Fatal (IFF) en el País Vasco (11).



#### 4.4 PRIONOPATÍAS HUMANAS: ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT - JAKOB

Entre las enfermedades priónicas que afectan a la especie animal, las más relevantes son el Scrapie ovino y caprino (modelo utilizado como prototipo de la enfermedad), y la EEB (de especial relevancia por su carácter zoonótico). Las que afectan a la especie humana son clasificadas en función de su vía patogénica (**Tabla 1**), pudiendo ser genética, infecciosa o espontánea (12).

**Tabla 1.** Prionopatías en la especie humana (13)

PATOGENIA	PRIONOPATÍAS HUMANAS
Esporádica (por conversión espontánea de PrP <sup>c</sup> en PrP <sup>Sc</sup> o mutación somática)	- Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe) - Insomnio familiar fatal esporádico (IFFE)
Genética (hereditaria con una penetrancia de casi el 100%)	- Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (ECJf) - Insomnio familiar fatal (IFF) - Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)
Contagiosa	- Kuru - Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (ECJi) - Nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)

La ECJ (CJD, en inglés) es la más la más frecuente de las prionopatías humanas (su incidencia anual es de 1 caso por millón de habitantes), presente en el 85% de los casos. Su curso clínico, puede tener varias fases hasta evolucionar a una demencia grave con múltiples deficiencias neurológicas en personas de mediana edad y ancianos. En la mayoría de los pacientes el deterioro mental es lentamente progresivo con trastornos cognitivos, pérdida de la memoria y delirio. Se habla de una triada clínica que incluye demencia progresiva, mioclonias y EEG con complejos períodos trifásicos de 1 - 2Hz. Pueden apreciarse cambios en el comportamiento como la depresión y cambios de personalidad, que son a menudo los primeros signos de la enfermedad; disfunción cortical alta y alteraciones visuales, signos de alteración cerebelosa, manifestaciones piramidales, extrapiramidales y disfunción de la neurona motora inferior. En fases avanzadas de la enfermedad puede aparecer mutismo aquinético. La muerte sobreviene entre 1 mes a 10 años, con una media de 1 año después del debut clínico (1).

##### 4.4.1 Clasificación de ECJ

Según su causa y sus características clínico-patológicas, la ECJ puede dividirse en cuatro formas: esporádica (ECJe), iatrogénica (ECJi), familiar o hereditaria (ECJf) y la

variante (vECJ; 14). Siendo su forma esporádica o idiopática la más frecuente (1,3), donde el mecanismo de adquisición se desconoce. La ECJf se presenta con menor frecuencia y es producida por mutaciones en el gen PRNP. La forma iatrogénica de la enfermedad es muy infrecuente (menos del 1%). La más recientemente descrita es la vECJ, asociada al carácter zoonótico de la EEB, como ya se ha explicado con anterioridad (3).

#### 4.4.2 Diagnóstico de la ECJ

En la actualidad, a pesar de los grandes avances científicos, todavía no existe un método de diagnóstico no invasivo capaz de detectar la ECJ en pacientes vivos. Se requiere realizar un estudio anatomopatológico del tejido afectado, por lo que se requiere una muestra de tejido encefálico, debido a que es el único método que permite confirmar el diagnóstico de forma fiable. Por ello, la recogida de la muestra tisular suele realizarse en el momento de realización de la autopsia, siempre que la familia lo autorice. Existe la posibilidad de llevar a cabo una biopsia cerebral, pero realmente esta estrategia sólo cobra sentido en el caso de que sirva como diagnóstico diferencial para confirmar otra patología que sea curable puesto que conlleva importantes riesgos (15).

Por todas estas razones, ha sido motivo de interés la realización de una revisión bibliográfica en este trabajo sobre los métodos no invasivos dirigidos al diagnóstico *in vivo* en pacientes afectados de ECJ, esencialmente de la forma esporádica por ser la más frecuente.

La definición de enfermedad priónica viene definida mediante la aplicación de los criterios diagnósticos establecidos por el grupo de trabajo para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad en España de acuerdo con las recomendaciones del grupo europeo de Vigilancia de EET humanas. En base a estos criterios, se definen tres grados de certeza diagnóstica (caso posible, probable y confirmado; **Tabla 2**) en base a los siguientes criterios de clasificación elaborados a partir de información clínica (de sospecha), laboratorial (pruebas complementarias) y epidemiológica (15,16).

Así, la realización del diagnóstico se hace según criterios de probabilidad. En concreto, en el diagnóstico de la ECJ un caso se puede clasificar como:

**Tabla 2.** Grados de certeza diagnóstica de la ECJe elaborada en base a los criterios oficialmente establecidos a nivel nacional y europeo (15,16).

POSIBLE	PROBABLE	CONFIRMADO
<p>Cuando sólo se basa en la clínica.</p> <p>Han de presentar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Demencia rápidamente progresiva.</li> <li>- Duración de la enfermedad inferior a dos años.</li> </ul> <p>Más, al menos, dos de las cuatro características siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mioclonias.</li> <li>• Signos de afectación visual o cerebelosa.</li> <li>• Signos piramidales o extrapiramidales.</li> <li>• Mutismo acinético.</li> </ul>	<p>Si, además de la clínica anterior, resulta positiva una de las siguientes pruebas complementarias:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hallazgo de la proteína 14-3-3 en LCR.</li> <li>- Presencia de complejos pseudo periódicos de ondas bifásicas o trifásicas agudas en EEG.</li> <li>- Hiperseñal en los ganglios de la base caudado/putamen en la RM, sobre todo en las secuencias de FLAIR y difusión.</li> </ul>	<p>Mediante el estudio anatomopatológico e inmunohistoquímica del tejido cerebral</p>

Recientemente, los criterios diagnósticos para la clasificación de caso en las enfermedades priónicas fueron actualizados. En España, a partir de enero de 2017 fueron introducidos algunos cambios en consonancia con la decisión del Comité de Coordinación de EuroCJD que se detallan a continuación (11,16):

1. Para la clasificación como caso confirmado se exige el síndrome neurológico progresivo además de la confirmación neuropatológica o inmunohistoquímica o bioquímica.
2. Para la clasificación como caso probable ya no es necesaria la duración de la enfermedad menor de dos años cuando la proteína 14.3.3 en LCR es positiva.
3. En los criterios sobre hallazgos en la RM encefálica se incluye “hiperseñal en al menos dos regiones corticales”, bien en región temporal, parietal u occipital; para la clasificación como caso probable siguiendo vigente el de hiperseñal en caudado/putamen.
4. Introducción del test de diagnóstico rápido RT-QuIC para clasificación como caso probable, siempre que exista síndrome neurológico progresivo.

La realización de pruebas complementarias constituye un paso fundamental en la aproximación del diagnóstico de la ECJ. Pero sólo con carácter predictivo, puesto que el diagnóstico “confirmado”, tal y como figura en la Tabla 2, se obtendrá *post mortem*.

### **PRUEBAS DIAGNÓSTICAS COMPLEMENTARIAS**

Hasta el momento, las pruebas complementarias más importantes que ayudan durante el proceso diagnóstico de la enfermedad priónica son el análisis del líquido ceforraquídeo (LCR), el estudio genético, la resonancia magnética (RM) y el electroencefalograma (EEG). La combinación de dichos estudios ofrece un mayor rendimiento para la detección y posterior diagnóstico de la ECJ.

#### **Análisis del líquido ceforraquídeo**

En relación con la ECJ, el análisis del LCR mediante la técnica molecular de *Western Blot* (WB) permite determinar si existe un aumento de la proteína 14-3-3, marcador de daño neuronal, con una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 80 % (17). También si hay elevación de la proteína tau y la proteína S100b, indicadores ambos de muerte neuronal. Estas proteínas intervienen en el metabolismo de las células nerviosas, pero tras producirse la agresión neuronal asociada a la enfermedad priónica son liberadas al LCR, por lo que su sobre-expresión es indicativo de destrucción neuronal. El análisis de estos biomarcadores en LCR constituye un método novedoso de muy reciente introducción en los criterios diagnósticos y se piensa que su uso en combinación podría mejorar los resultados de los análisis individuales.

La ECJe es la forma de ECJ más fácilmente detectable mediante la prueba de detección de aumento de niveles de la proteína 14-3-3 en LCR, por lo que la OMS la aprobó como prueba diagnóstica para esta enfermedad junto a las imágenes por RM.

Por todo ello, el análisis del LCR es una prueba esencial e indispensable que debe realizarse ante la sospecha de ECJ porque permite diferenciarla de otras causas de demencia en pacientes adultos. La muestra se envía al laboratorio tras ser obtenida mediante una punción lumbar, aunque en su defecto, si bien es menos frecuente, la punción puede ser cisternal o ventricular (18).

Esta prueba no es un método definitivo para el diagnóstico de la ECJ, puesto que la proteína 14-3-3 se encuentra en las neuronas en estado fisiológico, por lo que su aumento también puede asociarse a otras afecciones neurológicas, generando falsos

positivos como la encefalitis herpética (18), la isquemia cerebral, los derrames cerebrales, los tumores y las enfermedades inflamatorias entre otras. Hay que añadir que la sensibilidad de la prueba varía (85-95 %) dependiendo del tipo de ECJ, siendo menor en las formas no esporádicas.

Recientemente, como ya se ha señalado con anterioridad, se ha introducido como criterio diagnóstico y de clasificación el test de conversión inducida de PrPsc en tiempo real (*RT QuIC*) en LCR, que permite el diagnóstico de las formas esporádicas de ECJ con alta sensibilidad (80 %) y especificidad (100 %). A pesar de ello, este ensayo todavía no está disponible en todos los laboratorios de referencia para el diagnóstico molecular de la EET humanas. De hecho, no lo está en España (11,15).

### Estudio genético

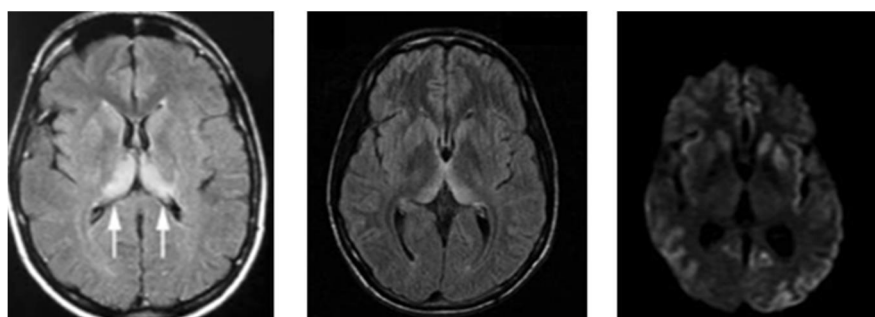
La secuenciación de la región codificante del gen PRNP detecta tanto las mutaciones patogénicas como los polimorfismos, lo que tiene una doble utilidad clínica y epidemiológica (14).

Un determinante genético de estas enfermedades lo constituye el polimorfismo en el codón 129 del gen PRNP, ya que su papel parece importante en la susceptibilidad para adquirir una enfermedad priónica. Así, mientras en la población general lo más frecuente es presentar genotipo en heterocigosis para el codón 129 (Metionina/Valina), los casos de ECJ, tanto esporádicos como iatrogénicos, presentan en su mayoría genotipos homocigotos (Metionina/Metionina o Valina/Valina). En el caso de vECJ, todos los casos descritos hasta el momento presentaron un genotipo Metionina/Metionina (9,15). Para la asignación del carácter familiar de la enfermedad se realiza la identificación de mutaciones germinales en el gen PRNP, presentando una herencia autosómica dominante. También se han descrito multitud de mutaciones que se traducen en cuadros clínicos diversos.

Resulta especialmente importante que se investigue la situación familiar para determinar si debe ser realizado un estudio genético, aunque el análisis del gen PRNP podría estar justificado en todos los casos, incluso en ausencia de antecedentes familiares, ya que se han descrito un porcentaje de EET de origen genético con historia familiar negativa (14).

## Resonancia magnética

En principio, las imágenes de Resonancia Magnética (RM) se utilizaban en el diagnóstico de la ECJ con el fin de excluir otras posibles enfermedades que también causaban demencia, así como los demás síntomas que se observan en el paciente. Actualmente, la RM ha demostrado tener una mayor utilidad, ya que con el tiempo se ha observado que los pacientes con ECJ presentan signos particulares en las distintas áreas y regiones del encéfalo que sugieren alguna de las formas de la enfermedad (19). Ante la sospecha de ECJ el protocolo recomendado en la RM es el uso de secuencias T2 y densidad protónica, secuencias FLAIR (*fluid-attenuated inversion recovery*), secuencias T1 y secuencias DWI (*diffusion-weighted Imaging*) (14). Resulta de especial ayuda en el diagnóstico de la vECJ debido a que es la enfermedad priónica con los cambios más consistentes en imágenes de RM. Se pueden observar dos signos particulares: el signo pulvinar, que ya se ha incluido como uno de los criterios de diagnóstico de vECJ aprobados por la OMS; y el signo de “palo de hockey”. El signo pulvinar está presente en más del 90 % de los casos y se define como una reacción de hiperintensidad bilateral y simétrica de la región posterior del tálamo (pulvinar), en comparación con la que presentan los otros núcleos de sustancia gris profunda y la sustancia gris cortical. Por otra parte, el signo de “palo de hockey” consiste en el que el signo del pulvinar se combina con aumento de señal en el núcleo dorsomedial del tálamo, que también constituye un signo clave para el diagnóstico de esta forma de la enfermedad. La sensibilidad y la especificidad del signo del pulvinar para el diagnóstico de vECJ son cercanas al 100%, principalmente cuando la determinación de estos hallazgos se realiza en secuencia FLAIR (20,21).



**Figura 2.** Imágenes de RM en vECJ secuencia FLAIR, 1) Hiperintensidad bilateral y simétrica de la región posterior del tálamo «signo del pulvinar» 2) demuestra hiperintensidad en los núcleos talámicos dorsomediales y pulvinar bilateralmente signo de «palo de hockey» 3) Imagen de RM en ECJ secuencia DWI, muestra una señal hiperintensa en las cabezas de ambos núcleos caudados y putamen (a la izquierda más que a la derecha) (19).

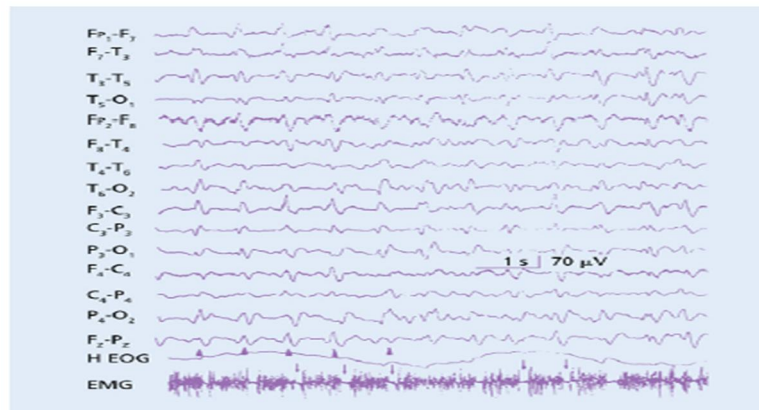
En los pacientes con ECJe también se realiza este estudio para descartar otras enfermedades. Los cambios que se observan predominantemente en la imagen sugiriendo el diagnóstico son la hiperintensidad bilateral de los núcleos caudado y putamen (20; **Figura 2**). La utilización conjunta de las secuencias FLAIR y DWI aumenta la sensibilidad diagnóstica de la RM al 91% y la especificidad al 95% en el diagnóstico de ECJe, siendo la secuencia DWI la más sensible de las dos (14,21).

Por otro lado, en la ECJf, los estudios de RM son sólo útiles en la exclusión de otros diagnósticos, ya que el paciente no presentará cambios característicos en sus imágenes. No obstante, en aquellos pacientes con síntomas es posible que se evidencien cambios atróficos en la RM. Igualmente, los que padecen de ECJi, tampoco muestran cambios o patrones de imágenes característicos, sino que varían. Pueden presentar hiperintensidad bilateral simétrica de la cabeza del caudado y el putamen, hiperintensidad talámica, hiperintensidad de los ganglios basales y otros en las imágenes obtenidas por RM (20).

### **Electroencefalograma**

El Electroencefalograma (EEG) como herramienta diagnóstica expresa la actividad bioeléctrica cerebral a través de unos elementos gráficos. Esta técnica desempeña en la ECJ un papel importante para establecer el diagnóstico “probable”, fundamentalmente en la ECJe. Su precocidad puede evitar otros procedimientos diagnósticos innecesarios, reconocer su fatal pronóstico y prevenir la transmisión iatrogénica. Debido a que se trata de un proceso dinámico, por tanto sometido a variaciones temporales y a la observación de patrones pasajeros, es necesario practicar registros seriados que proporcionen la posibilidad de relacionar los resultados con datos clínicos. El patrón típico es un trazado formado por complejos de ondas agudas periódicas, de morfología habitualmente bifásicas o trifásicas, ampliamente distribuidos sobre ambos hemisferios cerebrales, síncronos y simétricos. La frecuencia de presentación es de 1 por segundo aproximadamente. Estas descripciones se dan sobre todo en la ECJe, ya que al ser más frecuente ha sido más ampliamente estudiada (22; **Figura 3**). Para la interpretación de estos signos en el EEG se deben tener en cuenta los criterios de Steinhoff y Knight, establecidos por la OMS (15).

La sensibilidad es realmente un aspecto controvertido según las diferentes publicaciones, por lo que siempre debe ir acompañado de una correlación clínica (22,23). Estará condicionado por la complementación y valoración de otros cambios poligráficos (electromiograma, electrocardiograma, polisomnografía, actigrafía), además de registros seriados.



**Figura 3.** EEG de un paciente con ECJ que evidencia la presencia de complejos periódicos bilaterales y simétricos. Las flechas en el EMG señalan la correlación de las mioclonías con los complejos periódicos en el EEG. s: segundo; mV: microvoltios (3).

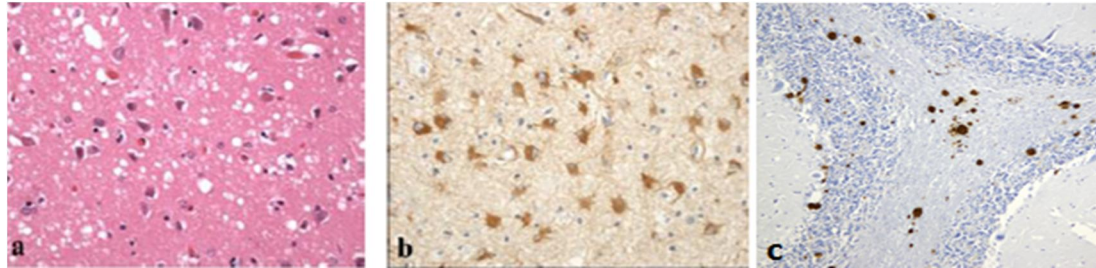
### Estudio anatomopatológico

En la actualidad, es el único método que permite establecer un diagnóstico definitivo de las enfermedades priónicas. El diagnóstico anatomopatológico se basa en la observación de los hallazgos histopatológicos, aunque variables, en determinadas áreas del SNC que consisten en: espongirosis (vacuolización del neuropilo de la sustancia gris) y/o vacuolización del pericarion neuronal de determinadas áreas de tejido nervioso central, principalmente en el tronco encefálico (**Figura 4**); pérdida y/o muerte neuronal, gliosis (hipertrofia y/o hiperplasia de células gliales como los astrocitos y activación de la microglía). El examen macroscópico del encéfalo suele ser normal (9, 15, 24).

Mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) es posible visualizar los depósitos de PrPsc *in situ*, lo que permite determinar tanto la presencia de la proteína patológica como su distribución en el tejido, su localización celular y las características morfológicas de la acumulación. La topografía que muestra esta proteína es muy heterogénea, pudiendo localizarse en un amplio número de áreas del encéfalo e incluso extenderse a localizaciones extracerebrales (esencialmente, linfoides). El



diagnóstico IHQ se realiza mediante la identificación del patrón característico de inmunotinción. Se pueden encontrar diferentes tipos de patrón de inmunotinción: placas, perineuronal, difuso..., en función de varios factores como la evolución clínica o duración de la enfermedad, el grado de espongiosis o los polimorfismos que presenta el individuo en el gen PRNP (24).



**Figura 4.** Principales hallazgos histopatológicos en pacientes afectados por ECJ a) Degeneración espongiforme en corteza cerebral (tinción de hematoxilina-eosina). b) Astrocitosis en tálamo (inmunohistoquímica con anticuerpos frente a GFAP; 15). c) Depósitos de PrPsc en cerebelo.

Por último, como se ha mencionado, la biopsia de amígdala también ha constituido una prueba complementaria que ha sido utilizada para el diagnóstico, específicamente en el diagnóstico de la vECJ, dado que la vECJ muestra la participación del sistema linforreticular (ganglios linfáticos, bazo, amígdala y apéndice) a diferencia de otras formas de la ECJ y por lo tanto, existe la posibilidad de detectar la PrPsc en una biopsia de dicho tejido (16). Sin embargo, en la actualidad no suele utilizarse como prueba de rutina (14). Su principal finalidad es proporcionar apoyo para el diagnóstico de vECJ en casos donde el cuadro clínico no es completamente típico y/u otras pruebas, como la RM cerebral, no han ayudado. En el contexto clínico adecuado, permite establecer un diagnóstico "probable" de vECJ (25,16). Aunque un hallazgo negativo no excluye el diagnóstico de la enfermedad.

El tejido biopsiado puede ser fácilmente obtenido bajo anestesia local en la mayoría de los pacientes, en los casos donde se haya practicado una amigdalectomía durante la infancia, la muestra de tejido linfoide puede obtenerse de los restos amigdalinos linguales. El procesamiento y análisis de la muestra mediante técnicas inmunohistoquímica debe ser realizado por laboratorios con experiencia, y se recomienda tener en cuenta las medidas preventivas de bioseguridad (uso de equipos de protección y destrucción de los instrumentos empleados) con relación al riesgo de infectividad para evitar una posible transmisión iatrogénica (26). Las complicaciones de

este procedimiento son poco inusuales, pero podría conllevar el riesgo de hemorragia e infección, así como los riesgos asociados a la anestesia (27).

## 5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

La importancia del estudio de las enfermedades priónicas no sólo radica en su impacto sobre la Salud Pública como enfermedad degenerativa y letal porque no existe tratamiento eficaz, sino también en el interés intrínseco que suscita para la ciencia. El diagnóstico definitivo de la enfermedad sigue siendo un desafío, ya que desgraciadamente no ha sido posible lograr evitar la necesidad de aplicar técnicas *post mortem*. En este sentido, parece conveniente dedicar este trabajo a revisar los avances científicos más significativos relacionados con la búsqueda de un diagnóstico *ante mortem* para esta patología. Se centrará en líneas abiertas de investigación enfocados a la aplicación de métodos no invasivos dirigidos al diagnóstico *in vivo* en pacientes afectados de ECJ, esencialmente de la forma esporádica por ser la más frecuente.

## 6. RESULTADOS DE LA REVISIÓN SOBRE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL DIAGNÓSTICO

Se describen a continuación los ensayos más relevantes sobre el diagnóstico de ECJ que han sido publicados en el ámbito científico en los últimos años.

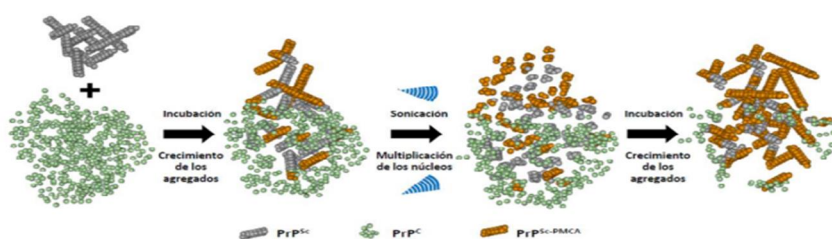
### 6.1. TÉCNICA PMCA

El procedimiento de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas o PMCA (*Protein misfolding cyclic amplification*), se describió por primera vez hace 10 años. Durante su corta vida, ha experimentado varios cambios y mejoras, aunque el principio básico de la tecnología sigue siendo el mismo: simular *in vitro* la replicación de priones *in vivo*, es decir, la conversión de PrPc a PrPsc (28,29).

Conceptualmente, la PMCA es análoga de la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, puesto que se basa en un proceso cíclico que permite una replicación acelerada de priones *in vitro*, en el cual cada ciclo se compone de dos fases. Durante la primera fase, la muestra que actúa de molde, conteniendo pequeñas cantidades de PrPsc, es incubada en presencia de un gran exceso de PrPc, que constituye el sustrato de la reacción, para inducir la formación de agregados de PrPsc. Tras esta fase de incubación, las muestras se someten a la acción de ultrasonidos con el fin de romper los agregados de PrPsc, multiplicando así el

número de núcleos de crecimiento para la continua conversión posterior. Con cada ciclo sucesivo, se produce un aumento exponencial de “semillas” acelerándose el proceso de conversión (28, 30,31).

De esta manera, tras varios ciclos de incubación - sonicación se incrementan significativamente los niveles de PrP<sup>Sc</sup>, llegando a lograr en la muestra a partir de valores indetectables, niveles fácilmente detectables mediante técnicas bioquímicas (29; **Figura 5**).



**Figura 5.** Representación esquemática de un ciclo de PMCA. Están representadas las dos fases que comprenden un ciclo de PMCA: 1) fase de crecimiento de los agregados; y 2) fase de multiplicación de los núcleos tras sonicación (32).

Por un lado, se ha demostrado que es capaz de reproducir los procesos complejos característicos de la transmisión de la PrP<sup>Sc</sup>, incluida la diversidad de las denominadas cepas priónicas en las distintas especies, y sus mecanismos de adaptación a la especie, así como los fenómenos de barrera de especie. Permite múltiples aplicaciones en la investigación en el campo de las enfermedades priónicas, como la comprensión de la biología exclusiva de la PrP<sup>Sc</sup> o la detección de moléculas que puedan interferir en su conversión. Pero el desarrollo de ensayos ultrasensibles para la detección de la PrP<sup>Sc</sup> como base para la detección de esta proteína en muestras biológicas constituye su más relevante aplicación como medio de diagnóstico bioquímico para la enfermedad. Todos estos logros hacen de esta técnica una de las herramientas más importantes de la última década en el campo de las enfermedades priónicas (28).

#### 6.1.1. Detección en muestras de orina mediante PMCA

Con la finalidad de investigar si la PrP<sup>Sc</sup> podía ser detectada en la orina de pacientes afectados por la vECJ (ya que la evidencia sugiere que la forma variante circula en fluidos corporales de personas en quienes la enfermedad se está incubando silenciosamente), se realizó un estudio en 2014 (33) que demostró, que en la orina de la mayoría de estos pacientes contenían pequeñas cantidades (40 a 100 partículas

oligoméricas en 1ml) de PrPsc. Para ello, fue empleada la técnica de PMCA con el fin de amplificar cantidades diminutas de la proteína aberrante (PrPsc), que permite su detección de forma altamente sensible. Se analizaron muestras de orina de varios pacientes con diversas enfermedades priónicas (vECJ, ECJe y ECJf), así como de pacientes con otros trastornos neurológicos degenerativos o no degenerativos y personas sanas. Los resultados revelaron que la PrPsc sólo fue detectable en la orina de pacientes con la vECJ, presentando el perfil electroforético típico asociado con esta enfermedad. Se detectó en 13 de 14 muestras de orina obtenidas de pacientes con vECJ y en ninguna de las 224 muestras de orina obtenidas de pacientes con otras enfermedades neurológicas y de controles sanos, lo que arroja una sensibilidad estimada del 92,9% y una especificidad de 100%. Cabe señalar, que el único paciente con vEJC con una muestra de orina que resultó negativa estaba recibiendo tratamiento con polisulfato de pentosano (administración intracerebroventricular), un agente que se ha estudiado precisamente para el tratamiento de esta variante de la enfermedad. La PrPsc no fue detectada en ninguna de las muestras obtenidas de pacientes que tenían otras enfermedades priónicas, lo que sugiere que es una característica exclusiva de la vECJ. No resulta sorprendente considerando que esta forma se adquiere, según lo aceptado, por ingestión oral. Todos los estudios relacionados con este tipo (vECJ) han demostrado una participación periférica más extensa que en las formas esporádicas (ECJe) o heredadas (ECJf). De hecho, como se ha señalado anteriormente, la PrPsc es fácilmente detectable mediante estudios inmunohistoquímicos o bioquímicos en ganglios linfáticos, amígdalas, bazo, porciones del tracto intestinal, riñón, hígado, páncreas y músculo esquelético de pacientes con vECJ.

A pesar de una alta sensibilidad y especificidad en los hallazgos de este ensayo, se necesitan más estudios para determinar si la detección de PrPsc en la orina se puede utilizar de forma diagnóstica.

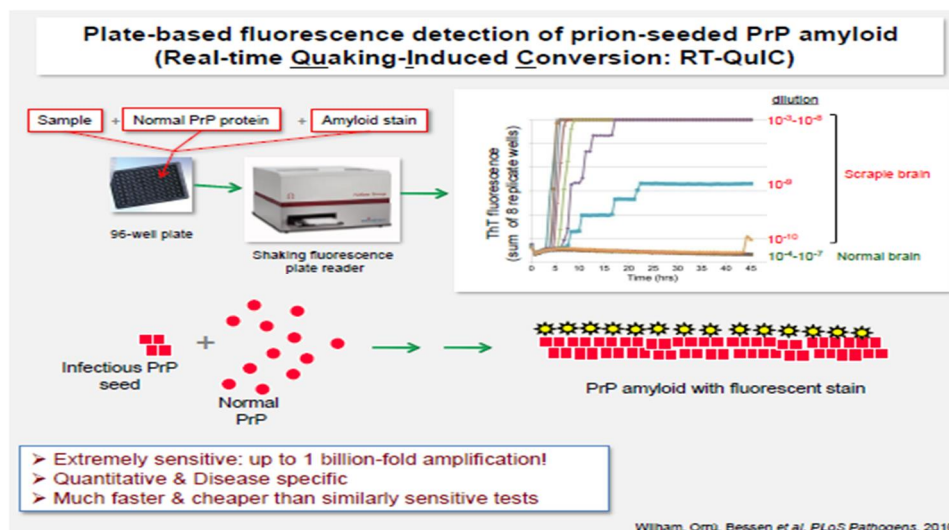
## **6.2. TÉCNICA RT-QuIC**

La técnica RT-QuIC (*Real-time Quaking-induced Conversion*), es una reciente adaptación del método de conversión inducida por agitación (QuIC, *Quaking-induced Conversion*), que a su vez procede de la PMCA. El ensayo QuIC imita el proceso de conversión *in vitro* de PrPc a PrPsc en un formato acelerado, empleando PrP

recombinante (PrPr) como sustrato para amplificar las cantidades diminutas de PrPsc dando como resultado la formación de fibrillas de amiloide. Por lo tanto, sustituye la sonicación aplicada en la PMCA por agitación, lo que supone una ventaja al permitir su realización de una forma más fácil y consistente. En 2011 se decidió combinar la tecnología QuIC con tinte de fluorescencia de tioflavina T (ThT) para controlar la formación de fibrillas de amiloide con el fin de minimizar el tiempo necesario para su detección mediante la fluorescencia de tioflavina T (ThT), proceso que pudo ser monitorizado en tiempo real (34). El nuevo ensayo, RT-QuIC (**Figura 9**), por su analogía con PCR en tiempo real, PCR-RT permite obtener resultados de inmediato, midiendo 96 repeticiones simultáneamente y ser potencialmente más seguro que el formato estándar de QuIC (S-QuIC) o PMCA.

Su mayor rendimiento diagnóstico ha sido confirmado en estudios recientes sobre muestras de LCR de hámsters inoculados con Scrapie experimental y de pacientes con ECJe, que pudieron ser correctamente identificados utilizando esta técnica (35).

Las adaptaciones y modificaciones de los ensayos de esta nueva prueba actualmente permiten la detección de la mayoría de las enfermedades priónicas conocidas de los mamíferos. Se ha demostrado que muchos tejidos y fluidos como la sangre, orina, saliva y el LCR son adecuados para el análisis RT-QuIC. Aunque la aplicación más significativa y ampliamente validada es su uso en el diagnóstico de ECJe en LCR (25).



**Figura 6.** Representación esquemática del método RT-QuIC. 1) Fase de conversión PrPc a PrPsc; 2) Agregación de tinte de tioflavina T (ThT) para controlar la formación de fibrillas de amiloide mediante fluorescencia (36).

### 6.2.1. Detección en LCR mediante RT-QuIC

En 2012 (35) se llevó a cabo un estudio para determinar si el análisis del LCR por el método RT-QuIC podría usarse como una prueba diagnóstica para ECJe. El ensayo demostró que esta nueva técnica tiene un potencial diagnóstico más específico para ECJe que las pruebas actuales en este fluido. Para llegar a esta conclusión primero se hizo un estudio preliminar, que analizó 108 muestras de LCR de pacientes con ECJe (confirmada neuropatológicamente) y de pacientes control. De ellas, 56 procedían de pacientes con ECJe y 52 de pacientes control. Posteriormente, se examinó un grupo confirmatorio de 118 pacientes, de ellos 67 afectados por ECJe confirmada neuropatológicamente y 51 eran casos control. Se comparó la sensibilidad y especificidad observada en ambos estudios (preliminar y confirmatorio) y revelaron que existía similitud entre ellos, de acuerdo a los valores obtenidos respectivamente, para el diagnóstico de la ECJe.

El análisis del LCR por método RT-QuIC en pacientes con sospecha de ECJe, mostró una sensibilidad y especificidad del 89% y 99%, respectivamente. Estos hallazgos fueron comparados con los resultados de otros ensayos realizados con el mismo fin, que habían informado una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100%. Esto significa que esta prueba podría proporcionar un futuro prometedor. Cabe señalar, que se detectó un solo paciente control que fue inesperadamente positivo por RT-QuIC. El examen posterior de los registros clínicos de este paciente sugirió que no se descartaba el diagnóstico de ECJe y que el paciente murió sin una autopsia, por lo que no fue posible realizar un diagnóstico definitivo. El ensayo RT-QuIC ha demostrado que tiene una sensibilidad comparable a la proteína 14-3-3 en LCR, pero es considerablemente más específica en el diagnóstico *pre-mortem* de los pacientes con sospecha de ECJe (35). Sin embargo, se requiere realizar más estudios con el fin de evaluar la sensibilidad de la técnica en cada uno de los subgrupos ECJe, así como su potencial papel complementario a la detección de proteína 14-3-3 para lograr un diagnóstico clínico de la enfermedad.

Debido a su alto grado de sensibilidad y especificidad para diagnosticar la ECJe, ha despertado el interés en un mayor número de laboratorios que desean establecer este tipo de análisis. Antes de que sea totalmente aceptada en la práctica clínica como una prueba de diagnóstico *ante mortem* fiable, se requiere garantizar que los laboratorios

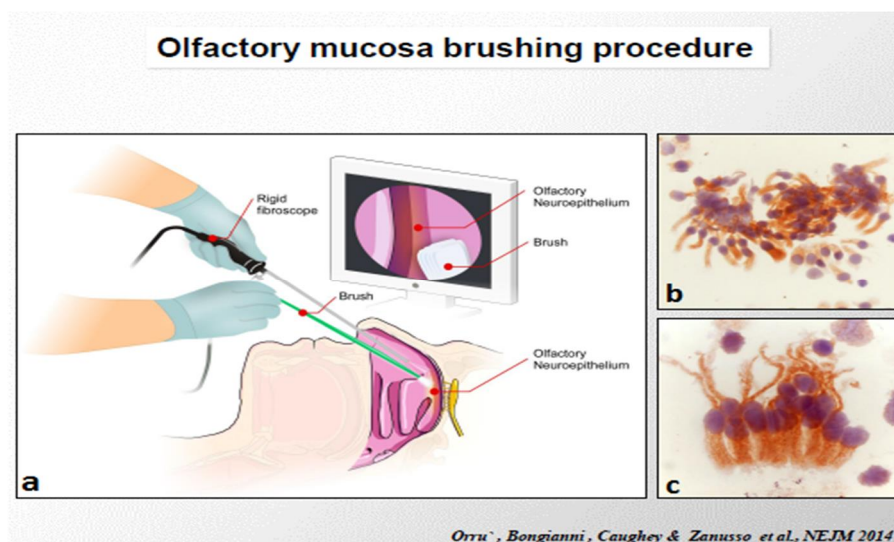
que la realizan empleando diferentes formas de PrPr y una variedad de instrumentos, estén produciendo resultados comparables. Por ello, en 2016 se realizó un estudio internacional con el objetivo de confirmar este aspecto (37). En él, se obtuvo la participación de un total de 11 laboratorios en todo el mundo e informó los resultados de 2 ensayos internacionales en anillo que se llevaron a cabo durante un período de 2 años, espaciados con un intervalo de 18 meses. La prueba inicial incluyó participantes europeos y utilizaban el mismo tipo de PrPr e instrumentación, mientras que la segunda prueba fue más amplia e incluyó participantes de Australia, Canadá y Japón, que empleaban tipos alternativos de PrPr y otras formas de instrumentación. Esto permitió una evaluación más rigurosa de la solidez y la transferibilidad de la técnica RT-QuIC. La precisión de los resultados obtenidos fue idéntica para cada uno de los sustratos PrPr utilizados. La concordancia completa entre los laboratorios demostró que el ensayo RT-QuIC en LCR es adaptable a diferentes instrumentos de laboratorio y diferentes tipos de PrPr. El alto nivel de precisión y acuerdo entre los laboratorios que utilizan RT-QuIC en LCR, respalda la introducción de esta técnica en la práctica clínica.

#### **6.2.2. Detección en mucosa olfatoria mediante RT-QuIC**

Debido a que el análisis RT-QuIC del LCR no logró identificar la enfermedad en 10 - 20% de los pacientes con ECJe, se intentó mejorar la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico aplicando la tecnología RT-QuIC sobre otro tejido: epitelio olfatorio (38). Se ha demostrado que la PrPsc se acumula en el epitelio olfatorio de pacientes con ECJe (39), lo que sugiere que los análisis de muestras de biopsia de mucosa olfativa podrían ser diagnósticos para estos pacientes. Sin embargo, sólo es posible obtener muestras discretas de tejido de mucosa olfatoria (MO) a través de las biopsias. Esto unido a que el epitelio olfatorio en la bóveda nasal está intercalado con mucosa respiratoria que no contiene PrPsc en los pacientes de ECJe, sugiere que el análisis de esta mucosa podría proporcionar falsos negativos. Además, la biopsia puede ocasionar complicaciones quirúrgicas tales como sangrado, infecciones o lesiones traumáticas.

Por todo ello, se decidió evaluar la precisión del RT-QuIC en el diagnóstico de la ECJe en pacientes mediante el procedimiento de citología o cepillado nasal (**Figura 7**), que es mucho más seguro y menos invasivo, y permite una extracción sutil de la mucosa olfativa de una amplia área de superficie del epitelio olfativo. En este estudio (38) fue





**Figura 7.** a) Procedimiento para la obtención de muestras de epitelio olfatorio mediante cepillado nasal. b) y c) Imágenes de microscopía óptica de conglomerados de neuronas olfatorias cilíndricas ciliadas, teñidas con hematoxilina-eosina (38).

demostrado que también el RT-QuIC de cepillado de la mucosa olfatoria podría discriminar a los pacientes con ECJe de los controles que no estaban afectados por la enfermedad. Para ello, fueron recogidas muestras de cepillado del epitelio olfatorio y LCR de pacientes afectados de ECJe, así como de pacientes sanos. Se aplicó la RT-QuIC, obteniéndose como resultado que los ensayos RT-QuIC sembrados con cepillado nasal fueron positivos en 30 de 31 pacientes con ECJ (de los cuales fueron detectados 15 de 15 con diagnóstico definitivo de ECJe, 13 de 14 con diagnóstico probable de ECJe y 2 de 2 ECJf) y siendo negativos en los pacientes no afectados por ECJ, lo que indica una sensibilidad del 97% y especificidad del 100% para la detección de la enfermedad. En comparación con las pruebas RT-QuIC en las muestras de LCR del mismo grupo de pacientes, éstas tenían una sensibilidad del 77% y una especificidad del 100%. Estos hallazgos revelaron que la aplicación de RT-QuIC sobre las muestras de mucosa olfatoria ofrecía una mayor sensibilidad que sobre las muestras de LCR obtenidas de los mismos pacientes. Además, los resultados de RT-QuIC se obtuvieron en menor tiempo (50 horas frente a 90 horas).

La presencia elevada de PrPsc en la mucosa olfatoria de pacientes con ECJe sugiere que la infectividad también puede estar presente, lo que implica aspectos de bioseguridad al plantear la posibilidad de que las secreciones nasales de estos pacientes puedan ser potencialmente infectivas. De hecho, se ha documentado la



transmisión nasal y a través de aerosoles de las enfermedades priónicas utilizando procedimientos experimentales en modelos animales, pero no hay evidencia epidemiológica de dicha transmisión (38,40). Sin embargo, los instrumentos médicos que entran en contacto con la mucosa olfatoria de los pacientes con ECJe podrían contaminarse, lo que plantea la cuestión de si la transmisión iatrogénica es posible por esta vía (41).

La elevada sensibilidad y especificidad del análisis RT-QuIC basada en el cepillado nasal de la mucosa olfatoria para identificar pacientes con ECJe, indican que es útil para establecer un diagnóstico definitivo de la enfermedad.

### **6.3. RT-QuIC DE SEGUNDA GENERACIÓN**

Hasta el momento la implementación del RT-QuIC como herramienta clave en el diagnóstico había aportado un gran avance científico. Sin embargo, tal como se estaba aplicando tenía una demora de 2.5 a 5 días y fallaba de 11 a 23% de los casos de ECJ. En 2015 la técnica fue mejorada de manera que, los resultados inmediatos se obtienen en cuestión de horas en lugar de días con una sensibilidad mejorada (42).

A la versión anterior o RT-QuIC en LCR de primera generación se le nombró PQ-CSF (*Previous QuIC-Cerebral Spinal Fluid*) y a su versión mejorada o RT-QuIC de segunda generación (IQ-CSF). El IQ-CSF utiliza una forma truncada de PrPr de hámster (90-231 aminoácidos) como sustrato, incubaciones a 55°C, y la adición de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,002% (42,43). Los datos indicaron que la eliminación de determinados residuos del extremo N-terminal (forma truncada) permiten reacciones mucho más rápidas en el proceso de detección RT-QuIC, pero sólo cuando se complementa con SDS. Paradójicamente, la adición de SDS a las mezclas de reacción que tienen como sustrato la forma completa de PrPr de esta misma especie inhibió la reacción. Para mejorar aún más las nuevas condiciones descritas anteriormente, se aumentó la temperatura de 42°C a 55°C, lo que aceleró la detección RT-QuIC de ECJe en LCR sin provocar falsos positivos en las muestras (42).

Este ensayo consiguió un aumento del 21% en la sensibilidad diagnóstica y una reducción (~ 42 h) del tiempo promedio para la detección de muestras positivas de 4-24h aproximadamente, al tiempo que mantuvo el 100% de especificidad diagnóstica (43).

Recientemente, se ha propuesto desarrollar un algoritmo diagnóstico preciso y temprano para pacientes con ECJe clínicamente sospechosos, mediante el uso del ensayo RT-QuIC (IQ-CSF) en muestras de LCR, muestras de mucosas olfatorias o ambas. Comenzaría con el análisis RT-QuIC IQ-CSF y, si los resultados fueran negativos, se seguiría con un análisis de mucosa olfatoria. Los resultados hasta la fecha han proporcionado una sensibilidad y especificidad de prácticamente el 100% en la fase clínica de la enfermedad. Se espera en un futuro poder detectarla desde la fase preclínica (44).

En enero del pasado año, los criterios diagnósticos fueron actualizados como se ha comentado en el apartado “Diagnóstico de ECJ” (11,16), donde ha quedado incluido este ensayo como parte del procedimiento diagnóstico.

#### **6.3.1. Detección en piel mediante RT-QuIC**

Algunos estudios epidemiológicos han sugerido el riesgo de ECJe con cirugías que no son del SNC e involucran la piel. Los científicos informaron en un estudio realizado en 2017 (45), que la piel de pacientes con ECJe contenía PrPsc e infectividad, aunque a niveles mucho más bajos en comparación con los tejidos cerebrales de estos pacientes. Este hallazgo aumenta la preocupación sobre el potencial de transmisión iatrogénica de la ECJe a través de la piel, ya que la presencia de la PrPsc en tejido cutáneo plantea otras posibles vías iatrogénicas de ECJ, aunque la evidencia epidemiológica al respecto no ha sido concluyente.

Se cree que el modo de propagación de la PrPsc entre el cerebro y la piel se produce a través del SNP. Se ha podido detectar PrPsc en el ganglio trigémino en pacientes con ECJe y vECJ y en las fibras nerviosas de la piel de hámsters infectados (45). Los dermatomas examinados en el estudio, incluyendo el ápice del cráneo, región periauricular, el antebrazo y la parte inferior de la espalda están inervados por la división oftálmica del nervio oculomotor ó III par craneal, los nervios cervicales C2, C3, C5, y los nervios torácicos T10 y T11, respectivamente. Es posible que la PrPsc se extienda desde el cerebro a los dermatomas a través de estos nervios espinales. En el análisis de las muestras, el ensayo RT-QuIC fue el más sensible para detectar PrPsc dérmica en los casos con ECJ. Todos los pacientes con ECJ tenían al menos una muestra de piel positiva de las diferentes zonas que fueron obtenidas, siendo la región

periauricular la que demostró una mayor concentración de PrPsc (en el 94% de los casos de ECJe).

A pesar de que en el estudio se detectara la presencia de PrPsc en la piel de los casos de ECJe no se pudo establecer cuándo ni dónde aparece esta proteína en el curso de la enfermedad y los datos no aclaran la base de informes epidemiológicos, aparentemente divergentes, sobre los riesgos de ECJe, o la falta de los mismos, asociados con procedimientos quirúrgicos que incluyen la piel. Tampoco fue posible validar el análisis de la piel por método RT-QuIC como herramienta útil en la práctica diagnóstica (45). Por último, se enfatizó en el hecho de que de ninguna manera el estudio implicaba que la transmisión de PrPsc puede ocurrir por contacto casual. Es necesario un estudio más exhaustivo para determinar si deben tomarse precauciones adicionales durante las cirugías que no son del SNC en este tipo de pacientes, especialmente en procedimientos en los que se reutilizan los instrumentos quirúrgicos.

#### **6.4. DETECCIÓN MEDIANTE BIOMARCADORES AMPc y GMPc**

Un ensayo practicado en ratas en el año 2012 demostró que la alteración de las cantidades de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc, *cyclic adenosine-3',5'-monophosphate*) y guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc, *cyclic guanosine-3',5'-monophosphate*) podría formar parte del diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas, la ECJ. Los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc constituyen importantes segundos mensajeros. En el cerebro la señalización de estos nucleótidos está involucrada en múltiples mecanismos que implican neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglia, como la transducción de señales en las sinapsis, la comunicación entre neuronas y células gliales o los procesos inflamatorios. La alteración de estos segundos mensajeros afecta sobre la función normal del cerebro y se pueden encontrar en varias enfermedades neurológicas como en la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la ECJ (46).

En la investigación se cotejaba el comportamiento diferencial de la EP, ECJ y ELA. A partir de ella, pudo observarse que, mientras en la ECJ los niveles de ambos nucleótidos se encontraban disminuidos, en las dos patologías restantes sólo había disminución del GMPc, motivo por el que este análisis podría usarse como método diagnóstico específico para la ECJ. Las concentraciones bajas de estos nucleótidos en la ECJ parecen ser consecuencia de su menor síntesis, secundaria a la profunda

degeneración neurológica que caracteriza esta condición. La gran estabilidad de dichos nucleótidos en distintas condiciones de manejo de la muestra es una gran ventaja a favor de esta prueba.

La sensibilidad estimada de la detección de AMPc en la ECJ es de en torno al 100 %, con una especificidad aproximada del 63,6 %. En el caso del GMPc, la sensibilidad es del 66,7 % y la especificidad de aproximadamente el 100 %. Al combinar los dos parámetros, presentan una sensibilidad aproximada del 80 %, y una especificidad que ronda el 90,9 %, encontrándose en el rango aceptado para los biomarcadores ya reportados. El potencial de esta prueba aumenta al hacer uso de los niveles de AMPc en conjunto con los de proteína tau, que dan unos valores de sensibilidad cercanos al 93,3 % y una especificidad de entorno al 100 %.

En conclusión, se cree que la medición de las concentraciones de ambos nucleótidos AMPc y GMPc en el LCR de pacientes con ECJ podría llegar a ser útil para controlar la progresión de la enfermedad y el control terapéutico.

## **6.5. TÉCNICA DDA**

### **6.5.1 Detección en muestras de orina**

Debido a que en el ensayo descrito en el apartado 6.1.1 se demostró que se podía detectar PrPsc en la orina de pacientes con vECJ mediante PMCA, y no siendo así para la ECJe aparentemente, los científicos decidieron llevar a cabo un estudio en 2016 (47) para determinar la viabilidad del diagnóstico de ECJe mediante la adaptación de una prueba desarrollada originalmente para la vECJ en sangre (denominada ensayo de detección directa; DDA, *Direct Deteccion Assay*) a la orina. Esta técnica consiste básicamente en detectar PrPsc con anticuerpos monoclonales frente a PrPsc. Hasta entonces la detección de la ECJe se había limitado a los tejidos del SNC y al LCR, todos procedimientos invasivos.

El estudio demostró que podría formar parte de las pruebas de diagnóstico de ECJe al observarse resultados positivos en las muestras de orina (8 de 20) de pacientes con ECJe, una indicación ausente en individuos sanos y pacientes con enfermedades neurodegenerativas no priónicas. La especificidad del ensayo para la enfermedad priónica fue del 100%, en ausencia de falsos positivos en los individuos control. En contraste con el estudio anterior, que utiliza un método diferente, la sensibilidad para la forma infectiva, vECJ, fue baja (7,7%), mientras que la sensibilidad a ECJe fue

inesperadamente alta (40%). Sorprendentemente, el ensayo fue capaz de detectar infección por ECJe en casi la mitad de las muestras de los pacientes.

Si bien la sensibilidad del diagnóstico resultó baja (40%), es la primera demostración de un ensayo que puede detectar infección de ECJe fuera del SNC, a través del análisis de la orina por medios bioquímicos. Esto ofrece la posibilidad de una prueba bioquímica *pre mortem* no invasiva y de fácil acceso, que podría reducir significativamente el tiempo para establecer el diagnóstico de la enfermedad. Adicionalmente, resultaría también útil en la posible detección de productos farmacéuticos derivados de la orina humana (como la gonadotropina, ya que es probable que sea empleada para tratar infertilidad en mujeres), que podrían contener proteína infectiva.

Es probable que esta sensibilidad diagnóstica del estudio pueda mejorarse mediante el pre-tratamiento o el procesamiento de la orina antes del ensayo, o el análisis de un mayor número de muestras. Aunque no está claro si ésta podría acercarse al 100%, ya que se considera probable que exista variabilidad en la concentración de PrPsc en la orina de pacientes individuales.

#### **6.5.2 Detección en muestras de sangre**

Como consecuencia de la exposición generalizada a la proteína prión procedente de EEB a través de la cadena alimentaria del Reino Unido, existe la posibilidad de que haya portadores de vECJ en la población. Aunque los casos de vECJ son poco frecuentes gracias a las medidas de vigilancia, esta sospecha ha generado preocupación no sólo para las personas afectadas sino también por la posibilidad de perpetuar la infección por vECJ a través de tratamientos médicos, en particular la transfusión de productos sanguíneos contaminados. Varios estudios en animales han demostrado que la transmisión de priones puede ocurrir por transfusión sanguínea y que esta es una vía de infección eficiente. Por estos motivos, en 2011 (48) se llevó a cabo un estudio con el objetivo de establecer un análisis basado en sangre para la detección de vECJ, dado que la sangre es un fluido corporal que se obtiene fácilmente y cuyo análisis podría evitar el riesgo de transmisión secundaria. En el ensayo, se desarrolló una matriz de unión de estado sólido para capturar y concentrar las proteínas priónicas asociadas a la enfermedad. Unieron este método a la inmunodetección directa de dicho material unido a la superficie, por lo que la técnica se denominaba DDA (*Direct Detection Assay*). Esta técnica evita el uso de cualquier

proceso proteolítico, asegurando que PrPsc esté disponible para su detección. En el estudio se analizaron muestras de sangre de individuos con vECJ, ECJe, enfermedades neurodegenerativas y controles normales. Los resultados demostraron que 15 de 21 casos con vECJ se identificaron positivamente, mostrando una sensibilidad del ensayo para la vECJ del 71% y una especificidad del 100%. Por el contrario, no se obtuvo ningún resultado positivo en las muestras de sangre de individuos con ECJe a pesar del buen rendimiento de este método diagnóstico frente a la vECJ. Los hallazgos demuestran así la capacidad del ensayo para detectar la infección priónica en sangre, y que el *screening* para la protección de los suministros de sangre donada es técnicamente factible. No obstante, se necesitan realizar más estudios que permitan seguir perfeccionando este método diagnóstico y de esta forma mejorar su sensibilidad. Se cree que el análisis de muestras de sangre de casos pre-sintomáticos, podría permitir el desarrollo de pruebas de detección a gran escala desde fases tempranas de la enfermedad, ya que el ensayo se ha restringido a muestras provenientes de pacientes con vECJ en etapa sintomática.

Otro ensayo mediante el método DDA fue llevado a cabo en 2015 (49) con el objetivo de detectar la enfermedad priónica, pero esta vez desde las etapas más tempranas de la enfermedad (estadio preclínico). Debido a la falta de disponibilidad de muestras de portadores subclínicos conocidos de vECJ para validar cualquier ensayo, se recurrió al modelo murino. Se tomaron muestras de sangre de ratones infectados en diversas etapas de incubación de la enfermedad hasta el inicio de la enfermedad clínica y se compararon con muestras de sangre de animales control no infectados. Los resultados del ensayo demostraron que la sensibilidad analítica mediante este método fue ligeramente inferior respecto a la observada previamente para muestras de sangre humana, sin embargo, fue suficiente para detectar infección en todos los puntos de incubación probados.

Estos hallazgos resultan de gran interés para evitar la contaminación por vía iatrogénica, pero aún no se han podido comprobar en modelo humano. La detección de infección priónica en muestras de sangre de pacientes en etapas subclínicas continúa siendo un desafío.

## 7. CONCLUSIONES

Tras llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre la situación actual del diagnóstico de las enfermedades priónicas y de los ensayos más relevantes en el ámbito científico en los últimos años, se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

1- El diagnóstico de este grupo de enfermedades requiere en la actualidad una serie de pruebas complementarias como el EEG, RM, PL y pruebas genéticas para ayudar en el diagnóstico diferencial de la demencia rápidamente progresiva. Sin embargo, la confirmación del diagnóstico sólo se logra a través de la valoración microscópica de tejido nervioso *post mortem*.

2- El principal reto en materia de diagnóstico continúa siendo la obtención de un test capaz de diagnosticar la enfermedad *in vivo*, en fases tempranas del curso de la enfermedad y a partir de muestras biológicas de fácil acceso como la sangre. La principal dificultad que se plantea es la baja concentración de PrPsc en este fluido, por lo que es necesario un test con una sensibilidad analítica excelente. En los últimos años, diversos grupos de investigación han desarrollado distintas estrategias para superar esta dificultad, aunque hasta el momento no se ha conseguido.

3- Se han logrado importantes avances científicos con el desarrollo de métodos para el diagnóstico de las enfermedades priónicas. Una de las técnicas más prometedoras es la PMCA, basada en la amplificación de la PrPsc de una forma similar a como se produce durante el proceso patológico. La detección de esta proteína en muestras biológicas constituye su más relevante potencial como medio de diagnóstico bioquímico.

4- También ha sido desarrollada una nueva prueba molecular, conocida como ensayo *RT-QuIC*, que ha demostrado tener una sensibilidad comparable a la proteína 14-3-3 en LCR, pero es considerablemente más específica que ésta en el diagnóstico *pre-mortem*. Por otro lado también parece superar a la PMCA, dado que es mucho más rápida, segura y presenta un mayor rendimiento diagnóstico. Además, se ha demostrado que muchos tejidos y fluidos son adecuados para el análisis *RT-QuIC*, al igual que la PMCA. Por todas las razones anteriores, el *RT-QuIC* fue recientemente introducido dentro de los criterios diagnósticos de la ECJ.

5- La utilización de estas técnicas de reciente desarrollo proporcionan una herramienta útil para la evaluación de ensayos terapéuticos planteados para este grupo de enfermedades aún no tratables, así como una base científica que pudiera llegar al establecimiento de un diagnóstico definitivo de la enfermedad *in vivo*. También son útiles para lograr reducir el riesgo de transmisión del agente causal.

6- Es imprescindible continuar mejorando las técnicas existentes con el fin de lograr una metodología eficaz para poder facilitar al paciente un diagnóstico fiable de las enfermedades priónicas *ante mortem*.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Rubio T, Verdecia M. Enfermedades priónicas. MEDISAN 2009; 13(1). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13\\_1\\_09/san08109.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13_1_09/san08109.htm) (9 febrero 2018).
2. Pidone C. La Teoría del prión. Analecta Veterinaria 2005; 25(2): 62-72.
3. Farreras P, Rozman C. Medicina Interna (Vol II). 17ª ed. Barcelona: Elsevier, 2012; pp. 1333-1334.
4. Polo JM. Historia y clasificación de las enfermedades priónicas humanas. Rev Neurol. 2000; 31: 137-141
5. Diack AB, Head MW, McCutcheon S, et al. Variant CJD. 18 years of research and surveillance. Prion 2014; 8 (4): 286-295.
6. Swaminathan A, Kedar S. Creutzfeldt-Jakob disease. En: Ferri's Clinical Advisor. Eds: Alvero R, Borkan JM, Ferri FF, et al. 1ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2014.
7. Rodríguez A. Vías de señalización en enfermedades priónicas. Instituto de Neuropatología. Hospital Universitario de Bellvitge [Tesis doctoral]. Universidad de Barcelona. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, 2007.
8. Rey-Gayoa A, Calbo F. Estructura de proteínas: plegamiento y priones. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20 (4): 161-167.
9. Zarranz JJ. Neurología. 5ª ed. Barcelona: Elsevier, 2013; pp. 269-274.
10. EUROCJD (European Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Network). Surveillance Data - CJD International Surveillance Network. Disponible en: <http://www.eurocjd.ed.ac.uk/surveillance%20data%201.html>
11. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Encefalopatías Espongiformes Transmisibles Humanas. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/encefalopatias-espongiformes-transmisibles-humanas.html> [28 febrero 2018]
12. Annus Á, Csáti A, Vécsei L. Prion diseases: New considerations. Clin Neurol Neurosurg 2016; 150: 125-132.
13. Walter B, Daroff R, Fenichel G, Jankovic J. Neurology in Clinical Practice. 5ª ed., Philadelphia, PA: Elsevier Butterworth Heinemann, 2008; pp.1579-2122.
14. NeuroWikia. Portal de la Sociedad Española de Neurología. Disponible en: <http://www.neurowikia.es/content/enfermedades-priónicas> [5 marzo 2018]
15. Cano R, Sierra M.J, Tello O. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid, 2015; pp. 110-123.
16. National CJD Research & Surveillance Unit. The University of Edinburgh. Disponible en: <http://www.cjd.ed.ac.uk> [7 de marzo de 2018]
17. Ladogana A, Sanchez-Juan P, Mitrová E, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in human genetic transmissible spongiform encephalopathies. J Neurol 2009; 256 (10): 1620-1628.
18. Muayqil T, Gronseth G, Camicioli R. Evidence-based guideline: Diagnostic accuracy of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: report of the Guideline

- Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2012; 79.
19. Macfarlane RG, Wroe SJ, Collinge J, Yousry TA, Jäger HR. Neuroimaging findings in human prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 664-670.
  20. Shabtai N, Vargas C, Zarco LA. Enfermedades priónicas humanas. Universidad Médica de Bogotá (Colombia) 2013; 54(4): 495-516.
  21. Ortega-Cubero S, Luquín MR, Domínguez I, et al. Neuroimagen estructural y funcional en las enfermedades priónicas humanas. *Rev Neurol* 2013; 28 (5): 299-308.
  22. Ortega-Albás JJ. Electroencefalograma en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. *Rev Neurol* 2000; 31(2): 152-155.
  23. Ortega-Albás JJ, Serrano-García AL. Neurofisiología en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. *Rev Neurol* 2003; 36 (4): 376-380.
  24. Gonzalo-Pascual I, Cuadrado-Corrales N. Técnicas de inmunohistoquímica en las enfermedades por priones. *Rev Neurol* 2000; 31: 156-159.
  25. Knight R. Clinical Features and Diagnosis of Human Prion Diseases. En: *Neuromethods*. Ed: Pawel P. Liberski. New York: Springer Nature 2017; 129: 65-78.
  26. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet*. 1997; 349(9045): 99-100.
  27. Zeidler M, Knight R, Stewart G, et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Routine tonsil biopsy for diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease is not justified. *BMJ* 1999; 318(7182): 538.
  28. Morales R, Duran-Aniotz C, Diaz-Espinoza R, Camacho MV, Soto C. Protein misfolding cyclic amplification of infectious prions. *Nat Protoc* 2012; 7(7): 1397-1409.
  29. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001; 411(6839): 810-813.
  30. Castilla J, Saá P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 2005; 121(2): 195-206.
  31. Castilla J, Saá P, Morales R, Abid K, Maundrell K, Soto C. Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol* 2006; 412: 3-21.
  32. Saá P, Cervenakova L. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus Res* 2015; 207: 47-61.
  33. Moda F, Gambetti P, Notari S, et al. Prion in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 2014; 371 (6): 530-539.
  34. Atarashi R, Sano K, Satoh K, Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion* 2011; 5(3): 150-153.
  35. McGuire LI, Peden AH, Orrú CD, et al. RT-QuIC analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2012; 72(2): 278-285.

36. Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, et al. Rapid End-Point Quantitation of Prion Seeding Activity with Sensitivity Comparable to Bioassays. *PLoS Pathog* 2010; 6(12).
37. McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, et al. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: An international study. *Ann Neurol* 2016; 80(1): 160-165.
38. Orrú CD, Bongianni M, Tonoli G, et al. Test for Creutzfeldt–Jakob Disease Using Nasal Brushings. *N Engl J Med* 2014; 371(6): 519-529.
39. Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 711-719.
40. Kincaid AE, Hudson KF, Richey MW, Bartz JC. Rapid transepithelial transport of prions following inhalation. *J Virol* 2012; 86: 12731-12740.
41. Brown P, Brandel JP, Sato T, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 901-917.
42. Orrú CD, Groveman BR, Hughson AG, Zanusso G, Coulthart MB, Caughey B. Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human Creutzfeldt-Jakob disease using cerebrospinal fluid. *MBio* 2015; 6(1).
43. Groveman BR, Orrú CD, Hughson AG, et al. Extended and direct evaluation of RT-QuIC assays for Creutzfeldt-Jakob disease diagnosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2016; 4(2): 139-144.
44. Bongianni M, Orrù C, Groveman BR, Sacchetto L. Diagnosis of Human Prion Disease Using Real-Time Quaking-Induced Conversion Testing of Olfactory Mucosa and Cerebrospinal Fluid Samples. *JAMA Neurol* 2017; 74(2): 155-162.
45. Orrú CD, Yuan J, Appleby BS, et al. Prion seeding activity and infectivity in skin samples from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med* 2017; 9(417).
46. Oeckl P, Steinacker P, Lehnert S, et al. CSF concentrations of cAMP and cGMP are lower in patients with Creutzfeldt-Jakob disease but not Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2012; 7 (3).
47. Luk L, Jones S, Thomas C, et al. Diagnosing Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease by the Detection of Abnormal Prion Protein in Patient Urine. *JAMA Neurol* 2016; 73(12): 1454-1460.
48. Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A. Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 2011; 377(9764):487–493.
49. Sawyer EB, Edgeworth JA, Thomas C, Collinge J, Jackson GS. Preclinical detection of infectivity and disease-specific PrP in blood throughout the incubation period of prion disease. *Sci Rep* 2015; 5:17742.