

中华人民共和国卫生行业标准

WS 283—2020
代替 WS 283—2008

炭疽诊断

Diagnosis for anthrax

2020 - 04 - 21 发布

2020 - 11 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准第6章为强制性条款，其余为推荐性条款。

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准代替WS 283—2008《炭疽诊断标准》。

本标准与WS 283—2008相比，主要技术指标变化如下：

- 增加了规范性引用文件（见第2章）；
- 修改了实验室检查（见4.3, 2008年版的3.3）；
- 修改了临床诊断病例的诊断（见6.2, 2008年版的5.2）；
- 修改了确诊病例的诊断（见6.3, 2008年版的5.3）；
- 增加了标本保存和运输要求（见附录A）；
- 增加了生物安全要求（见附录B）；
- 增加了炭疽芽胞杆菌的核酸检测（见附录D）；
- 增加了炭疽芽胞杆菌的抗原检测（见附录E）。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、辽宁省疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京地坛医院、四川省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心、中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所、陕西省疾病预防控制中心、沈阳市第六人民医院。

本标准主要起草人：魏建春、李伟、姚文清、李兴旺、罗隆泽、殷文武、郭学军、刘东立、毛玲玲、张明香、张恩民、张慧娟。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 17015—1997；
- WS 283—2008。

炭疽诊断

1 范围

本标准规定了炭疽的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。
本标准适用于全国各级各类医疗机构及其医务人员对炭疽的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 炭疽 anthrax

由炭疽芽胞杆菌引起的一种人兽共患急性传染病。主要发生于畜间，以牛、羊、马等草食动物最为易感。人主要通过接触患炭疽的动物或污染的动物制品、环境感染而患病。主要临床类型为皮肤炭疽，少数为肺炭疽和肠炭疽，可以继发败血症及脑膜炎。皮肤炭疽病死率较低，其他各型炭疽的病死率均较高。

4 诊断依据

4.1 流行病学史

发病前 14 d 以内，接触过疑似炭疽的病、死动物或其残骸，或食用过疑似炭疽的病、死动物肉类或其制品，或吸入可疑炭疽芽胞杆菌污染的粉尘，或从事与毛皮等畜产品密切接触、与炭疽芽胞杆菌研究使用相关的职业，或在可能被炭疽芽胞污染的地区从事养殖、放牧、耕耘或挖掘等活动。

4.2 临床表现及分型

4.2.1 皮肤炭疽

手、前臂、面、颈等暴露部位的局部皮肤出现不明原因的斑疹、丘疹、水疱，周围组织肿胀及浸润，继而中央坏死形成溃疡性黑色焦痂，焦痂周围皮肤发红，肿胀，疼痛不显著，稍有痒感。典型皮肤损害表现为具有黑痂的浅溃疡，周边有小水疱，附近组织较为广泛的非凹陷性水肿。除皮损外，患者多出现发热、头痛、关节痛、全身不适以及局部淋巴结和脾肿大等症状和体征。少数严重病例，局部呈大片水肿和坏死。

4.2.2 肠炭疽

发热，腹胀，腹部剧烈疼痛，腹泻，通常为血样便或血水样便。可有恶心、呕吐，呕吐物中可含血丝及胆汁。可伴有消化道以外症状和体征。

4.2.3 肺炭疽

高热，呼吸困难，可有胸痛及咳嗽，咳极黏稠血痰。肺部体征常只有散在的细湿啰音。胸部X线的主要表现为纵隔影增宽，胸腔积液。

4.2.4 脑膜炎型炭疽

剧烈头痛，呕吐，颈项强直，继而出现谵妄、昏迷、呼吸衰竭，脑脊液多为血性。多继发于4.2.1~4.2.3，也可能直接发生。

4.2.5 败血症型炭疽

高热、寒战，感染性休克与弥漫性血管内凝血（DIC）表现，皮肤出现出血点或大片淤斑，腔道出血，迅速出现呼吸与循环衰竭。多继发于4.2.1~4.2.3，也可能直接发生。

4.3 实验室检查

4.3.1 患者临床标本，细菌分离培养获得炭疽芽胞杆菌（见附录A、附录B）。

4.3.2 患者血清标本，抗炭疽特异性抗体检测阳性（见附录C）。

4.3.3 患者临床标本，显微镜检查发现大量两端平齐呈串联状排列的革兰阳性大杆菌。

4.3.4 患者临床标本，炭疽芽胞杆菌特异性核酸片段检测阳性（见附录D）。

4.3.5 患者临床标本，炭疽芽胞杆菌抗原检测阳性（见附录E）。

4.3.6 暴露动物标本或暴露环境标本，细菌分离培养获得炭疽芽胞杆菌（见附录A、附录B）。

5 诊断原则

根据流行病学史、临床表现、实验室检查等进行诊断。

6 诊断

6.1 疑似病例

具有4.1，并具有4.2.1~4.2.5的临床表现之一者。

6.2 临床诊断病例

符合下列一项可诊断为临床诊断病例：

- a) 疑似病例，并具有4.3.2~4.3.6中任何1项者；
- b) 具有明确的流行病学史，并具有典型的皮肤损害者。

6.3 确诊病例

符合下列一项可诊断为确诊病例：

- a) 疑似病例或临床诊断病例，并具备4.3.1者；
- b) 疑似病例或临床诊断病例，并具备4.3.2中患者双份血清抗炭疽特异性抗体出现阳转或滴度出现4倍或4倍以上升高者；

c) 疑似病例或临床诊断病例，并具备 4.3.2~4.3.6 中任何 2 项者。

7 鉴别诊断

7.1 皮肤炭疽

炭疽病灶早期有明显水肿，有痒无痛，并不化脓。可与疖、蜂窝织炎、恙虫病的焦痂、羊痘、鼻疽、鼠疫、土拉热、丹毒、梅毒硬下疳、脓性溃疡相鉴别。患者的职业和病畜接触史可供参考。

7.2 肠炭疽

肠炭疽早期应与食物中毒、出血性坏死性肠炎、痢疾、急腹症相鉴别。

7.3 肺炭疽

肺炭疽黏性血痰与大叶性肺炎之泡沫状铁锈色痰相鉴别，并与肺鼠疫、钩端螺旋体病肺弥漫性出血型相鉴别。胸膜炎的积液为血性黏稠液。

附 录 A
(规范性附录)
炭疽标本采集、保存和运输

A.1 患者标本的采集

A.1.1 采集标本时应遵循的原则

A.1.1.1 尽可能在抗生素治疗开始前采集标本。

A.1.1.2 除必要时并在具备操作条件的实验室内，不得用解剖的方式获取标本。所需的血液与组织标本，均应以穿刺方式取得。

A.1.2 血液标本

所有疑似病例，都应无菌操作采集血液标本5 mL，用于显微镜检查、培养、抗原和核酸检测，并留取血清做抗体检测。应在恢复期再次采集血液标本5 mL，留取血清做抗体检测。

A.1.3 皮肤病灶标本

在水疱期，用两根无菌棉签蘸取水疱液；在溃疡期，用两根生理盐水湿润的无菌棉签在皮损处涂抹；在焦痂期，用两根生理盐水湿润的无菌棉签在焦痂处反复涂抹。标本用于显微镜检查、培养、抗原和核酸检测。

A.1.4 粪便与呕吐物标本

表现消化道症状的疑似病例收集粪便或呕吐物标本，特别注意选取其中混有血液的部分，置无菌容器中。标本用于显微镜检查、培养、抗原和核酸检测。

A.1.5 鼻（咽）拭子或痰标本

表现呼吸道症状的疑似病例采集其鼻（咽）拭子或痰液标本，用于显微镜检查、培养、抗原和核酸检测。

A.1.6 脑脊液标本

表现脑膜刺激症状的疑似病例，腰椎穿刺获取脑脊液，标本量1 mL~2 mL。用于显微镜检查、培养、抗原和核酸检测。

A.1.7 尸体标本

死亡病例可通过穿刺心脏获得血液或穿刺肝脏等实质性脏器获得组织标本。用于显微镜检查、培养、抗原和核酸检测。

A.2 动物标本及环境标本的采集

A.2.1 动物组织标本

血液、肉类、内脏等，视具体情况采集，用于培养。

A.2.2 环境标本

采集病死动物血液污染的土壤、水、其他物品等，用于培养。

A.3 标本采集生物安全要求

标本采集时应采取传染病二级防护措施，使用医用防护口罩、医用乳胶手套、工作帽、医用防护服、防护鞋，必要时佩戴防护眼罩/面罩。

A.4 标本保存要求

用于培养和核酸检测的标本于2℃~8℃冷藏保存，低温运输。用于血清抗体检测的血清标本于-20℃以下冷冻保存，保持冷冻运输。

A.5 运输要求

标本或菌株运输应按照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》执行。炭疽芽胞杆菌菌株或活菌培养物，应按UN2814的要求包装和空运，其他相关样本均按UN3373的要求包装和空运；通过其他交通工具运输的可参照以上标准包装。

附 录 B
（规范性附录）
炭疽细菌学检查

B.1 生物安全要求

应按照GB 19489和《人间传染的病原微生物名录》要求执行。

B.2 显微镜检查

所有来自患者或尸体的标本，都应首先立即涂片，革兰染色，进行显微镜检查。如发现大量两端平齐的革兰阳性大杆菌，即可作为诊断依据。

B.3 细菌分离培养

B.3.1 标本处理

皮肤病灶标本、血液、脑脊液、鼻（咽）拭子、痰液、尸检标本、动物组织等标本直接涂布血平板或营养琼脂平板，血液标本也可直接接种血培养瓶。环境标本、粪便及呕吐物标本，用两倍量蒸馏水或生理盐水制成悬液，经自然沉淀除去粗大颗粒物后，所得的悬液取1 mL于65℃加热15 min~20 min后，取100 μL~200 μL涂布平板。

B.3.2 挑选可疑菌落

上述平板在37℃孵育8 h~24 h后，检查是否长出可疑的炭疽芽胞杆菌菌落。炭疽芽胞杆菌菌落的形态为：灰白色、不透明、圆形或不规则形状、表面呈毛玻璃样，低倍镜下菌落呈卷发状。血平板上不溶血或微溶血。

B.4 炭疽芽胞杆菌鉴定

将上述可疑菌落挑出，划线接种于营养琼脂平板，在划线区内一处滴一滴诊断用炭疽噬菌体，另一处贴一片青霉素药敏纸片。37℃孵育8 h~24 h后，在滴噬菌体处有透明噬菌斑，青霉素药敏纸片周围有明显的抑菌环，便可判定接种物为炭疽芽胞杆菌。可疑菌落也可进行核酸检测，检出炭疽芽胞杆菌特异性核酸片段可判定为炭疽芽胞杆菌（见附录D）。

附 录 C
(规范性附录)
炭疽血清学检查

C.1 标本要求

需采集患者急性期和恢复期双份血清进行检测。急性期血清应在首次检视病人时采集，血清分离后首先取少量进行一次抗体检测，其余置-20℃以下保存，待获得恢复期血清后，两份血清再一同进行抗体检测。可采用酶联免疫吸附试验、免疫层析法或其他免疫学方法进行检测。

C.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

C.2.1 试剂选择

可使用商品化试剂盒，按操作说明书进行操作，也可按以下步骤进行操作。

C.2.2 试剂准备

C.2.2.1 ELISA包被液

0.01 mol/L磷酸盐缓冲液 (PBS)，pH7.4：称取8 g NaCl，0.2 g KCl，3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，0.3 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加双蒸水900 mL左右，用HCl/NaOH调节pH至7.4，最后定容至1 000 mL，15 psi (1.05 kg/cm²) 高压蒸汽灭菌。

C.2.2.2 洗涤液

吸取5 mL吐温-20加入995 mL 0.01 mol/L PBS中，混匀。

C.2.2.3 血清稀释液

取0.1 mol/L PBS 20 mL，加双蒸水160 mL，加脱脂奶粉10 g，加1 mL吐温-20，混匀，调节pH至7.4，用双蒸水定容至200 mL。4℃保存，两周内使用。

C.2.2.4 ELISA稀释液

除吐温-20的含量为0.1%外，其他成分与使用要求同血清稀释液。

C.2.2.5 显色液

3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶液即用型。

C.2.2.6 显色终止液 (0.5 mol/L H_2SO_4)

取2.72 mL浓度为98%的浓硫酸，缓慢加入90 mL水中，混匀，加水定容至100 mL。

C.2.3 酶标板包被

本方法检测目标为患者血液内针对炭疽芽胞杆菌保护性抗原的抗体，使用保护性抗原包被酶标板。也可使用其他炭疽芽胞杆菌特异抗原成分包被酶标板，操作方法可按不同试剂盒说明进行调整。将抗原用ELISA包被液稀释至1.0 μg/mL，酶标板所用各反应孔加入100 μL，置4℃包被过夜，7 d内使用。临用前每孔加洗涤液300 μL洗涤3次，每次3 min。

C. 2.4 加入待检血清

C. 2.4.1 样品初筛实验

根据实际情况可略过此步骤，直接进行C. 2.4.2。

血清标本用血清稀释液稀释至1:50加入酶标板，两孔平行检测，每孔100 μL 。每板做试剂、阳性血清和阴性血清对照孔，各3孔平行检测。酶标板置37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育60 min。甩干孔内溶液，每孔加洗涤液300 μL 洗涤3次，每次3 min。

C. 2.4.2 复判实验

初筛实验阳性的血清标本进行复判实验。待检血清首先用血清稀释液稀释至1:50，将稀释好的血清加入酶标板首行，使用两孔平行检测，再用ELISA稀释液倍比稀释，至少稀释至1:3200，每孔100 μL 。每板做试剂、阳性血清和阴性血清对照孔，各3孔平行检测。酶标板置37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育60 min。甩干孔内溶液，每孔加洗涤液300 μL 洗涤3次，每次3 min。

C. 2.5 酶标抗体反应

于各反应孔中加入用ELISA稀释液稀释的工作浓度辣根过氧化物酶标记抗人IgG 100 μL ，置37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育60 min。再用洗涤缓冲液洗涤3次，每孔300 μL ，每次3 min。

C. 2.6 显色

于各反应孔中加入显色液100 μL ，置暗处20 min。每孔加入显色终止液100 μL ，终止显色。

C. 2.7 结果判断

终止显色后30 min内，用酶标仪在波长450 nm处，以试剂对照孔调零后测各孔OD值。阴性血清和阳性血清的OD值应在质控要求的范围内。被检孔OD值大于阴性血清2.5倍的血清，定义为阳性，对应的最大稀释度，定义为阳性滴度。

C. 3 胶体金免疫层析法

C. 3.1 标本准备

检测目标一般为炭疽芽胞杆菌抗荚膜抗体，以患者血清作为标本，按试剂盒说明用生理盐水适当稀释。

C. 3.2 检测

拆开炭疽芽胞杆菌抗体检测试剂的包装，将稀释的患者血清150 μL ~200 μL 滴入加样孔内。2 min后开始观察结果，15 min终止观察。

C. 3.3 判读结果

出现两条紫红色色带，即质控线（C）和检测线（T）均显色为阳性结果；仅质控线显色为阴性结果；无条带出现或仅有检测线出现，说明试剂失效，应更换试剂重新检测。

附 录 D
(规范性附录)
炭疽芽胞杆菌的核酸检测

D.1 聚合酶链式反应 (PCR) 检测炭疽芽胞杆菌特异基因

D.1.1 目标基因

从标本中检测炭疽芽胞杆菌核酸时，以炭疽芽胞杆菌毒素基因和荚膜合成相关基因作为目标基因，也可选择其他特异性基因。

D.1.2 试剂选择

可使用商品化试剂盒，按操作说明书进行操作，也可按以下步骤进行。

D.1.3 参考引物

参考引物序列见表D.1。合成的引物通常为冻干产品，开盖前应进行短暂离心，使用时需要溶解并稀释成储存液。按照10 $\mu\text{L}/\text{nmol}$ 的量加入纯水，即可配制成100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 储存液，用时稀释10倍即为工作浓度（10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）。

表 D.1 PCR 用参考引物序列

目标基因	引物名称	序列 (5' - 3')	扩增片段长度 (bp)
保护性抗原基因	pagA F	ATTGCGGTAACACTTCACT	923
	pagA R	AGACCGTGACAATGATGGAA	
荚膜合成相关基因	cap F	CCTGGTTGTTCTTTCGTTGC	1242
	cap R	CGGATTGTATATGGAGTGGG	

D.1.4 模板制备

D.1.4.1 试剂盒法

原始标本使用商品化基因组DNA提取试剂盒，具体操作方法按试剂盒说明进行。

D.1.4.2 煮沸法

已经分离培养的细菌菌落使用煮沸法进行简易模板制备。细菌接种于营养琼脂平板，37℃培养18 h~24 h；刮取菌苔1接种环（约2 μL ~5 μL ）放入装有800 μL 纯水或TE的1.5 mL离心管内，混匀；100℃加热10 min；12 000 $\times g$ 离心10 min；吸取上清用0.22 μm 滤器过滤；滤液即为PCR模板。

D.1.5 PCR反应体系

一次总量 25 μL 的反应体系包含：酶和缓冲液（2 \times ）12.5 μL ，上游引物（10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）和下游引物（10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）各 1 μL ，待测模板 1 μL ~5 μL ，用纯水补足体积至 25 μL 。

反应设立质控参数：使用纯水作为阴性对照；用已知炭疽芽胞杆菌模板作为阳性对照。加样顺序：首先加入阴性对照，然后加待测模板，最后加入阳性对照。

D.1.6 PCR扩增

95℃预变性5 min；95℃变性1 min，55℃退火1 min，72℃延伸1 min，共30个循环；最后72℃延伸5 min。

D.1.7 PCR扩增产物的检测分析

PCR产物各取5 μL与1 μL上样缓冲液混匀，加入1%琼脂糖凝胶的加样孔内，每块胶上加DNA分子量标准1~3孔，每孔5 μL，6 V/cm 电泳40 min。

PCR产物也可进行测序分析。

D.1.8 结果判读

在紫外透射仪或凝胶成像系统中观察结果，当阴性对照和阳性对照成立时，如炭疽芽胞杆菌的特异基因扩增阳性，则表明标本阳性。当阴性对照和阳性对照不成立时，需更换试剂重新进行检测。测序结果与炭疽芽胞杆菌特异基因序列匹配，表明标本阳性。

D.2 实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-Time PCR）检测炭疽芽胞杆菌特异基因

D.2.1 目标基因

同D.1.1。

D.2.2 试剂选择

可使用商品化试剂盒，按操作说明书进行操作，也可按以下步骤进行。

D.2.3 参考引物和探针序列

参考引物和探针序列见表D.2，引物和探针稀释方法同D.1.3。

表 D.2 Real-Time PCR 参考引物和探针序列

目标基因	引物探针名称	序列 (5' - 3')	长度 (bp)	GC 含量 (%)	T _m 值 (℃)
保护性抗原基因	上游引物 pagA-F	GCGACCGTACTTGAATTCGAA	21	47.6	52.4
	下游引物 pagA-R	TGCGTCGTTCTTGATATTGGT	22	40.9	51.1
	探针 pagA-P	TCCTGCAGATACACTCC	17	52.9	69.4
荚膜合成相关基因	上游引物 cap-F	ATGGTAACCCTTGCTTTGAATTGT	25	36.0	58.0
	下游引物 cap-R	TTGAATCCGTGGTATTGGAGTT	23	39.1	58.4
	探针 cap-P	TTTGCAATTAATCCTGGAACAA	22	31.8	69.6

注：探针 5' 端标记 FAM 荧光基团，3' 端标记淬灭基团

D.2.4 模板制备

同D.1.4。

D.2.5 Real-Time PCR反应体系

一次20 μL 的反应体系包含：酶和缓冲液(2 \times)10 μL ，上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.4 μL ，探针溶液(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ，待测模板1 μL ~5 μL ，用纯水补足体积至20 μL 。

反应设立质控参数：使用纯水作为阴性对照；用已知炭疽芽胞杆菌模板作为阳性对照。加样顺序：首先加入阴性对照，然后加待测模板，最后加入阳性对照。

D.2.6 Real-Time PCR扩增

一般使用两步法进行扩增，参考程序如下：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min；扩增反应95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，40个循环。不同的荧光定量PCR仪扩增的程序会有一些差异，可根据所使用的仪器对反应程序进行适当调整。

D.2.7 结果判定

当阴性对照和阳性对照成立时判断结果，Ct值 <35 时判断为阳性， $35 \leq \text{Ct值} < 38$ 时可适当调整反应体系重新检测，Ct值 ≥ 38 或没有峰值时判断为阴性。当对照不成立时，需重新检测。

附 录 E
(规范性附录)
炭疽芽胞杆菌的抗原检测

E.1 标本要求

以患者病灶分泌物、血、脑脊液、痰、呕吐物、粪便等为标本，可用免疫层析法、ELISA或其他免疫学方法进行检测。

E.2 免疫层析法检测炭疽芽胞杆菌抗原

E.2.1 试剂选择

一般使用胶体金免疫层析法，也可用上转发光免疫层析法，按试剂盒操作说明进行，胶体金免疫层析法可按以下步骤操作。

E.2.2 胶体金免疫层析法检测炭疽芽胞杆菌抗原

E.2.2.1 标本准备

患者临床标本，按试剂盒说明书用生理盐水适当稀释、摇匀，自然沉降后取上清液待检。

E.2.2.2 检测

拆开炭疽芽胞杆菌抗原检测试剂的包装，吸取上述标本处理液150 μL ~200 μL 滴入加样孔内。2 min后开始观察结果，15 min终止观察。

E.2.2.3 判读结果

出现两条紫红色色带，即质控线(C)和检测线(T)均显色为阳性结果；仅质控线显色为阴性结果；无条带出现或仅有检测线出现，说明试剂失效，应更换试剂重新检测。
