

La variante della malattia di Creutzfeldt-Jacob

Dr Alfredo Dragani, Centro Emofilia di Pescara

Introduzione

Le malattie da prione o encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), rappresentano un gruppo di rari disordini neurodegenerativi a prognosi sfavorevole, correlabili alla proteina prionica (PrP). Nell'uomo esse includono tre principali categorie:

1. Forme Sporadiche

1. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD)
2. Sporadic fatal insomnia
3. Variably protease-sensitive prionopathy

2. Forme Acquisite

1. Kuru
2. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease

3. Forme Genetiche

1. Familial Creutzfeldt-Jakob disease
2. Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome and variants
3. Fatal familial insomnia
4. Prion protein congophilic angiopathy

Negli animali - pecore, bovini, cervidi ed altre specie - le patologie da prioni hanno diverse e specifiche denominazioni: *scrapie*, *encefalopatia spongiforme bovina* (BSE), *chronic wasting disease*.

Il primo report della malattia da prione nell'uomo, *Creutzfeldt-Jakob disease* (CJD), apparve nel 1920 (1-2), ma soltanto nel 1982 Prusiner suggeriva la possibilità che l'agente trasmissibile fosse costituito da una proteina priva di acidi nucleici, parzialmente resistente alla degradazione proteolitica (3).

Una distinta variante clinico-patologica della classica CJD, definita *variant Creutzfeldt-Jakob disease* (vCJD) e caratterizzata anche da impegno linforeticolare (4), veniva descritta per la prima volta nel 1996 (5). Molti dati sperimentali, epidemiologici e clinici hanno più recentemente suggerito che la vCJD sia la manifestazione umana della BSE (7), secondaria al consumo di carne infetta. In UK la BSE si è manifestata in forma epidemica a partire dagli anni '80, con un picco di incidenza nel 1983 e più di 180.000 casi clinici diagnosticati. Si stima tuttavia che oltre 3.000.000 di bovini infetti possano essere entrati nella catena alimentare in UK (7). L'origine dell'epidemia di BSE non è del tutto chiara ma l'abolizione degli alimenti basati sull'impiego di farine animali e destinati agli allevamenti, ha permesso il controllo dell'epidemia, consentendo una grande riduzione del numero di casi segnalati di BSE (8).

Le proteine prioniche

La PrP è una glicoproteina ubiquitaria. Nell'uomo il gene PRNP è situato nel cromosoma 20. Esso codifica per una proto-proteina composta da 253 aminoacidi, i primi 22 N-terminali dei quali vengono rimossi dalla PrP dopo il trasporto al reticolo endoteliale, mentre gli ultimi 23 C-terminali, saranno clivati dopo addizione di glicosilfosfaditilinositolo, che aiuta la proteina ad ancorarsi alla superficie esterna delle membrane cellulari (9).

La controparte patogena della proteina prionica normale (PrP^C), è denominata PrP^{Sc}. Questa isoforma anomala, identica nella sequenza aminoacidica primaria, differisce dalla forma normale per una diversa struttura secondaria e terziaria della proteina. Nella PrP^C vi è predominanza di contenuto in alfa eliche mentre la PrP^{Sc} è più ricca in strutture secondarie beta (10). La modificazione conformazionale dell'isoforma PrP^{Sc}, rende questa proteina resistente alla proteolisi e alla degradazione con le comuni metodiche fisiche o chimiche di decontaminazione o disinfezione. La PrP^C, al contrario, resta solubile nei detergenti non denaturanti ed è totalmente degradabile dalle proteasi (10).

La conformazione strutturale di PrP^{Sc} è ritenuta agire come un *template* strutturale, il quale induce la conversione di altre PrP^C nelle forme patologiche. Durante la patogenesi della TSE, la conversione di PrP^C in PrP^{Sc} avviene in due fasi: in una prima fase aggregati ordinati di PrP^{Sc} legano PrP^C; nella seconda fase i PrP^C legati ai PrP^{Sc}, subiscono una modificazione della conformazione strutturale attraverso meccanismi non ben conosciuti; il risultato finale è la trasformazione di PrP^C in PrP^{Sc}. Quest'ultima ha la capacità di accumularsi all'interno delle cellule o negli spazi intercellulari, in prevalenza nel sistema nervoso centrale e in quello linfatico. La formazione di PrP^{Sc} è associata ad una massiva distruzione neuronale, che determina l'aspetto spongiforme tipico dell'encefalo colpito da TSE (11-13).

La vCJD

La forma sporadica di CJD (sCJD) è la più frequente tra le malattie da prione nell'uomo, con incidenza annuale di circa 1.5 per milione di abitanti (14). Nei pazienti con sCJD, vi è evidenza di una predisposizione genetica. Nel gene PRNP, il polimorfismo che si verifica naturalmente al codone 129 può codificare per la sintesi di metionina o di valina; nei soggetti affetti da sCJD, è stata osservata una predominanza di omozigoti ed in particolare di omozigoti per la metionina, rispetto alla normale popolazione Caucasica (15).

Evidenze epidemiologiche suggeriscono che in UK, la BSE è stata responsabile dell'emergenza vCJD causata dal consumo di carni infette (16). La vCJD rappresenta l'unico esempio di malattia prionica umana di origine zoonotica. Dopo contaminazione orale dell'agente infettivo, la PrP^{Sc} si replica negli organi linfoidei (milza, linfonodi, tonsille, timo), presentando tuttavia livelli di infettività di 2-3 log più bassi rispetto a quelli misurabili nell'encefalo (17).

La vCJD mostra un fenotipo clinico e patologico diverso da quello della forma sporadica e di altre malattie da prione (18), con esordio tipicamente giovanile ed aspettativa di vita di circa 18 mesi (9). Il quadro clinico comprende disturbi psichiatrici e comportamentali, generalmente con la combinazione di due o più sintomi quali: *agitazione, aggressività, depressione, insonnia, labilità emotiva e apatia*. I sintomi neurologici compaiono circa 6 mesi dopo l'esordio dei sintomi psichiatrici e comprendono *atassia cerebellare, decadimento cognitivo, movimenti involontari*,

incontinenza urinaria, progressiva ipocinesia, mutismo. Il decesso è tipicamente correlato alle infezioni intercorrenti (9).

Da un punto di vista patologico, nei soggetti con vCJD è possibile osservare placche cerebrali amiloidi circondate da lesioni spongiformi (cosiddette *placche floride*), con ampio accumulo di prione anomalo; si aggiunge la gliosi talamica e, a differenza di quanto accade nella sCJD, nella variante è possibile osservare una predominanza di forme deglicosilate di PrP^{Sc}. L'RM encefalo e la biopsia tonsillare sono essenziali per la diagnosi di malattia (19).

vCJD: l'entità del fenomeno, la trasmissione dell'infezione con il sangue e gli emoderivati

Nella Tabella I sono riportati i dati riguardanti la diffusione della vCJD nel mondo, aggiornati al febbraio 2010.

Country	Number of primary cases	Number of secondary cases: transmission by blood transfusion
UK	171	3
France	25	–
Spain	5	–
Ireland	4	–
USA	3	–
Netherlands	3	–
Portugal	2	–
Italy	2	–
Canada	2	–
Japan	1	–
Saudi Arabia	1	–
Taiwan	1	–

Tabella I: diffusione della VCJD nel mondo (febbraio 2010)

I dati relativi ai pazienti con vCJD, aggiornati al febbraio 2012, riportano tuttavia in UK un numero lievemente più elevato di casi registrati, 176, comprendenti sia le forme certe che le forme probabili; resta fermo il progressivo e costante declino dell'incidenza a partire dal 1999-2000; nessun paziente con vCJD è ancora in vita in UK (15).

Il numero dei soggetti con infezione asintomatica è incerto e studi basati sulla ricerca della proteina prionica nelle sezioni di tonsille e nelle appendici suggeriscono la possibilità di una prevalenza di circa 1:10.000 nella popolazione del Regno Unito (20). Ampi studi sono tuttavia in corso al fine di ottenere informazioni più dettagliate sulla prevalenza dell'accumulo di proteina prionica in ampi campioni di tessuto appendicolare rimosso chirurgicamente in UK.

Una recente analisi sul declino dell'epidemia di vCJD in UK, suggerisce l'ipotesi che la coda del declino potrebbe essere lunga, con incidenza annuale attesa di circa 11 casi di infezioni primarie, da contaminazione orale, oppure associate alla terapia trasfusionale, nei diversi genotipi PRNP (21).

vCJD: la trasmissione interumana dell'infezione

Il controllo della diffusione della BSE e della dieta umana, hanno permesso il netto declino della trasmissione interspecie dell'infezione prionica che ha accompagnato

l'epidemia di BSE. Dal punto di vista del controllo della salute pubblica, il livello di attenzione resta tuttavia alto in relazione alla possibilità di una trasmissione interumana della malattia da prione (22).

La chirurgia, inclusa quella odontoiatrica, rappresenta, al momento, una fonte puramente teorica di rischio di trasmissione della malattia.

Al contrario, l'attenzione resta alta in relazione alla sicurezza del sangue, degli emocomponenti ed emoderivati. Infatti, l'ampio impegno del sistema linforeticolare, sia nella vCJD conclamata che durante la fase preclinica della malattia (23), rende conto del potenziale rischio infettivologico del sangue e dei suoi derivati. La lunga incubazione, la cui durata è ignota nella vCJD di origine alimentare, ma che si ritiene non inferiore a 5 anni, potrebbe incrementare le possibilità di trasmissione secondaria di vCJD da fonti silenti di infezione, proprio considerata la possibilità dell'esistenza di stati persistenti di infezione subclinica (23).

Nei modelli murini è stato possibile dimostrare l'infettività prionica del sangue sia durante l'incubazione che nel corso della malattia (24), con una maggiore infettività associata ai leucociti rispetto alle emazie ed al plasma, tuttavia anch'essi potenzialmente infettivi (25). L'infettività del sangue è stata anche dimostrata nelle BSE sperimentali e nella trasmissione di *scrapie* da pecora a pecora, con rate di trasmissioni non inferiori al 40% dopo trasfusione di sangue. La trasmissione di *scrapie* è stata anche ottenuta iniettando piccole quantità di buffy-coat (26). I dati relativi all'infettività del sangue derivano esclusivamente da studi animali, con conseguente relativa incertezza dell'applicabilità nell'uomo. In generale, si ritiene che la trasmissione per via endovenosa sia 5 volte meno efficiente della trasmissione per via intracerebrale (27); dati ricavati da studi sulla pecora sembrerebbero mostrare che l'infettività del sangue potrebbe apparire a metà circa del periodo di incubazione (28).

Pubblicazioni relative alla trasmissione dell'infezione attraverso la trasfusione di sangue nell'uomo, riportano che il sangue è potenzialmente infettivo almeno 3.5 anni prima dell'esordio della malattia (22). Si ritiene che il 50% dell'infettività del sangue risieda nel plasma mentre l'altra metà risiederebbe nei leucociti; le emazie e le piastrine non sembrano aver sinora mostrato un'intrinseca capacità infettiva.

Dati osservazionali dimostrano che le trasfusioni di emazie non leucodeplete possono trasmettere la vCJD nell'uomo. Sulla base delle evidenze derivate da studi su animali, si ritiene che la leucodeplezione possa ridurre di 2 log l'infettività, permettendo tuttavia alla componente ematica leucodepleta, di mantenere ancora $2iv/ID_{50}$ di infettività (dove iv è la via di somministrazione endovenosa e $1/ID_{50}$ è la dose di riferimento che può causare infezione nel 50% degli esposti) (22). Studi sul sangue umano riportano bassi livelli di infettività del plasma, crioprecipitato, frazioni di Cohn I-III e quasi nessuna infettività delle frazioni IV e V di Cohn (29). E' verosimile che le procedure attuate per ottenere le frazioni IV e V di Cohn possano ridurre realmente l'infettività prionica. La precipitazione con etanolo e la cromatografia a scambio ionico hanno infatti dimostrato di poter ridurre le concentrazioni di PrP^{Sc} e, presumibilmente, anche l'infettività del prodotto derivante dalla lavorazione del plasma; ciò che spiega il basso rischio teorico di trasmissione della malattia da prione attraverso le immunoglobuline e l'albumina (30-31).

La trasmissione della vCJD nell'uomo attraverso la trasfusione

Il primo caso di vCJD associato ad un'emotrasfusione è stato identificato nel 2003, in un soggetto che circa 6.5 anni prima aveva ricevuto una trasfusione di globuli rossi da un donatore il quale aveva sviluppato i sintomi della vCJD 3.5 anni dopo quella donazione (32). Alcuni mesi dopo fu segnalato un secondo caso di trasmissione, in un soggetto ricevente le emazie di un donatore che aveva presentato i sintomi della vCJD 18 mesi dopo la donazione. Il paziente moriva per cause non correlate alla vCJD circa 5 anni dopo la trasfusione ed i rilievi autoptici dimostrarono la presenza del prione nella milza e nei linfonodi, ma non nell'encefalo (33). Un terzo soggetto sviluppava la malattia 6 anni dopo aver ricevuto il sangue infetto proveniente da un donatore che aveva mostrato i sintomi dell'encefalopatia spongiforme 20 mesi dopo la donazione (34). Il quarto caso di trasmissione è stato osservato 8.7 anni dopo la trasfusione di sangue donato da un soggetto che sviluppava i sintomi 17 mesi dopo la donazione (35). In ogni caso i pazienti avevano ricevuto sangue non leucodepleto.

La dimostrazione dell'infettività del sangue durante il periodo di incubazione della malattia da prione ha sollevato il problema della sicurezza del plasma entrato nella produzione dei concentrati di fattori della coagulazione destinati ai pazienti con malattie emorragiche in UK (15). La valutazione del rischio infettivologico dei prodotti ottenuti con plasmi infetti, è stata eseguita in UK da una commissione istituita dal Dipartimento di Salute (36). Quest'ultima ritenne che i 174 batches di plasma implicati nella produzione dei concentrati sospetti, potevano effettivamente contenere una sufficiente carica patogena ed i concentrati che derivarono, essere gravati da un potenziale patogeno di livello diverso. In dipendenza del tipo di concentrato e della modalità di manifattura, i plasma derivati sotto osservazione vennero distinti in: *prodotti ad alto rischio di esposizione*, quali i concentrati di fattori della coagulazione, per i quali una singola dose nell'adulto avrebbe incrementato dell'1% il rischio addizionale del paziente; *prodotti a medio rischio di esposizione*, quali le immunoglobuline, capaci di aumentare dell'1% il rischio solo a seguito di infusioni ripetute; *prodotti a basso rischio di esposizione*, come l'albumina, per la quali solo un ampio impiego di lotti provenienti dai batches di plasma implicati, avrebbero potuto incrementare il rischio da esposizione (37).

In UK si rendeva così necessario porre in essere una serie di misure precauzionali volte alla riduzione del rischio di trasmissione della vCJD attraverso il sangue e gli emoderivati (8).

I pazienti trattati in UK con concentrati di fattore di origine plasmatica, furono ritenuti a più alto rischio di sviluppo di vCJD; in particolare quelli trattati con i concentrati prodotti nel periodo 1980-2001, inclusi gli emofilici, furono informati di essere considerati a rischio di infezione vCJD (38), secondo quanto suggerito dall'organizzazione dei medici dei Centri Emofilia dell'UK (UKHCDO).

La preoccupazione relativa al rischio di trasmissione della vCJD attraverso il sangue, emocomponenti ed emoderivati, potrebbe essere realmente ridotta dalla disponibilità di un test di screening per le infezioni asintomatiche (26). Uno tra i test sperimentati, è stato effettivamente ritenuto adeguato ad identificare il prione della vCJD nel sangue di primati non umani (39), ma sono ancora in corso ricerche e conferme. Una recente pubblicazione riporta una specificità del 100% ed una sensibilità del 71% di un test per la diagnosi sul sangue di pazienti sintomatici, il quale potrebbe teoricamente essere usato per un ampio screening nei portatori asintomatici (40).

Uno studio retrospettivo sulla prevalenza dell'infezione prionica, valutata su 12.674 sezioni di tessuto tonsillare e appendicolare, ha permesso di identificare tre casi positivi e di stimare la prevalenza della vCJD in 237/1.000.000 in UK, ponendo così la premessa per l'ipotesi di stima più elevata della prevalenza dell'infezione nella popolazione generale (41-41). Una successiva valutazione basata su ulteriori dati ha tuttavia ridimensionato la stima nella popolazione normale in UK, ipotizzandola in 1:10.000 (43). Per ciò che attiene ai pazienti affetti da malattie emorragiche sottoposti a terapie sostitutive, si stima che circa 4.000 pazienti con disturbi emorragici siano stati trattati con prodotti derivati da plasma donato in UK, senza che nessun caso di vCJD sia stato riportato tra i riceventi (8).

Uno studio autoptico retrospettivo su emofilici deceduti in UK prima del 1998, ha permesso di escludere l'infezione prionica in tutti i casi esaminati (44). A partire dal 2000 uno studio prospettico di sorveglianza, volto a rilevare l'infezione prionica negli emofilici, è stato avviato dall'UKHCDO (8). Dal 2009 sette campioni di tessuto e 10 reperti autoptici sono stati valutati per la ricerca dell'infezione prionica. In un caso è stata rilevata la presenza della PrP^{Sc} nel tessuto splenico di un uomo di 73 anni, già trattato con 9.000 U di concentrato di FVIII preparato da un pool di plasmi in cui erano incluse unità di plasma provenienti da un soggetto deceduto per vCJD. Il paziente, eterozigote al codone 129, era stato anche sottoposto a 14 emotrasfusioni ma anche a diverse procedure chirurgiche ed endoscopiche; la stima della probabilità che la via di infezione fosse diversa da quella dell'emoderivato contaminato, è stata tuttavia considerata bassa (33, 45).

Conclusione

Il sangue di soggetti con infezione prionica, anche asintomatica, può infettare i riceventi, probabilmente anche attraverso il plasma ed i suoi prodotti.

La limitatezza del fenomeno nelle aree extra UK rappresenta un elemento estremamente incoraggiante.

Tuttavia, l'incertezza sull'incidenza dell'infezione asintomatica in UK, la mancanza di test validati per lo screening dell'infezione prionica e l'inefficacia delle terapie o della profilassi della vCJD, giustificano l'atteggiamento di attenzione verso le potenziali vie di trasmissione di questa nuova ed inattesa patologia.

Bibliografia

1. Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurol Psychiatr* 1920; 57: 1–18.
2. Jakob A. Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. *Med Klin* 1921;17: 372–6.
3. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136–44.
4. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001;358: 171–80.
5. Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921–5.
6. Bruce ME, Will RG, Ironside JW et al. Transmissions to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389: 498–501.
7. Smith PG, Bradley R. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *Br Med Bull* 2003;66: 185–98.
8. Millar CM, Connor N, Dolan G, Lee CA, Makris M, Wilde J, Winter M, Ironside JW, Gill N, Hill FG. Risk reduction strategies for variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission by UK plasma products and their impact on patients with inherited bleeding disorders. *Haemophilia*. 2010 Mar;16(2):305-15.
9. Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases. *Virology*. 2011 Dec 24;8:559.
10. Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 2008, 88:673-728.
11. Priola SA, Vorberg I. Molecular aspects of disease pathogenesis in the transmissible spongiform encephalopathies. *Mol Biotechnol* 2006;33:71–88.
12. Pastore A, Zagari A. A Structural Overview of the Vertebrate Prion Proteins. *Prion*. 2007 Jul-Sep;1(3):185-97.
13. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion Protein Misfolding and Disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 February ; 19(1): 14–22.
14. Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 1987; 37: 895-904.
15. Ironside JW. Variant Creutzfeldt-Jacob disease: an update. *Folia Neuropathol* 2012; 50 (1): 50-56.
16. Ward HJ, Everington D, Cousens SN, Smith-Bathgate B, Leitch M, Cooper S, Heath C, Knight RS, Smith PG, Will RG. Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Ann Neurol* 2006; 59: 111-120.
17. Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 2001; 358: 208-209.
18. Ironside JW, McCardle L, Horsburgh A, Lim Z, Head MW. Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *APMIS* 2002; 110: 79-87.
19. Lukic A, Beck J, Joiner S, Fearnley J, Sturman S, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, Mead S: Heterozygosity at polymorphic codon 219 in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2010, 67:1021-1023.
20. Clewley JP, Kelly CM, Andrews N, Vogliqi K, Mallinson G, Kaiser M, Hilton DA, Ironside JW, Edwards P, McCardle LM, Ritchie DL, Dabaghian R, Ambrose HE, Gill ON. Prevalence of disease related prion protein in anonymous tonsil specimens in Britain: cross sectional opportunistic survey. *Brit Med J* 2009; 338: b1442.
21. Garske T, Ghani AC. Uncertainty in the tail of the variant Creutzfeldt-Jakob disease epidemic in the UK. *PLoS One* 2010; 5: e15626.
22. Knight R. The risk of transmitting prion disease by blood or plasma products. *Transfusion and Apheresis Science* 43 (2010) 387–391.
23. Hilton DA, Ghani A, Conyers L, et al. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 2004;203:733–9.
24. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C et al. Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003; 43: 1687–94.
25. Holada K, Vostal JG, Therisen PW et al. Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with

- platelets. *J Virol* 2002; 76: 4649–60.
26. Ironside JW. Variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Haemophilia* (2010), 16 (Suppl. 5), 175–180.
 27. Cervenáková L. Infectivity in blood of experimental mice: vCJD update. Cambridge Healthtech Institute 8th Annual Meeting 2002 “Transmissible Spongiform Encephalopathy’s”, Washington, DC.
 28. Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, et al. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 2008;112:4739–45.
 29. Brown P, Rohwer RG, Dunstan BX et al. The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 1998; 38: 810–6.
 30. Stenland CJ, Lee DC, Petteway SR, Rubenstein R. Partitioning of human and sheep forms of the pathogenic prion protein during the purification of therapeutic proteins from human plasma. *Transfusion* 2002;42: 1497–500.
 31. Gregori L, Maring JA, MacAuley C et al. Partitioning of TSE infectivity during ethanol fractionation of human plasma. *Biologicals* 2004; 32: 1–10.
 32. Llewelyn, C.A., Hewitt, P.E., Knight, R.S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J. & Will, R.G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363, 417–421.
 33. Peden, A.H., Head, M.W., Ritchie, D.E., Bell, J.E. & Ironside, J.W. (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, 364, 527–529.
 34. Health Protection Agency (2006) New case of transfusion-associated variant CJD. *CDR Weekly*, 16, 2–3.
 35. Editorial Team (2007) Fourth case of transfusion-associated variant-CJD. *Euro Surveillance*, 12, pii. 3117. Available at <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3117>.
 36. Det Norske Veritas. Risk of Infection From Variant CJD in Blood. 2004. http://www.dnv.com/news_events/news/2004/riskofinfectionfromvariantcjdinblood.asp. Accessed 16 October 2009.
 37. Turner M, Ludlam C.A. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *British Journal of Haematology*, 2008;144, 14–23
 38. Variant CJD and blood products. Health Protection Agency 2004; http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733818681?p=1191942152861.
 39. Amorfix detects vCJD prions in blood from non-human primates. Available at http://www.analytica_world.com/news/e/108609/. (Accessed 14th May 2010).
 40. Edgeworth J, Farmer M, Sicilia A, Tavares P, Beck J, Campbell T, Lowe J, Mead S, Rudge P, Collinge J, Jackson GS. Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a bold-based assay. *Lancet* 2011; 377: 487-93.
 41. Hilton DA, Ghani A, Conyers L et al. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 2004; 203: 733–9.
 42. Clarke P, Ghani AC. Projections of the future course of the primary vCJD epidemic in the UK: inclusion of subclinical infection and the possibility of wider genetic susceptibility. *J R Soc Interface* 2005; 2: 19–31.
 43. Clewley JP, Kelly CM, Andrews N et al. Prevalence of disease related prion protein in anonymous tonsil specimens in Britain: cross sectional opportunistic survey. *BMJ* 2009; 338: b1442.
 44. Lee CA, Ironside JW, Bell JE et al. Retrospective neuropathological review of prion disease in UK haemophilic patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 909–11.
 45. Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FG, Ironside JW. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 2010; 16: 296-304.