

Creutzfeldt-Jakob hastalığı ayırıcı tanısında BOS testleri

P. Sanchez-Juan, MD; A. Green, PhD; A. Ladogana, MD ; N. Cuadrado-Corrales, PhD;
R. Sánchez-Valle, MD; E. Mitrová, MD; K. Stoeck, MD; T. Sklaviadis, PhD; J. Kulczycki PhD; K. Hess MD;
M. Bodemer; D. Slivarichová, MSc; A. Saiz, MD; M. Calero, PhD; L. Ingrosso, PhD; R. Knight, FRCP(E);
A.C.J.W. Janssens, PhD; C.M. van Duijn, PhD ve I. Zerr, MD

Özet—Amaç: Creutzfeldt-Jakob hastalarının BOS'larında farklı beyin kaynaklı proteinlerin (14-3-3, Tau, nöron spesifik enolaz [NSE] ve S100b) tanınabilirlik ve özgüllüğünü analiz etmek ve bu parametreleri modifiye edebilecek biyolojik faktörleri analiz etmek. **Metotlar:** Sporadik, genetik, iatrojenik ve varyant CJD'li 1859 hasta ve 1117 kontrolden elde edilen BOS'da 14-3-3, Tau, NSE ve S100b bakıldı. **Sonuçlar:** En yüksek duyarlılığa sporadik CJD'de 14-3-3 proteininde ulaşıldı (%85-86) ve, 14-3-3 ve Tau, S100b veya NSE'nin birlikte bakılması duyarlılığı %93'ün üzerine çıkardı. Çok değişkenli bir analizde hastalık süresi en kısa olan, yaşı 40'ın üzerinde olan ve prion protein geni kodon 129'da homozigosite mevcut hastalarda tüm testlerin en yüksek duyarlılıkta olduğu görüldü. Lomber ponksiyonu tekrarlanan hasta grubunda ikinci bir test tanınabilirlik daha da yükseltti. **Yorum:** Creutzfeldt-Jakob hastalığı şüphesi bulunan hastalarda BOS'da beyin kaynaklı proteinlerin yüksek bulunması değerli bir tanı testidir. İkinci bir lomber ponksiyon, ilk testin negatif olduğu atipik klinik süreçli hastalarda değerli olabilir.

NEUROLOGY 2006;67:637-643

Creutzfeldt-Jakob hastalığının (CJD) klinik tanısında BOS'da 14-3-3 proteinin tespiti önemlidir.¹⁻⁵ 14-3-3 proteini sporadik CJD (sCJD) olgularının %95'inde yükselmektedir, ancak (iatrojenik, varyant ve genetik CJD gibi) diğer tip CJD'lerde duyarlılığı düşüktür.⁵⁻⁷ 14-3-3'ün duyarlılığı farklı sCJD fenotiplerinde de farklıdır.⁸⁻¹⁴ Diğer proteinler de test edilmiştir: nöron spesifik enolaz (NSE), Tau ve fosforile Tau ve astrositik (S100b) proteinler, prostaglandinler, intelökinler ve A β ₁₋₄₂.^{11,15-22}

Çeşitli belirteçlerin kombine edilmesi klinik tanının du-

yarlılık ve özgüllüğünü artırabilir.^{1,5,14,21,23-26} CJD tanısının erken ve spesifik konulmasına mantıklı bir yaklaşım oluşturmak gerekir. Bir biyokimyasal test paneli kullanmanın mantığı araştırılmış değildir.

Çalışmamızı, farklı TSE (Bulaştırılabilir Spongiform Ensefalopati) formlarında BOS'da beyin kökenli proteinlerin duyarlılığı ve özgüllüğü açısından analizine ve seçilmiş hasta özelliklerinin bu parametreler üzerindeki etkilerine yönelik yaptık.

Metotlar. *Hastalar.* Çalışma AB destekli bir çok uluslu çalışmanın bir parçası olarak gerçekleştirildi. Hastalar rutin klinik tanı ve takip sırasında BOS 14-3-3 proteinine bakılmak üzere ulusal takip ünitelerine sevk edildiler.

Katılan ülkelerde örnekler BOS 14-3-3 proteininin tespiti amacı ile

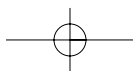
Bu makale ile ilgili ek materyal Neurology Web sitesinden bulunabilir. Bu makale için bağlantıyı bulmak için www.neurology.org adresine gidiniz ve 22 Ağustos sayısı için içindekiler listesini açınız.

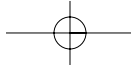
Epidemiyoloji & Biyoistatistik Bölümü (P.S.-J., C.M.v.D.) ve Halk Sağlığı (A.C.J.W.J.), Erasmus Üniversitesi Tıp Merkezi Rotterdam, Hollanda; Ulusal CSF Gözetim Ünitesi (A.G., R.K.), Edinburg Üniversitesi, Birleşik Krallık; Istituto Speriore di Sanita (A.L., L.I.), Viroloji Laboratuvarı, Roma, İtalya; Salud Carlos III (N.C.-C., M.C.), Madrid, İspanya; Provincial de Barcelona Hastane Kliniği, (R.S.-V., A.S.), İspanya; Koruyucu ve Klinik Tıp Enstitüsü (E.M., D.S.), Bratislava, Slovakia; İnsan Prion Hastalıkları Ulusal Referans Merkezi, (NRPE) (KS), Nöropatoloji Enstitüsü, Zurich, İsviçre; Farmakoloji Laboratuvarı (T.S), Farmasötik Bilimler, Sağlık Bilimleri Okulu, Aristotle Thessaloniki Üniversitesi, Yunanistan; Psikiyatri ve Nöroloji Enstitüsü (J.K.), 1.Nöroloji Bölümü, Warsaw, Polonya; Nöroloji Bölümü (K.H.), Zürih Üniversite Hastanesi ve Bulaştırılabilir Spongiform Ensefalopati Ulusal Referans Merkezi (M.B., I.Z.), Nöroloji Bölümü, George-August Üniversitesi Göttingen, Almanya.

Ulusal çalışmalar Yunanistan'da KEEL (Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Merkezi) sayesinde, Yunanistan Sağlık Bakanlığı tarafından desteklenmiştir. İtalya'da Istituto Superiore di Sanita ve Sağlık Bakanlığı, Hollanda'da, Hollanda Sağlık, Sosyal Yardım ve Spor Bakanlığı, Slovakya'da Sağlık ve Avrupa Komisyonu tarafından (SEEC-CJD projesi), İspanya da Bilim ve Teknoloji Bakanlığı, (MCyT EET 2001/2216) Sağlık ve Tüketim Bakanlığı, DGVI 1312/04-1 bursuyla, İsviçre'de Sağlık Bakım Merkezi, Bern (NRPE-BAG anlaşması n° 03.001297 ve n° 04.002363), ABD'de Sağlık Birimi ve İskoç Sağlık Home Office Bölümü ve Bundesministerium für Gesundheit ve Soziale Sicherung (BGMS) (GZ: 325-4471-02/15) ve Bundesministerium für Gesundheit und Forschung (BMBF) (KZ: 0312720 ve 01G10301 -I.Z). Raquel Sanchez-Valle'ye Salud Carlos III Enstitüsü tarafından verilen doktora sonrası bursu (ISCIII, Madrid, İspanya). Pascual Sanches Juan postMIR bursu ile, Wenceslao Lopez Albo'ya IFIMAV Fundacion Publica Marques de Valdecilla bursu ile. İşbirliği yapılan diğer çalışmada Avrupa Komisyonu (EC) (QLG3-CT-2002-81606, Yardımcı koordinatör: I. Zerr) tarafından desteklenmiştir.

26 Temmuz 2005'de alındı. Son hali ile 27 Nisan 2006'da kabul edildi.

Adres ve yeniden baskı istekleri için Dr. Inga Zerr, National Reference Center for Transmissible Spongiform Encephalopathies, Department of Neurology, Georg-August-University Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Germany; e-mail: IngaZer@med.uni-goettingen.de





belli laboratuarlara gönderildi. Tüm ülkeler klinik CJD veya ilişkili hastalık şüphesi olan hastaların klinik ve nöropatolojik verilerini topladı. Karşılık gelen tanımlar takipte konuldu. Her bir laboratuvarın sağladığı veri ve örnekler aşağıdadır: İspanya 906 (toplamın %30'u), Almanya 886 (%29), İtalya 523 (%18), İngiltere 443 (%15), İsviçre 164 (%5.5), Polonya 39 (%1.3), Yunanistan 20 (%0.7), Slovakya 15 (%0.5).

Başlangıç yaşı, cinsiyet, hastalık süresi, lomber ponksiyon (LP) yapıma zamanı, PRNP kodon 129 genotipi, PrP^{Sc} izotipi, son klinik ve nöropatolojik tanı gibi klinik veriler her bir merkez tarafınca toplandı. Bir veri tabanı oluşturuldu. Bu veri tabanında CJD'li hastalardan ve kontrollerden alınmış 2976 örnekte BOS belirteçleri ve hasta özellikleri kayıt edildi. Tüm katılan merkezlerde CJD ve farklı CJD alt tipleri tanısı kesin, uluslar arası kabul görmüş ölçütlere²⁶⁻²⁸ göre konuldu. Tüm katılımcı ülkeler EURO-CJD Takip ağına üyeydi ve benzer takip metotları kullanılmıştı. Kontrol hastalar CJD veya diğer prion hastalığı olmadığı ispatlanan kişiler arasından seçildi, ancak kesin alternatif tanı koymak her zaman mümkün olmadı. Kontrol (non-CJD) hastalarda tanı, (mümkün olduğunda) nöropatoloji ve klinik takip bilgileri ile konuldu. İleri analiz için kontrol hastalar aşağıdaki gruplara ayrıldı: nörodejeneratif, inflamatuvar, tümör ilişkili, iskemik, psikiyatrik, metabolik ve diğer. Sadece kesin klinik veya nörolojik tanısı mevcut kontrol hastalar analize dâhil edildi ve sonuçta 251 kontrol hasta dışlandı.

BOS, LP ile alındı ve testler her bir laboratuvarında aşağıda ayrıntılı olarak anlatılan ortak standartlara uygun gerçekleştirildi. Sonuçlar veri tabanına girildi.

BOS testleri. Veri alınımın ilk evrelerinde katılımcı laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılabilirliğinden emin olabilmek için bir ring testi gerçekleştirildi.

Seçilmiş 10 BOS örneği tüm katılımcı laboratuarlara yollandı. Bu 10 BOS örneği CJD'li, inflamatuvar hastalığı olan, AD hastalarından alınmış ve kanlı BOS idi. Orijinal 14-3-3 Western blot filmleri tarandı, katılımcılardan Western blotun görsel analizini (negatif, zayıf pozitif, pozitif) yapımları istendi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Farklı merkezlerin sonuçların sınıflandırılmasında uzlaşma içinde oldukları görüldü ve duyarlılık ve özgüllük açısından diğerlerinden ayrılan bir merkez çıkmadı. Çoğu olguda anti-14-3-3β poliklonal tavşan antikoru (SC-629, Santa Cruz Biotechnology) primer tespit antikoru olarak kullanıldı. Farklı laboratuvarlarda 14-3-3 tespit protokollerinde mevcut küçük farklılıklar test sonuçlarını etkilemedi. LP ile 14-3-3 testi arasında ortanca BOS depolama süresi 8 gün ve hastalık başlangıcı ile LP arasındaki ortalama süre de 4 aydı.

Genelde, toplam 1211 TSE hastasından (106'sı tekrar LP'lerden olmak üzere) elde edilen 2,934 örnekte 14-3-3 testi yapıldı. Bu grup, farklı bulaştırılabilir spongiform ensefalopati (TSE) hastalarından (1,531'i sCJD hastalarından olmak üzere) elde edilmiş 1,826 ve kontrollerden elde edilmiş 1,108 örnek içermekteydi.

(819'u sCJD olmak üzere) 1211 TSE hastasından ve 220 kontrol hastadan elde edilmiş 1,295 örnekte Tau protein düzeylerine bakıldı. Tau konsantrasyonları ELISA (Innotest hTau-Ag, Innogenetics, Ghent, Belçika) ile ölçüldü. İleri hesaplamalar için daha önce belirlenmiş kesme değeri olan 1,300 pg/ml alındı.²³

TSE hastalarından elde edilmiş (589'u CJD olmak üzere) 966 ve kontrol hastalardan elde edilmiş 162 örnekte S100b protein düzeyleri bakıldı. S100b konsantrasyonları enzim bağlı immünosorbent aseylerle ölçüldü. Testler üç merkezde (İngiltere, İspanya ve Almanya) farklı tespit metotları ile gerçekleştirildi. Beşyüzotuzüç örnekte düzeyler ticari test kitleri (Byk Sangtec) ile belirlenirken, diğer 433 örnekte örnekler in-house ELISA ile tespit edildi.²⁹ Metodolojiler arasında testin duyarlılık ve özgüllüğü farklı olduğundan, her bir test için farklı kesme noktaları (Byk Sangtec, 4.2 ng/ml, in-house 0.5 ng/ml) kullandık.

TSE hastalarından elde edilmiş (517'si sCJD olmak üzere) 748 ve kontrol hastalardan elde edilmiş 113 örnekte NSE protein düzeylerine bakıldı. NSE konsantrasyonları enzime bağlı immünosorbisyon yöntemiyle ölçüldü. Üçyüzlüidokuz örnekte Hoffman LaRoche (Cobas-Core NSE EIA kit) testi, 312 örnekte Delfia NSE (Wallac ADL GmbH, Freiburg, Almanya) ve 77 örnekte de LIAISON NSE (DiaSorin S.p.A. Saluggia, İtalya) kullanıldı. Test duyarlılık ve özgüllüğü, uygulanan metodolojilerle farklılaşmıyorsa, kullanılan her bir testte farklı kesme değerleri kullanıldı (Hoffman LaRoche 35 ng/ml, Wallach 25 ng/ml ve Byk Sangtec 25 ng/ml).^{1,30}

İstatistiksel analizler. sCJD ve kontrol hastalar için tanımlayıcı istatis-

tikler kullanıldı: kategorik ve devamlı değişkenler için χ^2 ve nonparametrik Mann-Whitney testi kullanıldı. Genel TSE ve kontrol hasta toplumu için her bir BOS belirtecinin duyarlılık ve özgüllüğü hesaplandı; BOS belirteçleri arasındaki bu prediktif karakteristik farklılıkların test etmek üzere χ^2 kullanıldı. Yine, her bir TSE alt tipi için pozitif sonuç oranları hesaplandı. sCJD hastalarında gerçekleştirilen farklı testlerin duyarlılığı üzerinde klinik olarak bağlantılı hasta karakteristikleri setinin etkisini değerlendirmek üzere multipl lojistik regresyon modeli oluşturduk. Modelimize aşağıdaki özellikleri ekledik: hastalık süresi (ay), başlangıç yaşı (yıl), LP yapıldığında hastalığın evresi (hastalık total süresinin ilk, ikinci veya üçüncü üçte biri) ve PRNP kodon 129 genotipi; örneğin alındığı ülke ve hastanın cinsiyeti de kovaryat olarak eklendi.

Başlangıç yaşı klinik olarak anlamlı dört yaş grubuna göre kategorize edildi, 40 yaşından genç hastalar referans grup olarak alındı. Hastalık süresi ortancanın bir kesme noktası olarak kullanılması ile kategorize edildi; hastalarımızı iki gruba ayırdık (kısa veya uzun süreli). PRNP kodon 129 genotipi modele iki dummy değişken kullanılarak eklendi, MV grubu referans olarak kullanıldı. Testlerin duyarlılığı üzerinde PRNP kodon 129 genotipi ve PrP^{Sc} izotipinin cinsiyet ve ülkeye göre düzeltilmiş etkisi diğer bir lojistik regresyon modelinde değerlendirildi, her ne kadar geri kalan belirteç sayısı az olsa da sadece 14-3-3 için analiz yapıldı. Düzeltilmiş OR ve %95 GA üretildi.

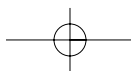
Sonuçlar. *Hasta karakteristikleri.* Veri tabanında 2,976 örnekte bakılmış farklı proteinlerin detaylı BOS düzey verileri mevcuttu. Örneklerin büyük kısmı (n = 1,859) farklı TSE formlarına aitti. sCJD olgularının %49'unda, genetik CJD olgularının %47'sinde (gCJD), iatrojenik CJD, vCJD'nin %61'inde, FFI'nin %76'sında ve bir GSS hastasında kesin nöropatolojik tanı konuldu. Başka tanı mevcut hastalardan da 1117 örnek alındı. Tanıların büyük kısmı nörodejeneratif hastalık grubuna aitti (n = 604; toplam örneklerin %20'si). İkinci en büyük grup inflamatuvar SSS hastalığı grubuydu (n = 213, %7). TSE örneklerinin büyük kısmı sCJD hastalarından elde edilmişti (n = 1552, toplam grubun %52'si ve TSE grubunun %85'i). Bu TSE hasta grubunda da postmortem oran en yüksek düzeydeydi (%49.9, %14.3-75.9). Kontrol hastalarda ise postmortem oran düşüktü (toplam grubun %12.4'ü) ve alt gruplar arasında önemli ölçüde değişmekteydi (nörodejeneratif hastalıkların %11.4'ü, iskemik %26.9'u ve paraneoplastik veya tümör ilişkili grubun %39.7'si).

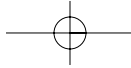
NSE = nöron spesifik enolaz; sCJD = sporatic Creutzfeldt-Jakob hastalığı; iCJD = iatrojenik CJD; vCJD = variant CJD; gCJD = CJD genetiği sCJD'li hasta grubu ve kontrol hastalar arasında cinsiyet (%53 ve %49 kadın) ve başlangıç yaşı (olgularda 67 yaş, 19-97 arası, kontrollerde 66 yaş, 5-92 arası) açısından anlamlı bir fark yoktu.

1.319 olguda (1,069'u sCJD ve 250'si kontrol olmak üzere) PRNP kodon 129 genotipi verisi mevcuttu. sCJD hastalarının büyük kısmı metionin (n = 656, %61.4) veya valin (n = 175, %16.4) için homozigot ve sadece %22.2'si heterozigottu. Kontrollerin ise %47'si (n = 118) metionin ve %12'si (n = 29) valin için homozigot ve %41'i (n = 103) heterozigottu.

PrP^{Sc} izotipi 251 sCJD olgusunda tespit edildi ki bunların 175'inde izotip 1 ve 76'sında tip 2A vardı.

Tanıda BOS belirteçleri. İlk olarak, tüm TSE formlarında her bir belirtecin duyarlılık ve özgüllüğünü hesapladık (tablo 1). 14-3-3 dışında tüm belirteçler için nicel düzeylerle çalıştık, 14-3-3 test sonucu var ya da yok olarak belirtildi. 14-3-3 testinde karşılaştığımız metodolojik problem soluk



**Tablo 1** Hastalık alt tiplerine göre duyarlılık (pozitif/toplam)

| Hastalık alttipi | 14-3-3* | 95% CI | Tau† | %95 GA | S100b‡ | %95 GA | NSE‡ | %95 GA |
|------------------|------------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
| sCJD | 85 (1,240/1,457) | (83, 87) | 86 (704/819) | (83, 88) | 82 (483/589) | (79, 85) | 73 (379/517) | (69, 77) |
| iCJD | 75 (15/20) | (51, 90) | 53 (8/15) | (27, 78) | 81 (13/16) | (54, 95) | 44 (4/9) | (15, 77) |
| vCJD | 40 (37/93) | (30, 50) | 24 (21/86) | (16, 35) | 62 (55/88) | (51, 72) | 24 (6/25) | (10, 45) |
| gCJD | 78 (109/139) | (70, 85) | 82 (47/57) | (70, 91) | 82 (28/34) | (65, 93) | 60 (21/35) | (42, 76) |
| GSS | 0 (0/7) | (0, 44) | 50 (1/2) | (3, 97) | 100 (1/1) | (5, 100) | 0 (0/2) | (0, 80) |
| FFI | 9 (2/23) | (1, 29) | 0 (0/12) | (0, 30) | 22 (2/9) | (4, 60) | 0 (0/10) | (0, 34) |
| Toplam | 81 (1,403/1,739) | (79, 82) | 79 (781/991) | (76, 81) | 79 (582/737) | (76, 82) | 69 (410/598) | (65, 72) |

* İz sonuç negatif kabul edildi.

† Tau proteini için kesme noktası 1,300 pg/ml; S100b'de Byk-Sangtec kiti için 4.2 ng/ml ve İngiltere'de kullanılan in-house kiti için 0.5 ng/ml; NSE'de Hoffman La Roche kiti için 35 ng/ml ve Byk-Diasorin, Byk-Sangtec ve Wallac kitleri için 25 ng/ml.

NSE = nöron spesifik enolaz; sCJD = sporatic Creutzfeldt-Jakob hastalığı; iCJD = iatrojenik CJD; vCJD = variant CJD; gCJD = CJD genetiği

immünoreaktif bantlar olabilmesiydi ki bunlar zayıf pozitif olarak değerlendirildi. Bu nedenle, 14-3-3 testinin duyarlılık ve özgüllüğünü üç farklı stratejiye göre (örneğin, 1: [iz bantları dışlayarak] sadece kesin sonuçları göz önünde bulundurmak. Bu kurala uyarak TSE hastalarında genel test duyarlılığını %84.5 (sCJD'de %88.8) ve özgüllüğü %83.6 olarak hesapladık, ancak 79 olguyu (%4.2) kaybettik. 2:) iz bantları pozitif kabul ederek veya 3:) iz bantları negatif kabul ederek) hesapladık ki hızlı ilerleyen demanslarda klinik tanının formülasyonunda en yararlı hangisidir bilelim. İkinci yaklaşımla 14-3-3 genel test duyarlılığı %85.2 (sCJD'de %89.3) ve özgüllüğü %79.3 çıktı. Üçüncü strateji ile genel duyarlılık %80.7'ye (sCJD'de %85.1) düşerken özgüllük ise yükseldi (%79.2'den 84.5'e olmak üzere %5.3'lük artış) çıktı ($p < 0.01$). Çalışmamızın asıl amacı hızlı ilerleyici demans ayırıcı tanısı bağlamında klinik CJD tanısını en iyi şekilde koyduracak bir strateji geliştirmek olduğundan, sonraki analizlerimizde üçüncü stratejiyi takip ettik (tablo 1).

TSE alt tiplerinde 14-3-3 duyarlılığı değişmekteydi (tablo 1). Duyarlılık sCJD'de %85, iatrojenik CJD'de %75 ve gCJD'de %78'di. Varyant CJD'de ise (vCJD) hastaların sadece %40'ında 14-3-3 düzeyi yükselmişti.

Tau düzeylerinde de benzer bir dağılım izledik (tablo 1). Duyarlılık sCJD hasta grubunda en yüksek düzeydeydi, genetik ve iatrojenik olgular onu takip ediyordu. sCJD için önerilen 1300 pg/ml'lik kesme değeri ile vCJD'de Tau duyarlılığı %24'dü. Ancak 500 pg/ml gibi farklı bir kesme değeri ile⁵ duyarlılık %86'ya çıktı.

sCJD olgularından elde edilen örneklerin %82'sinde S100b düzeyi yüksekti. Diğer TSE formlarında diğer belirteçlere göre S100b daha sık yükselmiş bulundu (tablo 1). Ancak, S100b'nin duyarlılığı yüksek olduğu halde özgüllüğü düşüktü (%76).

sCJD'de en düşük duyarlılığa sahip belirteç NSE idi (%73), diğer yandan aynı belirtecin özgüllüğü ise en yüksek düzeydeydi (%95). Yine, iatrojenik ve gCJD'de duyarlılık daha düşüktü (%44 ve 60). NSE duyarlılığı vCJD'de en düşüktü (%24). Hiçbir GSS ve FFI hastasında bu test pozitif gelmemişti.

Her bir belirteç için duyarlılık düzeyi tespit edildikten

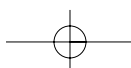
sonra alt gruplarda yanlış pozitif oranlarını analiz ettik (*Neurology* web sitesi www.neurology.org'da mevcut tablo E-1). İnflamatuvar, iskemik ve neoplastik beyin hastalıklarında yanlış pozitiflik oranı yüksek çıktı. Genelde bu sorunlar rutin BOS testleri ve beyin görüntülemesi ile dışlanabilir. CJD ile nörodejeneratif hastalıklar alt grubunu karşılaştırdığımızda duyarlılık yüksek çıkmış olsa da (14-3-3 için %90 ve Tau için %89), ayırıcı tanıdı esas problem çıkaran hastalıklar diğer nörodejeneratif hastalıklardır.

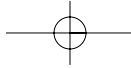
Hiçbir belirteç tek başına farklı TSE formlarını birbirinden ayırt edemedi (veriler gösterilmedi).

Bir sonraki adımda her bir belirtecin her bir sCJD alt tipi için değerini belirlemeye çalıştık. Sonuçlar tablo 2'de mevcuttur. Gördük ki tüm belirteçler Prp^{Sc} izotip 2A'da izotip 1'e göre daha düşük duyarlılığa sahipti. En düşük duyarlılık MV2 alt tipinde tespit edildi. Diğer bir çaba da sCJD hastalarını önceden önerilen tanımlar⁹ doğrultusunda klasik ve atipik alt tiplerine ayırabilmektir. Tüm belirteçler klasik alt tipinde daha duyarlı çıktı (tablo 2).

Hasta karakteristiklerinin test duyarlılık ve özgüllüğü üzerindeki etkileri. Tek değişkenli analizde çalışılan hasta karakteristiklerinden biri dışında (tek istisna LP yapıma sırasında hastalık evresi), hastalık süresi, *PRNP* kodon 129 genotipi ve başlangıç yaşı gibi diğerleri sCJD hastalarında tüm testlerin duyarlılığını anlamlı ölçüde etkiledi.

Çok değişkenli analizde tüm bu karakteristiklere kovaryatlar eklediğimizde anlamlılık devam etti. LP yapıma sırasında hastalık evresini geri kalan değişkenler için düzelterek analiz ettiğimizde, geç evrelerde 14-3-3 duyarlılığı yükselme eğilimi gösterdi: ilk evrede %87.6, ikinci evrede %88 ve son evrede %91.3 ($p = 0.07$) ve bu patern tüm belirteçler için aynıydı. Kırk yaşın altındaki hastalarda tüm testler yaşlı hastalara göre daha az duyarlıydı. Hastalık süresi 6 aydan uzun hastalarda tüm testler daha kısa süreli (ve daha agresif) hastalığa göre anlamlı derecede düşük duyarlılık sergiledi. Son olarak, *PRNP* kodon 129 genotipi için heterozigot hastalarda test duyarlılığı homozigot olanlara göre çok daha düşük çıktı (tablo E-2). Farklı bir bakış açısı ile, sCJD hastalarında pozitif bir 14-3-3 testi öngörülebilir olasılığı, *PRNP* kodon 129 genotipi için homozigot,



**Tablo 2** Sporadik CJD alt tiplerinde test duyarlılığı

| Alt tip | 14-3-3 | | Tau | | S100b | | NSE | |
|-----------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|
| | +/n | Duyarlılık | +/n | Duyarlılık | +/n | Duyarlılık | +/n | Duyarlılık |
| MM1 | 129/140 | 92 | 92/94 | 98 | 74/81 | 91 | 48/64 | 75 |
| MV1 | 10/11 | 91 | 4/6 | 67 | 3/5 | 60 | 5/5 | 100 |
| VV1 | 6/6 | 100 | 4/5 | 80 | 2/6 | 33 | 2/4 | 50 |
| MM2 | 7/9 | 78 | 6/7 | 86 | 5/5 | 100 | 2/3 | 67 |
| MV2 | 20/31 | 65 | 10/19 | 53 | 13/20 | 65 | 6/12 | 50 |
| VV2 | 27/30 | 90 | 14/16 | 88 | 13/13 | 100 | 10/11 | 91 |
| Klasik* | 411/443 | 93 | 271/290 | 93 | 187/210 | 89 | 163/206 | 79 |
| Klasik olmayan† | 350/410 | 85 | 245/294 | 83 | 180/231 | 78 | 150/220 | 68 |

* Sporadik CJD, kodon 129 genotip MM veya MV ve hastalık süresi 8 aydan kısa

† Sporadik CJD, kodon 129 genotip VV (tüm) veya kodon 129 genotip MM veya MV ve hastalık süresi 8 aydan uzun.

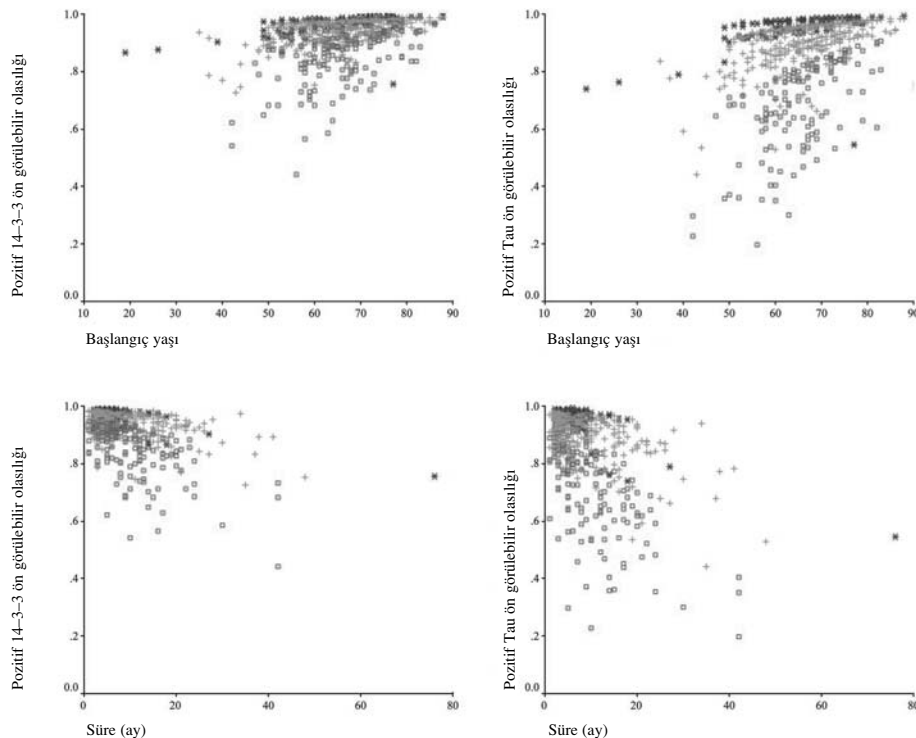
NSE = nöron spesifik enolaz; CJD = Creutzfeldt-Jakob hastalığı

40 yaşından büyük ve hastalık süresi daha kısa hastalarda daha yüksekti. Benzer sonuçlar Tau, S100b ve NSE ile de elde edildi. NSE = nöron spesifik enolaz; CJD = Creutzfeldt-Jakob hastalığı Tek değişkenli analiz, çoklu klinik faktörlerin (tanısal kategori [$p < 0.001$]), kısa hastalık süresi [$p < 0.05$] ve BOS'da hücre sayısının yüksekliği [$p < 0.001$]) 14-3-3 testi yanlış pozitiflik oranını yükselttiğini gösterdi. Çok değişkenli analizde aşağıdakiler yanlış pozitiflik oranı ile birlikteydi: nörodejeneratif hastalıklarla karşılaştırıldığında inflamatuvar ($p < 0.01$) veya paraneoplastik/SSS tümör hastalığı ($p < 0.001$) ve BOS'da hücre sayısının yüksekliği ($p < 0.05$).

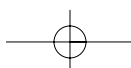
Tüm analizler kesin sCJD hastalarından elde edilen verilerle tekrarlandı ve yine benzer sonuçlara ulaşıldı.

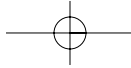
Belirteç kombinasyonu. İki belirtecin kombinasyonu ile hızlı ilerleyici demans hastalarında klinik tanının duyarlılık ve özgüllüğünün artıp artmadığını analiz etmek üzere tüm test kombinasyonlarını denedik (tablo 3). En yüksek duyarlılığa, anlamlı farklılık olmaksızın 14-3-3 ile yüksek Tau, S100b veya NSE kombinasyonu ile veya Tau ve S100b kombinasyonu ile ulaşıldı. Farklı sCJD alt tiplerine bakıldığında, iki BOS belirtecinin kombinasyonu PrP^{Sc} izotip 1 veya klasik fenotiplerde en yüksek duyarlılık elde edildi. Tek bir belirteçle karşılaştırıldığında iki testin kombinasyonu hem klasik hem de atipik fenotiplerde duyarlılığı yükseltti. Klasik fenotipte her bir belirteç için test duyarlılığı çok yüksekti, ancak atipik fenotipde sadece iki BOS belirtecinin kombinasyonu ile test duyarlılığı yükseldi. Tüm nonTSE hastalarda en yüksek özgüllük normal Tau ve NSE düzeyleri (%88) ile elde edildi. İleri analizde sadece nörodejeneratif hastalık alt grubunda belirteç kombinasyonuna baktık (tablo 3). En yüksek duyarlılığa sahip kombinasyon negatif Tau veya NSE düzeyleri idi (%91), onu negatif 14-3-3 veya NSE izledi (%82). Nörodejeneratif hastalıklar için tüm non-TSE grubunda olduğu gibi S100b içeren kombinasyon hariç herhangi iki belirtecin kombinasyonu da yüksek duyarlılık sağladı.

Lomber ponksiyon tekrarı. Seksendört hastada en az 2 kez LP yapıldı. İki 14-3-3 testi arasındaki ortanca süre 6 haftaydı. Bu hastalarda ilk LP'de 14-3-3 pozitifliği CJD olgularında %65'di, ancak hastalığın daha ileri evrelerinde alınan ikinci örnekte duyarlılık daha da yükseldi (%79). İkinci LP yapıldığında özgüllük de arttı (%63'den 69'a). Tablo E-3'de tekrarlanan LP'lerde farklı beyin kaynaklı proteinler için yapılan ayrıntılı analizler görülmektedir. Buna göre CJD hastalarında hastalığın ilerlemesi ile birlikte beyin kaynaklı proteinlerin düzeylerinde genel bir yük-



Şekil. BOS'da başlangıç yaşı ve hastalık süresine göre PRNP kodon 129 genotipine dayalı stratifiye edilmiş pozitif 14-3-3 veya Tau test öngörülebilir olasılıklarının karşılaştırılması. Kırmızı kareler = MV; yeşil + = MM; mavi noktalar = VV.



**Tablo 3** sCJD ve kontrol hastalarda olası tüm ikili test kombinasyonlarının karşılaştırılması

| Test kombinasyonu | % Duyarlılık (pozitif / tüm) (%95 GA) | | | | | | Özgüllük (pozitif/tüm) (%95 GA) | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|--|--|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | MM1 | MV1 | VV1 | MM2 | MV2 | VV2 | Klasik* % (pozitif/tüm) (%95 GA) | Atipik† % (pozitif/tüm) (%95 GA) | Tüm TSE hastaları | Tüm non TSE hastalar | Nörodegeneratif hastalıklar |
| 14-3-3‡ veya Tau | 99 (93/94) | 83 (5/6) | 100 (5/5) | 86 (6/7) | 68 (13/19) | 100 (16/16) | 98 (283/290) (95, 99) | 91 (262/289) (86, 94) | 94 (757/806) (92, 95) | 68 (71/219) (61, 74) | 72 (73/102) (62, 80) |
| 14-3-3‡veya S100b§ | 99 (80/81) | 80 (4/5) | 100 (6/6) | 100 (5/5) | 85 (17/20) | 100 (13/13) | 98 (206/210) (95, 99) | 93 (211/228) (88, 95) | 96 (557/583) (93, 97) | 57 (70/161) (48, 64) | 58 (38/65) (46, 70) |
| 14-3-3‡ veya NSE§ | 97 (62/64) | 100 (5/5) | 100 (4/4) | 67 (2/3) | 83 (10/12) | 100 (11/11) | 97 (200/206) (93, 99) | 89 (195/218) (84, 93) | 94 (480/513) (91, 95) | 68 (36/112) (58, 76) | 82 (31/38) (65, 92) |
| Tau§ veya S100b§ | 99 (79/80) | 80 (4/5) | 80 (4/5) | 100 (5/5) | 76 (13/17) | 100 (12/12) | 97 (197/203) (93, 99) | 90 (201/223) (85, 94) | 93 (521/562) (90, 95) | 69 (47/154) (61, 76) | 65 (40/62) (51, 76) |
| Tau§ veya NSE§ | 97 (59/61) | 100 (5/5) | 75 (3/4) | 67 (2/3) | 73 (8/11) | 100 (10/10) | 97 (187/193) (93, 99) | 87 (170/196) (81, 91) | 91 (430/473) (88, 93) | 88 (13/108) (80, 93) | 91 (32/35) (76, 98) |
| S100b§ veya NSE§ | 95 (53/56) | 100 (4/4) | 50 (2/4) | 100 (1/1) | 50 (5/10) | 100 (8/8) | 92 (147/159) (87, 96) | 80 (140/174) (74, 86) | 86 (348/407) (82, 89) | 82 (17/93) (72, 89) | 77 (24/31) (66, 84) |

* Sporadik Creutzfeldt-Jakob hastalığı (sCJD), kodon 129 genotip MM veya MV ve hastalık süresi 8 aydan kısa

† Sporadik Creutzfeldt-Jakob hastalığı (sCJD), kodon 129 genotip MM veya MV ve hastalık süresi 8 aydan uzun

‡ İz sonuç negatif kabul edildi.

§ Tau proteini için kesme noktası 1,300 pg/ml; S100b'de Byk-Sangtec kiti için 4.2 ng/ml ve İngiltere'de kullanılan hastane kiti için 0.5 ng/ml; NSE'de Hoffman La Roche kiti için 35 ng/ml ve Byk-Diasorin, Byk-Sangtec ve Wallac kitleri için 25 ng/ml.

NSE = nöron spesifik enolaz

selme eğilimi de fark ettik.

Tartışma. CJD hastalarının BOS'larında beyin kaynaklı proteinlerin 1) kombine veya tek başına tanısal değerini, 2) tek BOS veya tekrarlanan BOS örneklerinin sonuçlarını ve 3) seçilmiş hasta karakteristiklerinin test duyarlılığı ve özgüllüğü üzerindeki etkilerini belirlemek üzere proteini panelini test ettik.^{1,3,5,7,14,24,31}

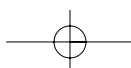
Test edilen beyin kaynaklı proteinler arasında tüm TSE tipleri için 14-3-3 en yüksek duyarlılığa sahipti. sCJD'de duyarlılık %85'di. Bu düzey daha önce bildirilen düzeylere^{2,3,7,21,31} göre daha düşük. Daha düşük duyarlılık bu çalışmada test edilen hasta sayısının yüksekliğine bağlı olabileceği gibi 14-3-3 iz sonuçlarının negatif olarak tanımlanmasını talep eden çok rijid bir strateji uygulanmasına da bağlı olabilir. 14-3-3 testlerinde yanlış negatifliğin yüksekliğinin, sistematik sürveyans çalışmalarında gittikçe daha sık tanınan (MV2 alt tipi gibi) bazı atipik CJD alt tiplerine de bağlı olabileceği göz ardı edilmemelidir. Tüm testlerin duyarlılığı sporadik grupta en yüksekken iatrojenik ve genetik olgularda daha düşük ve vCJD, FFI ve GSS hastalarında en düşüktü.

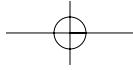
Çoğu hasta, uluslararası kabul görmüş klinik tanısal ölçütlere^{26,27} uygun 14-3-3 proteini için analiz edildi. Bu belirtecin sadece gerçekten şüpheli CJD olgularında bakılması gerektiği yönünde ortak bir görüş olsa da yine de de-

mans taramasında yaygın olarak bakılmaktadır.^{3,32} Günümüzde sürveyans çalışmalarında hasta toplanması için kabul edilmiş bir yöntemdir ve kullanımı epidemiyoloji rakamlarında önemli bir düzelme sağlamaktadır.^{33,35} Bu yaklaşım özgüllükte eşlik eden bir düşüş ile dengelenmelidir. Önceki çalışmalarda sadece CJD şüphesi olan hastalar test edildiğinden özgüllük daha yüksek çıkardı.^{2,3,36} Ardından, kontrol grubunun farklı akut nörolojik bozukluklarla genişletilmesi ile birlikte bu surrogate belirteçler için özgüllük düzeyleri düştü. Ancak olası CJD ayırıcı tanısına sadece nörodegeneratif bozukluklar alındığında, önceden bildirilmiş bu özgüllük düzeyleri yine de geçerli kalmaktadır (tablo E-1).^{2,3,36}

14-3-3 ile diğer bir belirtecin kombinasyonu duyarlılığı daha da artırır.^{1,5,21,23,24} En yüksek duyarlılığa 14-3-3 ve yüksek Tau, S100b veya NSE kombinasyonu ile ulaşıldı, ancak en yüksek özgüllük de normal Tau ve NSE kombinasyonu ile sağlandı.

Hastalığın daha ileri evresinde LP tekrarlandığında farklı belirteçlerin duyarlılık ve özgüllüğünde anlamlı bir artış sağladık. Bu gözlem yayınlanmış tek olgu bildirimleri^{10,13,21,37,38} ile de uyumluydu. Analizimizde ikinci bir LP'nin yapılması halinde duyarlılık ve özgüllük yükseldi. İkinci bir BOS testinin sonuçları CJD'nin dışlanmasını sağlayabilir, çünkü bazı durumlarda zamanla beyin kaynaklı protein düzeyleri düşmektedir, oysa CJD'de düzey





yükselmeye devam eder. Bu nedenle şüpheli olgularda CJD tanısının dışlanması için ilk LP'den birkaç hafta sonra LP tekrar edilmelidir.

PRNP kodon 129 genotipi, PrP^{Sc} izotipi, hastalık süresi ve başlangıç yaşı sCJD hastalarında test duyarlılığını etkiledi. *PRNP* kodon 129 heterozigot hastalarda, yapılan BOS testlerinin duyarlılığı daha düşüktür. Artı, PrP^{Sc} izotip 2A farklı bir etkileyici faktördür ve en az bir metionin aleli taşıyan hastalarda etki daha da belirgindir. *PRNP* kodon 129 genotipi ve PrP^{Sc} izotipi önceki çalışmalarda irdelenmişti, ancak olgu sayısının düşüklüğü nedeni ile sonuçlar o sırada anlamlılık düzeyine ulaşamamıştı.^{8,9,21}

Hastalığın son üçte birlik evresinde gerçekleştirilen LP'de 14-3-3 duyarlılığının yükselme eğilimi gösterdiğini bulduk, ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Dahası, analizimizde olduğu gibi hastalığın geç evresinde ikinci bir LP yapılması ile belirteçlerin duyarlılığı arttı. Bu bulgu, hastalık evrelerinin 14-3-39 düzeyleri ile veya 14-3-3, Tau ve Aβ₁₋₄₂²¹ ile korele olduğu yönünde önceki bildirimlerle uyumluydu.

Pek çok çalışmada hastalık süresi ve test duyarlılığı sorununa yönelinmişti.^{5,8} Genelde mevcut testlerden birçok tipik bir kısa süreli hastalığı olanlarda daha duyarlıdır. Bu gerçek, EEG'de periyodik keskin ve yavaş dalgaların gösterilmesi, BOS'da 14-3-3 ve MRI'da hiperintens bazal gangliya görünümü ve BOS'da fosforile Tau konsantrasyonlarında yükselme ile desteklenmiştir.^{9,39-41} Çalışmamızda 6 aydan daha kısa hastalık süresi, yüksek 14-3-3, Tau ve S100b protein duyarlılığı ile birlikteydi.

Başlangıç yaşı ile test duyarlılığı anlamlı bir korelasyon göstermekteydi, hastalığın 40 yaşın altında başladığı olgularda duyarlılık daha düşüktü. Hastalığı modifiye edici bazı faktörler bu gözlemden sorumlu olabilir. MV2 alt tipleri gibi atipik CJD alt tipleri daha genç yaşta başlayabilir denebilir. Genç hastaların daha uzun yaşaması bu hastalarda hastalık sürecinin daha yavaş progresif olması ve dolayısıyla da muhtemelen daha az akut nöronal hasara yol açmasına bağlı olabilir.⁴² Diğer yandan, lojistik regresyon analizinde yaş, bağımsız bir değişken olarak ortaya çıktı. İspat edilen diğer faktörler arasında BOS'da beyin kaynaklı proteinlerin daha fazla salınmasına yol açan yaşa bağlı nöronal hassasiyet de sayılabilir.

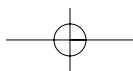
Teşekkür

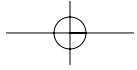
Yazarlar katılımcı ülkelerdeki bütün doktorlara, gönderdikleri CSF ve kan örnekleri için ve bu hastalarla ilgili nöropatolojik ve klinik verileri sağladıkları için teşekkürlerini sunarlar. Yazarlar aynı zamanda Esther Croes, Jolante Zellner, Maja Schneider-Dominco, Mauri Peltola ve Marianne Wacker.

Kaynaklar

1. Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, et al. 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999;10:40-46.
2. Hsich G, Kenney K, Gibbs Jr. CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996;335:924-930.

3. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, et al. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998;43:32-40.
4. Geschwind M, Martindale J, Miller D, et al. Challenging the clinical utility of the 14-3-3 protein for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2003;60:813-816.
5. Green AJ, Thompson EJ, Stewart GE, et al. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:744-748.
6. Brandel JP, Peoc'h K, Beaudry P, et al. 14-3-3 protein cerebrospinal fluid detection in human growth hormone-treated Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol* 2001;49:257-260.
7. Sanchez-Valle R, Saiz A, Graus F. 14-3-3 protein isoforms and atypical patterns of the 14-3-3 assay in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 2002;320:69-72.
8. Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, et al. Current clinical diagnosis in CJD: identification of uncommon variants. *Ann Neurol* 2000;48:323-329.
9. Castellani RJ, Colucci M, Xie Z, et al. Sensitivity of 14-3-3 protein test varies in subtypes of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2004;63:436-442.
10. Giraud P, Biacabe AG, Chazot G, et al. Increased detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease during the disease course. *Eur Neurol* 2002;48:218-221.
11. Kohira I, Tsuji T, Ishizu H, et al. Elevation of neuron-specific enolase in serum and cerebrospinal fluid of early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurol Scand* 2000;102:385-387.
12. Kropp S, Schulz-Schaeffer WJ, Finkenstaedt M, et al. The Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1999;56:55-61. Jimi T, Wakayama Y, Shibuya S, et al. High levels of nervous systemspecific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Chim Acta* 1992;211:37-46.
13. Van Everbroeck B, Dobbeleir I, De Waele, M, De Deyn, P, Martin J-J, Cras P. Differential diagnosis of 201 possible Creutzfeldt-Jakob disease patients. *J Neurol* 2004;251:298-304.
14. Sharief MK, Green A, Dick JP, Gawler J, Thompson EJ. Heightened intrathecal release of proinflammatory cytokines in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 1999;52:1289-1291.
15. Minghetti L, Cardone F, Greco A, et al. Increased CSF levels of prostaglandin E(2) in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:127-129.
16. Arlt S, Kontush A, Zerr I, et al. Increased lipid peroxidation in cerebrospinal fluid and plasma from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 2002;10.
17. Minghetti L, Greco A, Cardone F, et al. Increased brain synthesis of prostaglandin E2 and F2-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:866-871.
18. Van Everbroeck B, Green A, Pals P, Martin JJ, Cras P. Decreased levels of amyloid-beta 1-42 in cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients. *J Alzheimers Dis* 1999;1:419-424.
19. Van Everbroeck B, Dewulf E, Pals P, Lubke U, Martin JJ, Cras P. The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* 2002;23:59-64.
20. Van Everbroeck B, Quoilin S, Boons J, Martin JJ, Cras P. A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1210-1214.
21. Otto M, Esselmann H, Schulz-Schaeffer W, et al. Decreased betaamyloid1-42 in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2000;54:1099-1102.
22. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192-197.
23. Aksamit AJ, Jr., Preissner CM, Homburger HA. Quantitation of 14-3-3 and neuron-specific enolase proteins in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2001;57:728-730.
24. Kapaki E, Kilidireas K, Paraskevas GP, Michalopoulou M, Patsouris E. Highly increased CSF tau protein and decreased beta-amyloid (1-42) in sporadic CJD: a discrimination from Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:401-403.
25. Zerr I, Pocchiarini M, Collins S, et al. Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*





- 2000;55:811-815.
27. WHO. Human transmissible spongiform encephalopathies. *Weekly Epidemiological Record* 1998;47:361-365.
28. Will RG, Zeidler M, Stewart GE, et al. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2000;47:575-582.
29. Green AJE, Keir G, Thompson EJ. A specific and sensitive ELISA for measuring S-100b in the cerebrospinal fluid. *J Immunol Methods* 1997;205:35-41.
30. Zerr I, Bodemer M, Raicker S, et al. Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1995;345:1609-1610.
31. Green AJ, Ramljak S, Muller WE, Knight RS, Schroder HC. 14-3-3 in the cerebrospinal fluid of patients with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease measured using capture assay able to detect low levels of 14-3-3 protein. *Neurosci Lett* 2002;324:57-60.
32. Burkhard PR, Sanchez JC, Landis T, Hochstrasser DF. CSF detection of the 14-3-3 protein in unselected patients with dementia. *Neurology* 2001;56:1528-1533.
33. Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL, Hauw JJ, Alperovitch A. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: effect of clinical criteria on incidence estimates. *Neurology* 2000;54:1095-1099.
34. Sanchez-Valle R, Nos C, Yague J, Graus F, Dominguez A, Saiz A. Clinical and genetic features of human prion diseases in Catalonia: 1993-2002. *Eur J Neurol* 2004;11:649-655.
35. Puopolo M, Ladogana A, Almonti S, et al. Mortality trend from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in Italy, 1993-2000. *J Clin Epidemiol* 2003;56:494-499.
36. Harrington MG, Merrill CR, Asher DM, Gajdusek DC. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1986;315:279-283.
37. Kropp S, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, et al. Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1999;261:124-126.
38. Mollenhauer B, Serafin S, Zerr I, et al. Diagnostic problems during late course in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 2003;250:629-630.
39. Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999;46:224-233.
40. Meissner B, Kohler K, Körtner K, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Magnetic resonance imaging and clinical findings. *Neurology* 2004;63:450-456.
41. Van Everbroeck B, Green A, Vanmechelen E, et al. Phosphorylated tau in cerebrospinal fluid as a marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:79-81.
42. Pocchiari M, Poupolo M, Croes EA, et al. Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 2004;10:2348-2359.

