

中华人民共和国 卫生 行业标准

WS/T 562—2017

克-雅病诊断

Diagnosis for Creutzfeldt-Jakob disease

2017 - 07 - 24 发布

2018 - 02 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

目次

前言	II
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 缩略语	3
4 诊断原则	3
5 诊断依据	3
6 鉴别诊断	5
附录 A (规范性附录) 脑脊液 14-3-3 蛋白 Western blot 检测	6
附录 B (规范性附录) 脑组织病理学检测	7
附录 C (规范性附录) 脑组织 PrP ^{Sc} 的免疫组织化学检测	9
附录 D (规范性附录) 脑组织 PrP ^{Sc} 的 Western blot 检测	11
附录 E (规范性附录) vCJD 患者扁桃体 PrP ^{Sc} 的 Western blot 检测	13
附录 F (规范性附录) vCJD 患者扁桃体 PrP ^{Sc} 的免疫组织化学检测	13
附录 G (规范性附录) PRNP 基因序列、129 位及 219 位氨基酸多态性检测	15
附录 H (资料性附录) 遗传或家族型人类朊病毒病 PRNP 基因突变位点	19
附录 I (资料性附录) 克-雅病的鉴别诊断	20
参考文献	22

前 言

本标准按照 GB/T1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、北京市友谊医院、广州市中山医院、河南省疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：董小平、韩俊、陈操、石琦、王得新、高晨、田婵、夏胜利、李洵桦、张秀春。

克-雅病诊断

1 范围

本标准规定了克-雅病和遗传或家族型人类朊病毒病（包括遗传或家族型克-雅病、吉斯特曼-施特劳斯综合征、致死性家族型失眠症）的诊断原则、诊断依据、诊断分类和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其医务人员对克-雅病和遗传或家族型人类朊病毒病（包括遗传或家族型克-雅病、吉斯特曼-施特劳斯综合征、致死性家族型失眠症）的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

克-雅病 Creutzfeldt-Jakob disease

德国科学家 Creutzfeldt H. G. 和 Jakob A. M. 在 1922 年首先报道的一种罕见的中枢神经系统疾病，后被证实为人类的朊病毒病，包括散发型、遗传或家族型、医源型和变异型。其中散发型约占病例总数的 85% 左右，遗传或家族型约占病例总数的 10%~15% 左右，医源型约占病例总数的 1% 左右。

2.2

朊病毒病 prion disease

一类由朊病毒引起的人类和动物中枢神经系统的可传播性、退行性疾病。该病潜伏期长，病死率为 100%。朊病毒相关疾病、可传播性海绵状脑病也为此类疾病的专有名词。

2.3

朊病毒 prion

朊病毒病的感染因子，又称羊瘙痒因子样或淀粉样朊蛋白（异常朊蛋白）（scrapie, amyloid-forming isoform of the prion protein, PrP^{Sc}）。目前认为是一种不含核酸、具有自我复制能力的感染性蛋白粒子，由细胞表面的正常朊蛋白转变而成的异常形式，具有感染性，可抵抗蛋白酶的水解作用（蛋白酶抗性），也有称为朊毒体、朊粒。

2.4

朊蛋白 prion protein

一种正常的细胞蛋白，又称细胞型朊蛋白（cellular prion protein, PrP^C），在中枢神经系统（脑和脊髓组织）的神经元细胞以及胶质细胞中表达，在机体其他组织包括外周组织、淋巴组织等细胞中也有表达。

2.5

散发型克-雅病 sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

大多数克-雅病病例呈散发型，无地理上的聚集性，在病人之间无明显传播现象，由于至今没有发现明确的发病原因，故称为散发型克-雅病。此类疾病的发病年龄在 14 岁~92 岁之间，平均为 65 岁。发病率为 1~2 人/每百万人/每年，男女病人的比例与整个人口的性别比例一致，与社会经济状况无关。

2.6

医源性克-雅病 iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease

通过朊病毒污染的手术器械、角膜及硬脑膜移植或脑垂体提取物、生长激素及促性腺激素治疗会感染受体患者，引起医源性克-雅病。

2.7

遗传或家族型人类朊病毒病 genetic or familial human prion disease

遗传或家族型人类朊病毒病包括遗传或家族型克-雅病、吉斯特曼-斯特劳斯综合征、致死性家族型失眠症。发病率约占整个人类朊病毒病病例的 10%~15%。

2.8

遗传或家族型克-雅病 genetic or familial Creutzfeldt-Jakob disease

是一类遗传或家族型人类朊病毒病，为显性特征遗传性疾病。当人类朊蛋白基因出现特定位点的点突变，以及出现特定的八肽重复插入或缺失时，引起此类疾病。此类患者的临床表现与散发型克-雅病相似，但依据突变位点和类型的不同，其发病年龄、临床病程、临床辅助检查、实验室检测和病理变化有所差异。

2.9

吉斯特曼-施特劳斯综合征 Gerstmann-Strüssler-Scheinker syndrome

此类患者的朊蛋白编码基因出现特定的点突变及八肽插入，在临床表现和病理特征上与遗传或家族型克-雅病明显不同，临床表现为渐进性小脑共济失调，神经病理上可见特征性的淀粉样斑块沉积。

2.10

致死性家族型失眠症 fatal familial insomnia

当人类朊蛋白基因第 129 位密码子为甲硫氨酸纯合子，第 178 位氨基酸由天冬氨酸 (D) 突变成天冬酰胺 (N) 时，此类患者出现严重的睡眠障碍。病理上表现为显著的丘脑神经元丢失和胶质增生，很少或几乎没有海绵状变性。

2.11

变异型克-雅病 variant Creutzfeldt-Jakob disease

1996 年在英国首先发现的克-雅病新变种，多发生于年轻人，且其临床症状和病理改变均与散发型克-雅病有所不同。此类病人的大脑和小脑出现广泛的空泡样变及“花瓣样”的异常朊蛋白斑块沉积。

已经证实变异型克-雅病与 20 世纪 80 年代中期在英国和欧洲暴发的牛海绵状脑病相关。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CJD: 克-雅病 (Creutzfeldt-Jakob disease)

FFI: 致死性家族型失眠症 (fatal familial insomnia)

fCJD: 家族型克-雅病 (familial CJD)

GSS: 吉斯特曼-施特劳斯综合征 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome)

gCJD: 遗传型克-雅病 (genetic CJD)

iCJD: 医源型克-雅病 (iatrogenic CJD)

PRNP: 朊蛋白基因 (prion protein gene)

PrP: 朊蛋白 (prion protein)

PrP^c: 细胞型朊蛋白 (正常朊蛋白) (cellular prion protein)

PrP^{Sc}: 羊瘙痒因子样或淀粉样朊蛋白 (异常朊蛋白) (scrapie, amyloid-forming isoform of the prion protein)

sCJD: 散发型克-雅病 (sporadic CJD)

TSE: 可传播性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy)

vCJD: 变异型克-雅病 (variant CJD)

4 诊断原则

根据患者的流行病学史、临床症状、临床辅助检查、实验室及基因学检测综合判断。诊断结果分为疑似诊断、临床诊断和确诊诊断,其中病例的确诊诊断依赖于在患者的脑组织中检出具有蛋白酶抗性的 PrP^{Sc} 和/或出现海绵状变性和/或具有特定的 PRNP 基因突变。

5 诊断依据

5.1 散发型克-雅病

5.1.1 病史与流行病学史

病史与流行病学史如下:

- a) 具有进行性痴呆症状;
- b) 临床病程 < 2 年;
- c) 常规检测排除其他疾病;
- d) 无明确医源性接触史。

5.1.2 临床表现

临床表现如下:

- a) 肌阵挛;
- b) 视觉障碍或小脑共济失调;
- c) 锥体/锥体外系功能异常;
- d) 无动性缄默。

5.1.3 临床检查

特征性的临床检查结果如下：

- a) 在病程中脑电图出现周期性三相波；
- b) 头颅 MRI 成像可见壳核/尾状核异常高信号，或者弥散加权像显示对称性灰质“缎带（ribbon）征”。

5.1.4 实验室检测

特征性的实验室检测结果如下：

- a) 脑脊液 14-3-3 蛋白检测为阳性（见附录 A）；
- b) 脑组织病理学检测显示具有典型/标准的神经病理学改变，即出现海绵状变性（见附录 B）；
- c) 脑组织免疫组织化学检测存在蛋白酶抗性 PrP^{Sc} 的沉积（见附录 C）；
- d) 脑组织 Western 印迹法检测存在蛋白酶抗性 PrP^{Sc}（见附录 D）。

5.1.5 诊断分类

诊断分类主要包括以下三种：

- a) 疑似诊断：符合 5.1.1 加 5.1.2 任意两条；
- b) 临床诊断：在疑似诊断基础上，符合 5.1.3 任意一条或 5.1.4 a)；
- c) 确诊诊断：在疑似诊断基础上，符合 5.1.4 中 b)、c)、d) 任意一条。

5.2 医源性克-雅病

5.2.1 病史与主要临床表现

与散发型克-雅病相似。

5.2.2 诊断分类

诊断分类仅为确诊诊断。

在散发型克-雅病确诊诊断基础上，符合以下任意一项：

- a) 接受由人脑提取的垂体激素治疗的病人出现进行性小脑综合征；
- b) 确定的暴露危险，例如曾接受过来自 CJD 病人的硬脑膜移植、角膜移植等手术。

5.3 变异型克-雅病

5.3.1 病史与流行病学史

病史与流行病学史如下：

- a) 进行性神经精神障碍；
- b) 病程 ≥ 6 个月；
- c) 常规检查不提示存在有其他疾病；
- d) 无明确医源性接触史；
- e) 排除遗传或家族型人类朊病毒病。

5.3.2 临床表现

临床表现如下：

- a) 早期精神症状（抑郁、焦虑、情感淡漠、退缩、妄想）；

- b) 持续性疼痛感（疼痛和/或感觉异常）；
- c) 共济失调；
- d) 肌阵挛、舞蹈症、肌张力障碍；
- e) 痴呆。

5.3.3 临床检测

特征性的临床检测结果如下：

- a) 早期脑电图无典型的三相波（晚期可能出现三相波）；
- b) MRI：弥散加权像、液体衰减反转恢复成像显示双侧丘脑枕（后结节）高信号。

5.3.4 实验室检测

特征性的实验室检测结果如下：

- a) 扁桃体 Western 印迹法检测存在蛋白酶抗性 PrP^{Sc}（见附录 E）或扁桃体免疫组织化学检测证实具有 PrP^{Sc} 沉积（见附录 F）；
- b) 脑组织病理学检测显示，大脑和小脑广泛的空泡样变（见附录 B）；
- c) 脑组织免疫组织化学检测证实具有“花瓣样”的蛋白酶抗性 PrP^{Sc} 斑块沉积（见附录 C）；
- d) 脑组织 Western 印迹法检测存在蛋白酶抗性 PrP^{Sc}（见附录 D）。

5.3.5 诊断分类

诊断分类包括以下三种：

- a) 疑似诊断：符合 5.3.1 加 5.3.2 中的任意 4 项加 5.3.3a)；
- b) 临床诊断：在疑似诊断的基础上符合 5.3.3b)；或 5.3.1 加 5.3.4 a)；
- c) 确诊诊断：在 5.3.1 加 5.3.4 中 b)、c)、d) 任意一条。

5.4 遗传或家族型人类朊病毒病

5.4.1 病史与流行病学史

在一级亲属中存在遗传或家族型人类朊病毒病确诊病例。

5.4.2 诊断分类

诊断分类包括以下两种：

- a) 疑似诊断：在符合 sCJD 疑似诊断标准或出现进行性神经精神症状的基础上，加 5.4.1。
- b) 确诊诊断：在疑似诊断的基础上，病人 *PRNP* 基因序列检测（见附录 G）证实具有特定的基因突变（参见附录 H）。

6 鉴别诊断

克-雅病的诊断应与病毒性脑炎、桥本脑病、线粒体脑病、阿尔茨海默病、血管性痴呆、中枢神经系统淋巴瘤及其他脑肿瘤、皮层静脉血栓形成及副肿瘤性亚急性小脑变性相鉴别（参见附录 I）。

附录 A (规范性附录)

脑脊液 14-3-3 蛋白 Western blot 检测

A.1 原理

CJD 病人脑脊液中 14-3-3 蛋白含量往往增高。脑脊液经 SDS-PAGE 电泳、电转后，14-3-3 蛋白与特异性抗体进行反应，显色后出现 30 KD 左右的蛋白条带。

A.2 实验主要仪器

蛋白电泳和电转装置。

A.3 实验步骤

按如下操作步骤进行：

- a) 脑脊液中加入 5×上样缓冲液，100 °C煮沸 5 min。
- b) 常规制备 15%分离胶和 5%浓缩胶，常规上样，使用浓缩胶 80 V，分离胶 156 V 的电压条件下电泳 2 h。200 mA 稳流 70 min（湿式）或 60 mA 60 min（半干式）电转移到硝酸纤维素膜。
- c) 转移完毕，膜用 5%脱脂奶缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20），1：1 000 稀释一抗（一抗为 14-3-3 蛋白特异性多克隆抗体），室温振荡孵育 2 h 或 4 °C 孵育过夜。缓冲液洗 3 次，共 30 min。
- d) 与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 二抗（用缓冲液进行 1：5 000 稀释）37 °C 振荡孵育 1 h。缓冲液洗 3 次，共 30 min。
- e) ECL 显色。

A.4 结果判定

阳性对照采用羊脑组织匀浆液，或 14-3-3 阳性脑脊液；显色后在 30 KD 位置出现一条蛋白条带，与阳性对照中蛋白条带泳动位置相同，即可判定为脑脊液中 14-3-3 阳性。

附 录 B
(规范性附录)
脑组织病理学检测

B.1 中枢神经组织分区采集

中枢神经组织分区采集包括以下五个步骤:

- a) 除去硬脑膜, 称重。
- b) 中枢神经组织经福尔马林固定, 固定最佳时间为 10 d~21 d。
- c) 脑组织。常规途径及方法切脑、分区取材, 分别记录、标记。
- d) 脊髓。切开脊髓硬膜, 分别记录、标记颈、胸、腰部脊髓组织块。然后采集脊神经根节。
- e) 标本感染性的清除。在进一步检测之前, 所有的固定组织应在 96% 以上的甲酸溶液中浸泡至少 1 h。需要注意的是, 由于变性剂相互作用可产生化学反应, 任何事先经过酚处理的组织都不能再进行 96% 以上甲酸处理, 故这些组织仍具有感染性。

B.2 标本脱水、浸蜡

脱水、浸蜡按下列程序进行:

70%乙醇	1 h	18 °C~20 °C	
80%乙醇	1 h	18 °C~20 °C	
90%乙醇	1 h	18 °C~20 °C	重复两次
无水乙醇	2 h	18 °C~20 °C	重复两次
二甲苯	1 h	18 °C~20 °C	重复两次
浸蜡	1 h	58 °C	
浸蜡	1.5 h	58 °C	重复两次

B.3 制片

制片主要包括以下四步:

- a) 组织标本蜡块的修块、切片、制片按常规病理学方法进行;
- b) 如果组织蜡块未经 96% 甲酸处理, 操作人员应戴金属网状手套防护以免损伤;
- c) 用于常规病理检测和免疫组织化学检测的脑组织片厚度为 5 μm;
- d) 废弃组织、蜡块、碎片等收集后 134 °C 高压灭菌 1 h 或焚烧。

B.4 HE染色

HE 染色按常规病理学方法进行。

B.5 结果判定**B.5.1 sCJD、gCJD或fCJD、iCJD**

在大脑、小脑皮质、皮质下灰质中出现海绵状病变。

B. 5.2 vCJD

丘脑后部大量星形胶质细胞增生，神经元丢失，即有大量的 PrP^{Sc} 沉积的海绵状变性，特别是在大脑和小脑皮层灰质区在淀粉样斑块周围围绕着一圈海绵状空泡（花瓣样）。

B. 5.3 GSS

很少或几乎没有海绵状变性。

B. 5.4 FFI

显著的丘脑神经元丢失和胶质增生，很少或几乎没有海绵状变性。

附录 C
(规范性附录)
脑组织PrP^{Sc}的免疫组织化学检测

C.1 原理

PrP^{Sc} 具有抵抗变性剂、蛋白酶的水解作用，组织切片经高压水解、变性剂或蛋白酶处理破坏 PrP^C 后，以朊蛋白特异性抗体进行免疫组织化学染色，光学显微镜下观测 PrP^{Sc} 蛋白沉积。

C.2 主要实验仪器

光学显微镜。

C.3 实验步骤

实验操作按如下顺序进行：

- a) 组织切片置于 56 ℃ 烘烤 24 h，常规脱蜡至水；
- b) 取出后浸入水中 5 min，饱和苦味酸浸泡 15 min，除去福尔马林色素；
- c) 水洗 3 次，每次 5 min，除去苦味酸；
- d) 3% 过氧化氢/甲醇封闭 15 min~20 min（阻断内源性过氧化物酶）；
- e) 水洗 3 次，每次 5 min；
- f) 高压水解（121 ℃，双蒸水）10 min，或微波炉（高功率挡，双蒸水）3 次，每次 5 min；
- g) 取出后室温冷却；
- h) 在含量不小于 96% 的甲酸中浸泡 5 min~10 min（石蜡包埋前未作甲酸处理的标本）；
- i) 水洗 3 次（缓慢水滴洗）；
- j) 4 mol/L 异硫氰酸胍浸泡 2 h（4 ℃）；
- k) 充分水洗；
- l) 血清封闭 1:100 稀释的正常羊血清/磷酸盐缓冲液（PBS）封闭 20 min；
- m) 弃封闭液，加第一抗体（用 1:100 正常羊血清/PBS 稀释）孵育过夜，朊蛋白特异性单克隆抗体（如 3F4），稀释度为 1:500~1:1 000；
- n) PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- o) 加第二抗体（用 1:100 正常羊血清/PBS 稀释）孵育 30 min，辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗兔抗体 1:200 稀释，用于多克隆抗体检测；或 HRP 标记的抗小鼠抗体 1:200 稀释，用于单克隆抗体检测；
- p) PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- q) 3,3'-二氨基联苯胺（DAB）显色后，充分水洗；
- r) 苏木素（轻微）复染；
- s) 常规脱水、透明、封片。

C.4 结果观察

PrP^{Sc} 蛋白阳性染色呈褐色，分布可呈散在型、斑块型和混合型，细胞核呈淡蓝色。

C.5 结果判定

C.5.1 sCJD、iCJD、gCJD或fCJD

具有 PrP^{Sc} 的沉积（斑块型、弥漫性突触型、斑块/空泡周围型）。

C.5.2 vCJD

在细胞周围和血管周围出现无明确形态的PrP^{Sc}斑块，特别是在小脑。

C.5.3 GSS

可见特征性的淀粉样斑块沉积。

C.5.4 FFI

很少或几乎没有PrP^{Sc}的沉积。

附录 D
(规范性附录)
脑组织PrP^{Sc}的Western blot检测

D.1 原理

PrP^{Sc}蛋白具有抵抗蛋白酶 K 水解且经蛋白酶 K 消化后分子量变小的特点。提取脑组织蛋白，经蛋白酶 K 水解后进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白电泳条带电转至硝酸纤维素膜或尼龙膜，与 PrP 特异性单克隆抗体反应。具有蛋白酶抗性的蛋白条带显色后，位置在 17 KD~27 KD。

D.2 主要实验仪器

包括以下几种：

- a) 组织研磨器；
- b) 离心机；
- c) 蛋白电泳/电转装置。

D.3 脑组织的提取和处理

脑组织的研磨、提取应在生物安全二级以上实验室中进行。操作人员需穿戴防护工作服、防护口罩、眼睛防护装置、双层手套、防护鞋套等。如果需要振荡器，应使用低功率挡；冰冻脑组织应在生物安全柜内解冻，切取少量组织（<100 mg=放入冻存管，称重；具体操作按如下顺序进行：

- a) 按 1:10 (*m/V*) 比例加入适量的提取缓冲液，将组织转移到组织研磨器，制备 10%的脑组织匀浆。研磨器使用后在 2 mol/L NaOH 或 5%NaClO (20 000 μg/g 游离氯) 溶液中浸泡至少 1h。
- b) 脑组织匀浆转移到冻存管，4 °C，2 000 r/min 离心，10 min。
- c) 收集上清液，-20 °C 保存。所有使用的试管、移液器头浸入 2 mol/L NaOH 或 5%NaClO (20 000 μg/g 游离氯) 溶液中浸泡至少 1 h。

D.4 蛋白酶K水解及电泳、电转

按如下步骤操作：

- a) 脑组织匀浆中加入终浓度 20 μg/mL 的蛋白酶 K，37 °C 作用 1 h~2 h。
- b) 加入等体积的 2×上样缓冲液，100 °C 煮沸 10 min。
- c) 常规制备 15%分离胶和 5%浓缩胶。常规上样，使用浓缩胶 80 V，分离胶 156 V 的电压条件下电泳 2 h。200 mA 稳流 70 min (湿式) 或 60 mA 60 min (半干式) 电转移到硝酸纤维素膜。

D.5 蛋白印迹反应

按如下步骤操作：

- a) 转膜完毕，膜用 5%脱脂奶缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液封闭过夜。
- b) 与 1:8 000 稀释的 PrP 特异性单克隆抗体 (如 3F4 抗体)，室温振荡孵育 2 h 或 4 °C 孵育过夜。缓冲液洗 3 次，共 30 min。

- c) 与辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 二抗（用缓冲液进行 1:10 000 稀释）室温振荡孵育 2 h。缓冲液洗 3 次，共 30 min。
- d) 增强型化学发光显色（ECL）溶液中显色。

D.6 结果判定

阳性对照采用羊瘙痒病毒株 263K 感染仓鼠脑组织提取物，或确诊的 CJD 病人脑组织提取物。阴性对照为正常仓鼠脑组织提取物，或非 CJD 病人脑组织提取物。阳性、阴性对照的处理、蛋白酶 K 水解及蛋白印迹反应按 D.3、D.4、D.5 进行。

脑组织提取物经蛋白酶 K 水解后仍在 17 KD~27 KD 位置出现多条（一般为三条）显色蛋白条带，与未经蛋白酶 K 消化的 PrP 蛋白显色条带（一般为三条，电泳迁移位置在 30 KD~35 KD 左右）相比，蛋白酶处理的 PrP 显色条带的泳动位置明显下移。以此可判定脑组织中 PrP^{Sc} 蛋白呈阳性。

附录 E (规范性附录)

vCJD患者扁桃体PrP^{Sc}的Western blot检测

E.1 原理

PrP^{Sc}蛋白具有抵抗蛋白酶 K 水解且经蛋白酶 K 消化后分子量变小的特点。提取扁桃体活检组织蛋白，经蛋白酶 K 水解后进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白电泳条带电转至硝酸纤维素膜或尼龙膜，与 PrP 特异性单克隆抗体反应。具有蛋白酶抗性的蛋白条带显色后，位置在 17 KD~27 KD。

E.2 主要实验仪器

包括以下几种：

- a) 组织研磨器；
- b) 离心机；
- c) 蛋白电泳/电转装置。

E.3 扁桃体活检组织的处理

具体操作按如下顺序进行：

- a) 按 1:10 (m/V) 比例加入适量的提取缓冲液，将扁桃体活检组织转移到组织研磨器，制备 10% 的组织匀浆。研磨器使用后可在 2 mol/L NaOH 或 5%NaClO (20 000 μg/g 游离氯) 溶液中浸泡至少 1 h。
- b) 扁桃体活检组织匀浆转移到冻存管，4 °C，2 000 r/min 离心，10 min。
- c) 收集上清液，-20 °C 保存。所有使用的试管、移液器头浸入 2 mol/L NaOH 或 5%NaClO (20 000 μg/g 游离氯) 溶液中浸泡至少 1 h。

E.4 蛋白酶K水解及电泳、电转

按如下步骤操作：

- a) 扁桃体活检组织匀浆中加入终浓度 20 μg/mL 的蛋白酶 K，37 °C 作用 1 h~2 h。
- b) 加入等体积的 2×上样缓冲液，100 °C 煮沸 10 min。
- c) 常规制备 15%分离胶和 5%浓缩胶。常规上样，使用浓缩胶 80 V，分离胶 156 V 的电压条件下电泳 2 h。200 mA 稳流 70 min (湿式) 或 60 mA 60 min (半干式) 电转移到硝酸纤维素膜。

E.5 蛋白印迹反应

按如下步骤操作：

- a) 转膜完毕，硝酸纤维素膜用 5%脱脂奶缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液封闭过夜。
- b) 与 1:8 000 稀释的 PrP 特异性单克隆抗体 (如 3F4 抗体)，室温振荡孵育 2 h 或 4 °C 孵育过夜。缓冲液洗 3 次，共 30 min。

- c) 与辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 二抗（用缓冲液进行 1:10 000 稀释）室温振荡孵育 2 h。缓冲液洗 3 次，共 30 min。
- d) 增强型化学发光显色（ECL）溶液中显色。

E.6 结果判定

阳性对照采用羊瘙痒病毒株 263K 感染仓鼠脑组织提取物，或确诊的 CJD 病人脑组织提取物。阴性对照为正常仓鼠脑组织提取物，或非 CJD 病人脑组织提取物。阳性、阴性对照的处理、蛋白酶 K 水解及蛋白印迹反应按 E.3、E.4、E.5 进行。

扁桃体活检组织提取物经蛋白酶K水解后仍在17 KD~27 KD位置出现多条（一般为三条）显色蛋白条带，与未经蛋白酶K消化的PrP蛋白显色条带（一般为三条，电泳迁移位置在30 KD~35 KD左右）相比，蛋白酶处理的PrP显色条带的泳动位置明显下移。以此可判定扁桃体活检组织中PrP^{Sc}蛋白呈阳性。

扁桃体活检不建议作为常规检查，在脑电图出现典型的三相波形后不应进行。对临床表现与 vCJD 相似，以及 MRI 未出现双侧丘脑枕（后结节）高信号病例的诊断有意义。

附录 F (规范性附录)

vCJD患者扁桃体PrP^{Sc}的免疫组织化学检测

F.1 原理

PrP^{Sc} 具有抵抗变性剂、蛋白酶的水解作用，组织切片经高压水解、变性剂或蛋白酶处理破坏 PrP^C 后，以朊蛋白特异性抗体进行免疫组织化学染色，光学显微镜下观测 PrP^{Sc} 蛋白沉积。

F.2 主要实验仪器

光学显微镜。

F.3 实验步骤

实验操作按如下顺序进行：

- a) 扁桃体组织切片置于 56 ℃ 烘烤 24 h，常规脱蜡至水；
- b) 取出后浸入水中 5 min，饱和苦味酸浸泡 15 min，除去福尔马林色素；
- c) 水洗 3 次，每次 5 min，除去苦味酸；
- d) 3%过氧化氢/甲醇封闭 15 min~20 min（阻断内源性过氧化物酶）；
- e) 水洗 3 次，每次 5 min；
- f) 高压水解（121 ℃，双蒸水）10 min，或微波炉（高功率挡，双蒸水）3 次，每次 5 min；
- g) 取出后室温冷却；
- h) 在含量不小于 96%的甲酸中浸泡 5 min~10 min（石蜡包埋前未作甲酸处理的标本）；
- i) 水洗 3 次（缓慢水滴洗）；
- j) 4 mol/L 异硫氰酸胍浸泡 2 h（4 ℃）；
- k) 充分水洗；
- l) 血清封闭 1：100 稀释的正常羊血清/磷酸盐缓冲液（PBS）封闭 20 min；
- m) 弃封闭液，加第一抗体（用 1：100 正常羊血清/PBS 稀释）孵育过夜，朊蛋白特异性单克隆抗体（如 3F4），稀释度为 1：500~1：1 000；
- n) PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- o) 加第二抗体（用 1：100 正常羊血清/PBS 稀释）孵育 30 min，辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗兔抗体 1：200 稀释，用于多克隆抗体检测；或 HRP 标记的抗小鼠抗体 1：200 稀释，用于单克隆抗体检测；
- p) PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- q) 3,3'-二氨基联苯胺（DAB）显色后，充分水洗；
- r) 苏木素（轻微）复染；
- s) 常规脱水、透明、封片。

F.4 结果观察及判定

光镜观察扁桃体活检切片中 PrP^{Sc} 蛋白阳性染色呈褐色，分布可呈散在型、斑块型和混合型，细胞核呈淡蓝色。

扁桃体活检不建议作为常规检查，在脑电图出现典型的三相波形后不应进行。对临床表现与 vCJD 相似，以及 MRI 未出现双侧丘脑枕（后结节）高信号病例的诊断有意义。

附 录 G (规范性附录)

PRNP基因序列、129位及219位氨基酸多态性检测

G.1 血液样品采集

血液样品采集注意事项如下：

- a) *PRNP* 基因扩增可以使用全血或白细胞。常用抗凝剂为柠檬酸，也可用其他抗凝剂如 EDTA，肝素会对 PCR 反应起抑制作用。
- b) 血液样品储存应为 -70 °C，在此条件下 DNA 样品可长期保存。
- c) PCR 扩增、血液样品的处理和储存应在不同的实验室（空间）中进行。

G.2 DNA的提取

使用商品化 DNA 提取试剂盒或其他方法提取血液样品 DNA。在整个提取过程中都应注意防止 DNA 污染；同时测定提取 DNA 的浓度。

G.3 PCR

G.3.1 PCR反应前注意事项

在整个PCR扩增过程应防止DNA污染，如试管、加样吸头、手套等。PCR反应的操作应严格按照四区划分的原则进行试剂分装、核酸提取、PCR扩增和核酸电泳（必要时）。

G.3.2 PCR引物

*PRNP*基因PCR上下游引物如下：

上游引物：5' -GGCAAACCTTGGATGCTGG-3'

下游引物：5' -CCCACTATCAGGAAGATGAGG-3'

标准PCR各种成分（50 μL体积）

DNA模板	3 μL
PCR 底物	25 μL
PrP 1-253上游引物	1 μL
PrP 1-253下游引物	1 μL
双蒸水	20 μL
总体积	50 μL

G.3.3 标准PCR循环条件

*PRNP*基因PCR扩增条件：

- 94 °C 5 min（预变性）
 94 °C 55 s（变性）
 55 °C 55 s（退火）
 72 °C 55 s（延伸）
 循环次数：30个。

G.3.4 结果判定

PCR产物长度：759 bp。

G.4 常规基因序列测定

按常规方法进行基因序列测定。

附录 H (资料性附录)

遗传或家族型人类朊病毒病PRNP基因突变位点

H.1 gCJD或fCJD

D178N-129V、V180I、V180I+M232R、T183A、T188A、T188K、E196K、E200K、V203I、R208H、V210I、E211Q、M232R、R148H、4个额外八肽插入、5个额外八肽插入、6个额外八肽插入、7个额外八肽插入及2个八肽重复缺失。

H.2 GSS

P102L、P105L、A117V、G131V、F198S、D202N、Q212P、Q217R、M232T及8个额外八肽插入。

H.3 FFI

D178N-129MM。

H.4 未分类的遗传或家族型人类朊病毒病

密码子点突变：H187R，216 八肽重复区（9个额外八肽）插入。

附录 I

(资料性附录)

克-雅病的鉴别诊断

1.1 病毒性脑炎

尤其是单纯疱疹病毒性脑炎，病人常表现为精神症状、癫痫、发烧、认知障碍及头痛。起病急，进展迅速。病变常位于颞叶内侧，也可累及额叶，DWI较T2WI发现病变更敏感，部分影像学表现与CJD类似，但前者常有脑实质的坏死、出血，腰穿显示脑脊液压力增高，白细胞和蛋白轻度增高等，根据临床病史、脑脊液检查及影像学表现可予以鉴别。

1.2 桥本脑病

可分为：血管炎型，表现为反复的卒中样发作如一过性神经功能缺损、失语、癫痫或急性意识障碍；缓慢进展型，隐袭起病，早期表现为意识模糊、焦虑或痴呆。无局灶性神经功能缺损的体征，但神经心理测试常提示严重的认知功能障碍。两种类型均可出现癫痫发作、肌阵挛、震颤、昏迷、锥体外系症状及小脑性共济失调。特征是血清抗甲状腺球蛋白（antithyroglobulin）抗体（TGAb）或抗甲状腺过氧化物酶（antimicrosomal）抗体（TMAb）的增高，皮质激素治疗有效。

1.3 线粒体脑病

主要为MELAS型（线粒体脑病伴乳酸中毒及卒中样发作），为线粒体DNA突变所致，临床上可引起亚急性痴呆需与CJD鉴别，患者常有卒中发作、癫痫和偏头痛，可有痴呆、乳酸中毒等症状。DWI上可显示皮层异常高信号，T2WI及FLAIR上显示脑回明显肿胀以及层状坏死，此征象不符合CJD表现。

1.4 阿尔茨海默病

潜隐起病，早期出现记忆力障碍，病程进展较缓慢，临床上以智能损害为主，伴有精神及行为改变，辅助检查中无CJD典型的脑电图，头颅MRI显示以双侧海马更为突出的脑萎缩改变，脑脊液14-3-3蛋白阴性。

1.5 血管性痴呆

主要临床表现为与血管事件相关的、阶梯性进展的痴呆，但头颅MRI可见多发性脑梗死以及白质疏松。

1.6 中枢神经系统淋巴瘤及其他脑肿瘤

均可表现急、慢性痴呆，但头颅MRI 的占位性病变可资鉴别。

1.7 皮层静脉血栓形成

一些疾病可引起静脉血栓性脑病。如硬脑膜动静脉瘘可引起临床上可逆性痴呆，常有颅内压增高出血、头痛、癫痫等，但临床症状为非特异性。MR DWI也可表现有与CJD类似的皮层高信号，脑血管造影检查可与之鉴别。

1.8 副肿瘤性亚急性小脑变性

特点是亚急性、进行性、双侧性小脑功能障碍，可伴有痴呆。早期头颅MRI正常，晚期表现小脑萎缩。常见脑脊液淋巴细胞增多、蛋白含量高，常见于肺癌或女性生殖系统肿瘤患者。

参 考 文 献

- [1] CDC' s Diagnostic Criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease(CJD), USA, 2010.
 - [2] National Creutzfeldt-Jakob Disease surveillance Diagnostic Criteria, UK, 2010.
 - [3] World Health Organization. WHO manual for surveillance of human transmissible spongiformencephalopathies including variant Creutzfeldt-Jakob disease, Communicable Disease Surveillance and Response, 2003.
-