

# Biopsia de tonsilas: valor diagnóstico y peligro iatrogénico de contagio en enfermedades priónicas

## Tonsil biopsy: diagnosis value and iatrogenic contagiousness in prion diseases

Gañet Solé JF\*  
 Whyte Orozco J\*\*  
 Cisneros Gimeno A\*  
 Díez-Ticio Ferrer T\*\*\*  
 Rodríguez Moure AA\*\*\*  
 Amigot Lázaro JA\*\*\*

\*Médicos del Centro de Especialidades Inocencio Jiménez. Area III Salud de Zaragoza.

\*\*Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.

\*\*\*Veterinarios. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

### RESUMEN

Las enfermedades priónicas están asociadas con la acumulación de una isoforma anormal de la proteína celular priónica (PrP<sup>Sc</sup>), que es el principal constituyente de los priones. Los priones se replican en tejidos linforreticulares previamente a la neuroinvasión, sugiriendo que las muestras por biopsia de esos tejidos, podría ayudar al diagnóstico precoz de esa PrP<sup>Sc</sup>. Por todo ello, resulta interesante el incidir en tres cuestiones importantes desde nuestro punto de vista. En primer lugar la validez del diagnóstico "in vivo" a partir de muestras de tonsilas (biopsia) para la determinación de la variedad de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob adquirida por consumo de carne bovina contaminada (vCJD), por otro lado la posibilidad de peligro de transmisión iatrogénica de vCJD a través de endoscopias y biopsias, y finalmente, la seguridad en la toma de muestras y en el laboratorio para el personal sanitario adscrito.

### PALABRAS CLAVE:

vCJD, encefalopatía espongiforme, tonsilas, diagnóstico, transmisión iatrogénica.

### SUMMARY

*Prion diseases are associated with the accumulation of an abnormal isoform of cellular prion protein (PrP<sup>Sc</sup>), which is the principal constituent of prions. Prions replicate in lymphoreticular tissues before neuroinvasion, suggesting that lymphoreticular biopsy samples, may allow early diagnosis by detection of PrP<sup>Sc</sup> in new variant Creutzfeldt-Jakob (vCJD). This technique have three problems: your validity for diagnostic use "in vivo", your possible cross-contamination or iatrogenic transmission of abnormal PrP<sup>Sc</sup> in the assay, and the human safety in sanitary personal.*

### KEY WORDS:

*vCJD, spongiform encephalopathy, tonsils, diagnosis, iatrogenic transmission.*

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) en humanos y todas las encefalopatías espongiformes en general en los mamíferos, han tenido en los últimos años unas importantes repercusiones en la sociedad de consumo, respecto a la seguridad alimentaria y el consumo de carne contaminada con priones como posible vía de transmisión de las citadas enfermedades tras el escándalo de la Encefalopatía Espongiforme Bovina en el Reino Unido por un lado, y por otro, consecuencia del anterior, el interés creciente por el estudio de los priones, tanto en animales como en humanos. El tema que nos ocupa se centra en las relaciones entre la nueva variedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), producida por la ingestión de carnes bovinas contaminadas con el prión y las tonsilas, como lugar de replicación previo a la colonización cerebral.

Las características clínicas diferenciales de la vCJD con la CJD esporádica (comienzo precoz, manifestaciones psiquiátricas iniciales, curso más lento y datos patológicos peculiares han permitido su separación de la CJD clásica). La edad media de los casos descritos no llega a 30 años con un rango de 14-53 años. Los pacientes presentan pródromos de alteraciones psiquiátricas (apatía, depresión, psicosis) y parestesias en extremidades durante unos 6 meses antes de que aparezca el cuadro neurológico clásico. La enfermedad suele superar el año de duración. El EEG no suele mostrar los hallazgos clásicos. Una síntesis actualizada de la sintomatología clínica y muchos datos epidemiológicos están disponibles en la red, siendo publicada por la Unidad de Vigilancia de la ECJ británica. Un rasgo distintivo de la vCJD es la afectación del sistema linforeticular (1).

Desde 1995 hasta junio de 2002, un total de 124 casos humanos de la vCJD se han diagnosticado en el Reino Unido, 6 casos en Francia y un caso en Italia, Irlanda y Estados Unidos. (2). Basándonos en los análisis publicados en abril de 2002 de esta misma referencia utilizando los modelos de crecimiento exponencial, las estimaciones del incremento anual del número de casos de vCJD en el Reino Unido desde del primer brote ha sido un 18% por año que es equivalente a doblar los casos cada 4,2 años. La importancia de este aspecto, lejos de relacionarla con el volumen total de afectados, que no es mucha, viene dada por la precariedad de medios para diagnosticar la enfermedad, por un lado por la negativa de ciertos médicos forenses a realizar sin las oportunas medidas de seguridad sus indagaciones, y por otro lado la exclusividad de un diagnóstico anatómo patológico "post mortem". Resulta interesante investigar nuevos métodos de diagnóstico más precisos, si cabe, y por supuesto "in vivo", con la consiguiente mejora y exactitud de los índices de prevalencia.

Son muchos los estudios que se han llevado a cabo para correlacionar los datos obtenidos con pruebas "in vivo" para diagnosticar la CJD en general. Además la importancia del estudio de las tonsilas viene dada por la infectividad de estos tejidos, ya que pueden ser riesgo potencial de difusión iatrogénica a través de la cirugía en estas zonas.

La vCJD tiene una patogénesis distinta y clara respecto de otra formas de enfermedades priónicas en humanos, ya que la proteína PrP<sup>Sc</sup> involucrada en esta patología es rápidamente perceptible en tejidos linforreticulares (3). Además este largo tiempo que permanece en las tonsilas (periodo subclínico de portador) se debe a que el prión necesita una adaptación al nuevo huésped, que en el caso de la vCJD es otra especie (4).

Las enfermedades priónicas están asociadas con la acumulación de la isoforma anormal de la proteína celular priónica (PrP<sup>Sc</sup>), que es el principal constituyente de los priones, los cuales se “replican” en tejidos linforreticulares, entre ellos las tonsilas, antes de la neuroinvasión, y por lo tanto su biopsia podría significar un diagnóstico precoz de la vCJD (5). La acumulación de las proteínas patológicas en tonsilas y en apéndice se ha demostrado previa a la confirmación clínica de la vCJD (6). La edad más aconsejable para establecer los patrones de investigación de proteína de la vCJD se establece entre los 25 y los 29 años de edad, ya que en el resto de los casos se ha visto la nula representatividad de los resultados obtenidos (7).

Algunos autores (8, 9) señalan que bajo determinados contextos clínicos, no siempre, si una biopsia de tonsilas es positiva para la PrP<sup>Sc</sup>, se diagnostica como vCJD la enfermedad, obviando la necesidad de tomar biopsias cerebrales.

Los métodos empleados para la determinación de PrP<sup>Sc</sup> en tonsilas son variados, entre ellos podemos citar la Inmunohistoquímica (10, 11) y el Western blot (3,12), aunque otros autores preconizan que será suficiente el utilizar para las pruebas solamente un aspirado de tejido, esto es complicado ya que para el Western blot se necesita más tejido, no obstante sería adecuado para pacientes que han sufrido una tonsilectomía.

Existe una variedad de Western blot, la paraffin-embedded tissue blot (PET-blot) que se sugiere más sensible, sobre todo en estadios precoces de la enfermedad (13).

Otros autores discrepan de lo anterior y señalan que la inmunohistoquímica y el Western-blot no son lo suficientemente sensibles para detectar PrP<sup>Sc</sup> en tejidos linfoides periféricos, por lo menos en la CJD esporádica o en la variedad familiar (14).

En algunos trabajos posteriores (15) no justifican la biopsia de tonsilas como método diagnóstico “in vivo” porque en el citado procedimiento no se ha estudiado ni la sensibilidad, ni la especificidad, ni mucho menos la seguridad, ya que puede conllevar un riesgo de hemorragia y de infección, as como el riesgo durante la anestesia. Algunos pacientes clínicamente sospechosos de la vCJD y candidatos para la biopsia de tonsilas posteriormente se recuperaron. Se necesita mayor información al respecto y estos autores siguen las recomendaciones de la OMS respecto a que este método se lleve a cabo solamente en estudios post mortem. Además un resultado negativo en biopsia tonsilar no significa que los resultados de biopsia de cerebro sean negativos y este último método ayuda a diagnosticar de una manera más perfecta cualquier desorden neurológico.

Del mismo modo, ciertas referencias (4) establecen resultados obtenidos a partir de experimentos en ratones, que puede existir una fase temprana y prolongada en la vCJD a partir de la posible transmisión desde la BSE (por consumo de carne, por ejemplo), en la que el agente etiológico de la enfermedad se está adaptando al nuevo individuo colonizado y por lo tanto durante ella no sea posible el determinar la presencia de la PrP resistente a las proteasas, lo que haría inútiles los sistemas de detección “in vivo”, como son las biopsias, además de agravar la posible diseminación del agente a partir de esos portadores asintomáticos. Los estudios todavía son escasos pero conducen a lo anteriormente citado (16).

Resultan interesantes sin embargo, los estudios de un investigador de priones (17) que habiendo investigado

3170 especímenes de tonsilas en el Reino Unido en personas sospechosas de haber contraído la vCJD, en ninguno de ellos apareció la proteína priónica.

Sea como fuere, los sistemas de detección “in vivo” de la vCJD a partir de tonsilas están ahí, y en cualquier caso resultan, si no definitivos, una ayuda y una perspectiva desde la cual podemos ahondar en posteriores técnicas potencialmente al cien por cien efectivas.

Existen formas iatrógenas clásicas de CJD, en las que la enfermedad aparece por contacto con el agente priónico (tejido nervioso u ocular) que padece clínica o subclínicamente la persona viva o muerta contagiante. El contacto entre el inóculo y el huésped humano ha de ser parenteral en los casos de CJD iatrogénico, pues el contacto a través de la piel intacta no produce la enfermedad. No hay documentado ningún caso de contagio por transfusión sanguínea en el CJD esporádico, pese a que en animales de experimentación se ha podido transmitir el CJD con productos sanguíneos por inoculación intracerebral. El período de incubación de la CJD iatrogénica varía notablemente según el modo de inoculación. La manipulación neuroquirúrgica (implante de electrodos) que conlleva contacto entre tejidos nerviosos, tiene un período de incubación más corto que los casos de infección iatrogénica por hormona de crecimiento o gonadotropina que transmitieron el prión verosímelmente de hipófisis de cadáveres afectos por vía sanguínea (1).

Tras comentar que existe una forma característica de CJD iatrogénica, podemos avanzar que a través de la biopsia de tonsilas podemos también poner de manifiesto el carácter iatrogénico de la vCJD en concreto (18). El principal riesgo radica en los enfermos que por una u otra causa se les realiza biopsia de tonsilas para diagnóstico de enfermedades infecciosas o con otras pretensiones, sin pensar que el posible enfermo está “incubando” la vCJD. Ni que decir tiene que en nuestro país esto es bastante improbable o incluso casi imposible, pero hay que tener en cuenta todas las posibilidades de posible contagio. Estos priones son resistentes a todos los sistemas convencionales de esterilización y por lo tanto lo más aconsejable sería la utilización de métodos que aseguren un solo uso del material (19), sobre todo en endoscopias y biopsias de tonsilas.

Otros estudios (20) también indican que a través de órganos transplantados también podría ser posible la transmisión de la enfermedad. Otro riesgo radica en el posible contagio a partir de hormona de crecimiento contaminada (21) o incluso como consecuencia de prácticas con material quirúrgico oftálmico contaminado (3).

#### Protección del personal sanitario frente a los priones:

Para llevar a cabo el análisis cualitativo del riesgo de “infección” en los diferentes ambientes laborales, es imprescindible en primer lugar identificar todos los factores de riesgo que pueden estar involucrados en la transmisión del agente al trabajador y/o al medio ambiente (otras personas, otros animales):

- 1.- Identidad del agente: si el agente es conocido, se puede emplear la legislación correspondiente para determinar el nivel de contención asignado.
- 2.- Transmisión del agente: la transmisión depende del tipo de material que se manipula, de la actividad que el operario desarrolla y de las posibles vías por las cuales el agente puede penetrar en el hospedador.
- 3.- Gravedad de la enfermedad: cuanto más severa sea, más alto será el nivel de contención necesario.
- 4.- Profilaxis: el riesgo de trabajar con agentes infecciosos decrece si existen medidas profilácticas efectivas.

5.- Tratamiento: se da una situación similar a la anterior cuando están disponibles tratamientos efectivos, que pueden incluir el uso de vacunas, inmunoglobulinas específicas, antibióticos y antivirales.

Una vez valorado el riesgo hay que proceder con la siguiente secuencia de actuaciones:

1ª. Prevenir la exposición al agente o sustitución por otro menos peligroso (lo que en este caso no es factible). 2ª. Seleccionar las medidas de control. 3ª. Mantenimiento y comprobaciones periódicas de esas medidas. 4ª. Proporcionar información y formación a los profesionales. 5ª. Monitorización de la exposición en el lugar del trabajo, si ello fuera posible (al tratarse de contaminantes biológicos resulta prácticamente inviable) y 6ª. Vigilancia médica de los trabajadores expuestos.

Las evaluaciones de riesgos biológicos en el ámbito laboral se deben realizar para dos amplias categorías de trabajadores: (a) cuando la exposición de los mismos no es consecuencia directa del trabajo sino que es una consecuencia secundaria (por ejemplo, un hospital, un matadero), y (b) cuando la exposición resultante procede de una intención deliberada de trabajar con los agentes biológicos (por ejemplo, un laboratorio de investigación). En principio, el alcance para la reducción y control del riesgo suele ser mucho menor en la categoría primera.

Según el Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, y más recientemente en la directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, los agentes productores de encefalopatías espongiformes transmisibles se clasifican en el grupo 3: que son aquellos que pueden causar una enfermedad grave en el hombre y presentar un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz, aunque con matices, ya que no se ha comprobado que el agente se pueda transmitir por el aire..

Según el Comité Científico Multidisciplinar para la Investigación en Encefalopatías Espongiformes Transmisibles del Ministerio de Ciencia y Tecnología, en su Opinión científica sobre Bioseguridad de 15 de enero de 2001, podemos considerar en el caso que nos ocupa los laboratorios de diagnóstico y los hospitales como ámbitos de riesgo.

En cuanto a la vCJD, en función, principalmente, de las vías por las que se ha citado que podría transmitirse la enfermedad (y que podrá hacerse extensible al resto de las EETs), el trabajo de laboratorio permitiría la supresión de algunas de las restricciones del nivel 3 de contención, como son la presión negativa, la filtración HEPA del aire de salida y, puesto que los productos químicos gaseosos que se emplean para la desinfección no afectan a los priones, de la posibilidad de que el laboratorio se pueda precintar para su desinfección; sin embargo, en este último punto, habría que añadir que debería existir un plan de actuación para el caso de que se produjera un derrame importante de material infeccioso.

Según lo que se sugiere que sea suprimido como medida de contención para CJD en laboratorios, quedarían el resto de las medidas que la legislación española obliga para los laboratorios de nivel 3:

"3. Solamente se permitirá el acceso al personal designado", "5. Procedimientos de desinfección especificados", "7. Control eficiente de vectores, por ejemplo, de roedores

e insectos", "8. Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza para el banco de trabajo o mesa de trabajo y el suelo", "9. Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes", "10. Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos" y "14. Incinerador para destrucción de animales muertos (disponible)".

Además, existen otras medidas que el R.D. 664/1997 considera como "aconsejables" para el nivel 3, que son:

"1. El lugar de trabajo se encontrará separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio", "11. Se instalará una ventanilla de observación o un dispositivo alternativo en las zonas de manera que se pueda ver a sus ocupantes" y "12. Laboratorio con equipo propio". En cuanto a la medida número 12, en el caso de la vCJD, debido a la resistencia del agente a los métodos convencionales de desinfección física y química, debería ser obligatoria para gran parte de los equipos, como pueden ser cabinas de flujo laminar, microtomos, o cualquier otro equipamiento de un laboratorio para el que una descontaminación superficial no resulte suficiente para un uso seguro posterior.

Cuando exista riesgo de exposición a materiales potencialmente infectados se aplicarán las siguientes precauciones:

- 1) Seguimiento estricto de unas prácticas de trabajo seguras y un cuidado especial en minimizar el uso de instrumental, utensilios y equipos que puedan ocasionar cortes, abrasiones o heridas punzantes.
- 2) Cuando sea inevitable el empleo de estos equipos, emplear las prendas de protección personal necesarias, como guantes de malla metálica al utilizar determinado instrumental en una autopsia o cuchillos en los mataderos.
- 3) Cubrir todas las heridas, abrasiones o lesiones de la piel existentes con materiales impermeables al agua.
- 4) Si se produjera algún corte o pinchazo, forzar el sangrado de la herida, luego lavar de manera cuidadosa con agua y jabón y vendarla con material sanitario impermeable.
- 5) Emplear protección de la cara (principalmente de ojos y boca) cuando exista el riesgo de salpicaduras; esta protección se puede ofrecer mediante una pantalla de protección facial.
- 6) Si ocurriera una salpicadura en los ojos o la cara, inmediatamente lavar con abundante agua.
- 7) Tomar las medidas necesarias para evitar la creación de aerosoles y polvo.
- 8) Lavarse las manos y la piel de otras zonas expuestas, antes de comer, beber, tomar alguna medicación, usar el teléfono o ir al aseo.
- 9) Limpiar las zonas y el equipo contaminados con agua caliente y detergente de manera regular.
- 10) Limpiar cuidadosamente las prendas de protección personal después de ser empleadas y almacenarlas en lugar separado del resto de la ropa; una alternativa es el uso de ropa desechable.

De acuerdo a la información científica existente, los priones se destruyen mediante incineración.

También se puede inactivar el prión patógeno mediante un tratamiento térmico a 133° C, a 3 bares de presión y durante un tiempo ininterrumpido de 20 minutos. Este tratamiento asegura que al menos se reduce a la milésima parte.

En base a estos datos, son métodos adecuados de eliminación de material que pudieran estar contaminados con el agente patógeno de la vCJD, los que a continuación se detallan:

- Incineración directa a temperatura no inferior a 850° durante al menos 2 segundos.
- Incineración de las harinas resultantes de la transformación previa de la materia prima, en instalaciones tales como centrales eléctricas, cementeras o incineradoras..
- Transformación en condiciones de 133° / 3 bares / 20 mn, seguido de eliminación en vertederos controlados.

El mismo informe sobre bioseguridad establece que hasta el momento sólo se han identificado como métodos eficaces la desinfección química con hipoclorito sódico con un 2% de cloro libre, aplicado durante una hora, hidróxido sódico 2M, durante una hora, ácido fórmico al 96% durante una hora (sólo para muestras histológicas) o autoclave de vapor durante 18 minutos a una temperatura de 134-137°C. Además, por supuesto, de la incineración. En el caso de instrumental quirúrgico también podrían estar indicados los ultrasonidos como método previo a la esterilización. Por lo que se refiere a los laboratorios de anatomía patológica veterinaria, la Veterinary Laboratories Agency británica, recomienda el hipoclorito sódico al 20%.

Sistemas, que en la mayoría de los casos no disponemos de rutina en consultas, hospitales y centros clínicos, lo que conlleva a utilizar en cualquier caso material de un solo uso (12, 22), ya que aunque la posibilidad de paso de la proteína al medio ambiente no se vea dificultada, ese paso no sea directamente inoculado a otro paciente sano. El último autor no obstante propone como sistema de esterilización del material en autoclave a 132°C durante 5 horas o bien utilizar NaOH 2N durante 12 horas.

Como conclusión podemos resaltar que, aunque la probabilidad de que en nuestro contexto haya personas incubando la vCJD es muy remota, la posibilidad de contagio iatrogénico a partir de tejidos tonsilares está ahí y debemos estar a la defensiva, ya que los viajes internacionales y los intercambios de personal están a la orden del día en la sociedad actual y no nos pueden coger de improviso, aunque creemos que las medidas a tomar son el conocimiento de los priones en primer lugar y en segundo lugar, el sentido común que como profesionales debemos de poner en nuestro trabajo cotidiano sin alarmismos.

## Bibliografía

1. Bermejo F, Muñoz D. Encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) o enfermedades producidas por priones. *Rev Adm San* 2001; V(17):27-44.
2. Web de Centers of Diseases Control. Atlanta. Georgia. USA. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
3. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001 Jul 21;358(9277):171-180.
4. Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 2001 Nov;75(21):10106-10112.
5. Collins S, Boyd A, Fletcher A, Gonzales MF, McLean CA, Masters CL. Recent advances in the pre-mortem diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Neurosci* 2000 May;7(3):195-202.
6. Grandien M, Wahren B. A review of the current research on prions. The evidence suggests the possibility

- of transmission of the mad cow disease to humans. *Lakartidningen* 1998 Nov 25;95(48):5499-500, 5503-5.
7. Ghani AC, Donnelly CA, Ferguson NM, Anderson RM. Assessment of the prevalence of vCJD through testing tonsils and appendices for abnormal prion protein. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2000 Jan 7;267(1438):23-29.
  8. Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al-Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL, Collinge J. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999 Jan 16;353(9148):183-189.
  9. Collinge J, Rossor MN, Thomas D, Frosh A, Tolley N. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum. Tonsil biopsy helps diagnose new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *BMJ* 1998 Aug 15;317(7156):472-473.
  10. Ironside JW, Hilton DA, Ghani A, Johnston NJ, Conyers L, McCardle LM, Best D. Retrospective study of prion-protein accumulation in tonsil and appendix tissues. *Lancet* 2000 May 13;355(9216):1693-1694.
  11. Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Penney M, Ritchie D, Ironside JW. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *BMJ* 2002 Sep 21;325(7365):633-634.
  12. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997 Jan 11;349(9045):99-100.
  13. Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA. The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 2000 Jan;156(1):51-56.
  14. Kawashima T, Furukawa H, Doh-ura K, Iwaki T. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997 Jul 5;350(9070):68-69.
  15. Zeidler M, Knight R, Stewart G, Ironside JW, Will RG, Green AJ, Pocchiari M. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Routine tonsil biopsy for diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease is not justified. *BMJ* 1999 Feb 20;318(7182):538.
  16. Cooper JD, Bird SM, de Angelis D. Prevalence of detectable abnormal prion protein in persons incubating vCJD: plausible incubation periods and cautious inference. *J Epidemiol Biostat* 2000;5(4):209-219.
  17. Dobson R. First results of vCJD survey show no signs of prion. *BMJ* 2000 May 6;320(7244):1226.
  18. Frosh A. Prions and the ENT surgeon. *J Laryngol Otol* 1999 Dec;113(12):1064-1067.
  19. Axon AT, Beilenhoff U, Bramble MG, Ghosh S, Kruse A, McDonnell GE, Neumann C, Rey JF, Spencer K. Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy* 2001 Dec;33(12):1070-1080.
  20. Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extra-neural tissues. *Lancet* 2001 Jul 21;358(9277):208-209.
  21. Foster PR. Prions and blood products. *Ann Med* 2000 Oct;32(7):501-513.
  22. Arya SC. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997 May 3;349(9061):1322-1323.