

西藏地区土拉弗氏菌病初步调查

郭从厚* 曾庆国* 王舜臣* 石天福* 吴福林* 贾明和#

国内对土拉弗氏菌病(以下称本病)自然疫源地的调查材料尚未见到^[1]。1962年我们在西藏某医院临床诊断为急性淋巴腺炎的病例中,自3例疑似本病的患者,分离出土拉弗氏菌(*Franciscella tularensis*;以下称本菌)3株,首次从细菌学角度证实了本病在西藏的存在。1962~73年曾对本病在西藏地区的自然疫源地范围、人群感染状况、动物宿主和昆虫媒介等,作了初步调查,由宽大硬蜱(*Ixodes liberealis*)和灰尾兔(*Lepus oiostolus*)均分离到本菌,从而为本病在西藏的自然疫源地状况提供了资料。兹报告如下:

材料和方法

一、本菌菌种系引进的苏联株,为光滑型集落,染色性状、对培养基要求及对家兔致病力,符合本菌毒株特点。用标准土拉抗血清凝集滴度为1:1280⁺⁺(后称苏联株)。

二、本菌苗株为Емельянова 155号,由我所于1962年复活,经复查符合本菌弱毒株特点,用此菌制备家兔血清,对苏联毒株凝集滴度为1:1280⁺⁺(后称菌苗株)。

三、标准土拉弗氏菌诊断血清为医学科学院流研所1959年9月制作,滴度为1:1280⁺⁺。

四、培养基:采用Francis葡萄糖胱氨酸兔血琼脂(简称F基),凝固卵黄培养基(简称卵黄基)。

五、布氏菌种:包括无毒布氏菌种(210051)、流产(210011)、猪(210045)及马尔他布氏菌(210035)共4种,诊断菌液按一般方法自制成3种细菌毒株混合液。

六、土拉弗氏菌素制备:采用苏联株接种F基,按苏联生物制品法规汇集的规定及要求^[2],并在感染本病后30天的家兔体表作效力试验,其充血浮肿和红斑直径在3厘米以上。

制备1亿/毫升作皮内变态反应;另制备20亿/毫升作皮上变态反应用。

七、土拉弗氏菌诊断菌液制备:用福尔马林杀死的本菌菌液,按苏联生物制品法规汇集(228页)的要求及规定制成,使用浓度为10亿/毫升。

八、土拉弗氏菌诊断血清制备:采用菌苗株,实验株分别免疫不含土拉抗体的健康家兔获得,效价一般1:1280。

九、人类皮肤变态反应操作方法及结果判定标准^[3~5]:注射0.1毫升(含菌量1000万个)于前臂掌侧皮内,另注射0.1毫升无菌盐水于对侧手臂(对照),结果判定以完全符合下列标准为阳性:

1.注射菌素侧24~48小时,局部有充血水肿浸润,其红斑直径在14毫米以上,界线清楚,48小时无消退;

2.注射处24~48小时红斑中央明显肿胀高出皮肤1毫米以上;

3.常有全身反应(发热或不适)及局部(腋或肘)淋巴腺肿痛,但能排除感染及化脓征象;

4.对照侧24小时完全消退,仅留注射针迹,绝无类似改变;

5.皮肤变态反应阳性者同时作本菌和布氏菌凝集反应,其血清对本菌凝集滴度在1:20以上,而对布氏菌阴性者或对本菌凝集滴度高于布氏菌4倍以上者。

根据我们拟定的上述标准,无论是在临床及流行病学调查中,尚未遇到难以判定或假阳性的情况。

十、人类血清对土拉弗氏菌凝集试验方法:按肥达氏反应进行。

*原西藏军区军事医学研究所,现在成都军区军事医研所

#中国医学科学院流研所

十一、自动物和昆虫分离本菌的方法：对所获啮齿动物材料，按自毙和活鼠两类进行检查。对自毙鼠按常规取脏器材料制成悬液，给小白鼠皮下连续传3代，做细菌学分离。对活鼠取血清做凝集试验，阳性者按自毙鼠方法检验。对体外寄生虫(蜱和革螨)先以70%酒精浸洗3分钟，制成悬液，连续接种小白鼠两代，再做细菌学分离。

十二、自人类病例分离本菌的方法：以患者血液、肿大淋巴结穿刺液及摘除淋巴结组织研磨悬液等材料，直接接种F基及卵黄基，同时接种小白鼠和豚鼠皮下或腹腔。接种的实验动物除解剖观察病变接种培养基外，在动物中盲传3代，仍为阴性后弃去。

结 果

一、人类病例的发现及细菌分离鉴定：

发病经过：1962年10月，于西藏某地发现经常剥食野兔的4人发病。病前2~3日，患者刘(例1)、李(例2)、黄(例3)共剥食野兔3只，1只系扑获，另两只为换取的死兔，死因不明。另1人未剥皮但吃了肉。4人均于3~4日后先后发病，发冷发热，刘、李、黄3人同时有腋肘淋巴结肿痛，门诊诊断为急性淋巴腺炎，注射青霉素3日无效，于病后5日送院，于病程第22日自此3例患者肿大之淋巴结均分离到土拉弗氏菌。另1人当时症状轻微，类似一般上呼吸道感染，3~4日后自愈，经以后调查发现其土拉弗氏菌素皮肤变态反应阳性，血清对土拉弗氏菌凝集效价为1:640(对布氏菌仅1:40)亦证实为土拉弗氏菌病。

菌株鉴定：

1.形态及培养特征：上述病例分离的本菌3株，经福尔马林处理后，姬姆萨及革兰氏染色为阴性小球杆菌，有明显的多形性，大小为1~0.3毫微米，无运动，可见荚膜，在普通琼脂培养基上不生长，在F基上48小时可见生长，4天后形成圆形菌落，最大直径1毫米，最小菌落如针尖，呈浅灰色，用白色滤纸刮下呈黄白乳油状，菌落附着处培养基略带浅蓝绿色暗

影，深约1毫米左右。与菌苗株比较，菌落明显较小(菌苗株4日后最大菌落可达2毫米)，与苏联株、国内通辽株^[6,7]、黑龙江人株和兔株^[8]比较，则菌落大小近似。

2.血清学特性：凝集反应——用分离菌株与标准土拉抗血清及自制的抗血清作玻片凝集，在接触后迅即凝成明显大块，而对照为阴性。用患者恢复期血清，对分离菌株、苏联株、菌苗株作试管内交叉凝集，结果一致。

沉淀反应——用标准血清及患者恢复期血清为沉淀素，用时稀释为1:80；沉淀原为细菌培养阳性的死亡小白鼠心肝脾肾脑及淋巴腺等，研碎加入1.5倍盐水，以正常鼠脏器组织作对照。均用15磅15分钟高压处理和沸水煮5分钟处理，然后1,500转/分离心5分钟，取上清液为沉淀原。沉淀原及沉淀素各0.5毫升加入试管，37°C16~30小时出现结果均为阳性。而对照为阴性。

3.对小白鼠致病力测定：用苏联株与西藏李株比较对小白鼠的致病力，两株各用24只小白鼠，雌雄各半，各皮下注射1、2、3、4、5、10六个微生物剂量，所有剂量均经平板培养校正，结果苏联株最小，全部致死量为1个微生物剂量，西藏李株相同。小白鼠死亡时间为接种后4~6日。

4.对小白鼠、豚鼠、大白鼠及家兔的LD₅₀测定：经过预测后，采用皮下注射方法，以不同剂量攻击小白鼠(体重16~18克)共100只，豚鼠(体重300~400克)50只，大白鼠(体重100~150克)60只，家兔(体重2000~2500克)27只，测定了西藏3株土拉弗氏菌对上述动物的毒力(表1)。说明西藏菌株毒力属于欧亚变种，类似苏联株而不同于美洲株^[11]。

5.抗原分析比较：以琼脂扩散法，对比此3株菌与国内通辽株、黑龙江人株和兔株的抗原和抗血清的交叉反应情况，未见明显差异。

二、1964年在波密县易贡自宽大硬蜱分离2株土拉弗氏菌：

1.地区概况：易贡位于北纬30°东经95°附近，属高山狭谷地形。谷地海拔2,200米，

表 1 西藏三株土拉弗氏菌对动物的毒力测定

菌株	感染剂量(个)	小白鼠			豚鼠			攻击菌量(亿)	大白鼠			家兔	
		动物数	活/死	LD ₅₀	动物数	活/死	LD ₅₀		动物数	活/死	LD ₅₀	动物数	活/死
黄株	10	10	0/10		5	0/5		10	5	4/1		3	3/0
	1	10	2/8	0.37	5	5/0	5	1	5	2/3		3	2/1
	0.1	10	9/1		5	5/0		0.1	5	5/0	2.75	3	3/0
	0.01							0.01	5	4/1			
刘株	100	10	0/10		5	1/4							
	10	10	2/8		5	2/3		10	5	3/2		3	3/0
	1	10	1/9	3.72	5	5/0	6.92	1	5	3/2	2.34	3	3/0
	0.1	10	10/0		5	4/1		0.1	5	4/1		3	3/0
	0.01							0.01	5	4/1			
李株	10	10	0/10		5	0/5		10	5	0/5		3	2/1
	1	10	8/2	2.35	5	2/3	0.17	1	5	5/0	1.25	3	2/1
	0.1	10	10/0		5	2/3		0.1	5	2/3		3	3/0
	0.01							0.01	5	4/1			

周围山高3,000~6,000米不等, 两侧山坡森林密布, 以针叶林为主, 间有成片阔叶林; 气候温和湿润, 雨量充足, 雨季约在每年4月中旬至9月初。小型哺乳类主要有社鼠、白腹鼠、中华姬鼠(*Apodemus draco*)、巢鼠、荷氏褐齿鼯鼠(*Soriculus caudatus*)、锡金长爪鼯鼠(*S. nigrescens*)等。中华姬鼠为优势种, 占捕获数的59.74%。未见野兔。共采获5种蜱, 其中硬蜱3种、血蜱(*Haemaphysalis*)一种和B-oophilno属一种。宽大硬蜱占优势, 其寄主甚为广泛, 包括该地所有被检家畜(牛猪马犬等)及野生动物, 在拖蜱时亦有发现, 中华姬鼠体外该蜱数量最多, 调查期间(9~12月)其逐旬消长情况见表2。据居民介绍每年3~5月蜱数量最多, 雨季后逐减, 第2个高峰在11~12月。

对当地居民、家畜进行了土拉皮肤变态反

表 2 宽大硬蜱逐旬消长情况

旬 别	成蜱数	幼蜱数	指 数
9月下旬~11月上旬			0~1
11月中旬	17	90	5.29
11月下旬	36	207	5.75
12月上旬	32	361	11.28
12月中旬	62	240	3.87
12月下旬	3	3	1.00

应及血清凝集试验调查, 居民变态反应阳性率8.43%, 家畜血清凝集反应阳性率以马、牛最高(表3)。

表 3 当地家畜血清土拉菌凝集反应结果

动物数 (头或只)	阳性数 (%)	阳 性 血 清 滴 度				
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
狗 18	6(33.3)	4	2			
牛 89	72(80.9)	14	42	4	1	1
马 8	7(87.5)	4	1	2		
羊 31	2(6.45)	2				

2. 各种昆虫检菌情况: 收集到各种昆虫分为28组, 其中Trombicula属恙螨6组(1,112只), 分离恙虫立克次体及土拉弗氏菌均为阴性; Laelaps属革螨5组(356只)亦未分离到病原体; 17组蜱中有2组分离出土拉弗氏菌, 其中一组为寄生于中华姬鼠的宽大硬蜱幼稚虫共112只, 另一组为寄生于猪体外的宽大硬蜱成虫共20只, 两组蜱均于接种小白鼠第一代时分离成功。

将此次分离的两株菌与国内通辽株, 黑龙江人株兔株、西藏人株及苏联株的抗原性及毒力进行比较, 未见明显差异, 不赘述。

三、1971年在仲巴县岗久自灰尾兔分离两株土拉弗氏菌:

1. 地区概况及动物组成：岗久疫区处于马泉河南岸的喜马拉雅山脉北麓，海拔约4,400~4,600米、气候寒冷，约在六月中旬至九月初保持无霜，雨季集中在7~8月，年降水量约500毫米。属于高原半干旱草甸草原与草甸地带，沿马泉河的阶地平原上，沙丘、干草原、草甸草原和沼泽草甸相互交替；喜马拉雅山麓中若干小的山间平原、宽谷谷底及部分阴坡较为湿润，植被以草甸为主；阳坡主要为砾石与干草原，阴坡下部有小片灌丛生长。

据以往资料及踏查所见，已知有以下啮齿动物分布：灰尾兔在几乎所有山坡下部及傍山的平地上栖息，尤以灌丛及其附近数量最多，是该地仅有的一种野兔；黑唇鼠兔(*Ochofona curzonae*)在草甸草原中占优势；白尾松田鼠(*Pitimys leucurus*)常与黑唇鼠兔混居，但以湿草甸中多见；西藏鼠兔(*Ochofona tibetana*)只见于灌木丛中；偶可采到藏仓鼠(*Cricetulus camensis*)与斯氏高山鼠(*Alticola stoliczkanus*)；踏查中平均约10公里行程仅可见到1~2个喜马拉雅旱獭洞系，访问始知调查区内旱獭数量很少。

2. 野兔自毙情况及细菌分离：1971这一地区有大量野兔自毙。死兔于5月开始发现，11月初停止，集中在9月初至10月中旬。粗略计算其范围约400余平方公里。在11月中旬至12月上旬进行踏查时，见自毙野兔呈片状分布，多见于山间溪流的两侧及傍山的小河边。对6个密集地段用线路法统计，每平方公里可见残骸16~50余只不等。未见其他啮齿动物自毙。在野兔自毙区域内彼此相距约20公里的两个点上采集的野兔尸骨，带回实验室同时分离到本菌两株。

两株菌经进一步鉴定证实，形态、培养特性和血清学性质均符合西藏人株及蜚株。以分离自易贡的本菌制备的抗血清凝集，效价为1:25,600，与苏联株相同。将此两株经动物传3代后测其对小白鼠及家兔的毒力，未见对家兔的毒力增强，因而亦属于本菌欧亚变种，但能在灰尾兔中引起如此猛烈的流行，是值得注

意的问题。

四、1962~73年对西藏土拉弗氏菌病人感染状况与地理分布的调查：

十余年来，在西藏中部和东部共14个县22个点约24万平方公里境区，随机抽样调查了5,034人。

检出皮肤变态反应阳性者375人，占总调查数7.44%。将阳性者224人同时作了血清对土拉弗氏菌凝集反应，其中221人效价在1:20~1:1,280之间(布氏菌阴性或低于土拉滴度1/4倍)与变态反应结果几近完全一致；另有皮变反应阳性者151人，因故未作凝集反应，但能完全排除假阳性，故一并收入。

各年龄组阳性率不等，其趋势为年龄愈大阳性率愈高(表4)。各邻近年龄组之间阳性率差异并不显著($P > 0.05$)，但在低年龄组与较高年龄组(如31岁以上各组)之间，阳性率有显著或非常显著的差异($P < 0.005$, $P < 0.01$)。31岁以上各年龄组间差别不显著($P > 0.05$)，这可能由于年龄愈大，活动范围增大，接触受染机会增加而致。

表4 阳性率与年龄的关系

年龄(岁)	11~20	21~30	31~40	41~50	51~60	60~
调查数	1,297	1,102	790	656	387	251
阳性数	64	64	62	56	31	29
阳性%	4.93	5.81	7.85	8.53	8.01	11.5

男女性别间，在11~12岁组男性(6.82%)明显多于女性(3.07%)，差异非常显著($P < 0.01$)，其余各年龄组男女间无差异。

调查对象多为半农半牧，职业区分不大，感染率差异也不显著。

已调查地区中，除两个县未能证实外，余均存在本病(表5)，加上野兔检菌阳性(仲巴县岗久)及收治病例证实(八宿县然乌)^[9]，共发现本病于13个县(含市及县级区)23个点存在，故分布面甚广。

讨 论

根据本调查，西藏地区的土拉弗氏菌病疫

表5 西藏居民土拉弗氏菌病皮肤变态反应结果

时间	调查地点	调查数	阳性数	阳性率%
1962	亚东县帕里区	183	1*	
	当雄县当雄	252	3	1.19
	当雄县羊八井	130	1	0.76
	拉萨市北郊	265	4	1.50
1963	澎波县郎当	393	8	2.03
	澎波县家荣	461	11	2.38
	澎波县尼马沟	322	30	9.31
	林周县傍多	233	34	14.59
	林周县唐古	309	22	7.11
1964	林芝县雪巴	132	1*	
	波密县易贡	676	57	8.43
1963	洛隆县孜托	204	45**	22.05
	丁青县	236	3**	1.27
	米乌齐县巴夏	84	4**	4.76
	昌都县俄洛	100	12	12.00
	昌都城区	252	40	15.87
1965	察隅县下察隅	321	16**	4.98
	察隅县上察隅	90	36**	40.00
	察隅县古井	235	41**	17.44
	察隅县吉公	84	2**	2.38
1973	墨脱县背崩	30	0	
	墨脱县墨脱	42	4*	9.52
合计		5,034	375	7.44

* 帕里一名阳性来自澎波，雪巴一名阳性来自沙丁，均不能证明在当地受染。**单做皮肤变态反应，未作土拉弗氏菌凝集试验对照。但能排除因注射而感染者。其余均同时有阳性土拉弗氏菌凝集反应作对照。

表6 景观类型、海拔、与感染率的关系

景观类型	地点举例	海拔(M)	调查数	阳性数	阳性%*
高山草甸草原	当雄、丁青	4,000—4,600	618	7	1.13
宽谷耕地、草甸	拉莎北郊澎波	3,600—3,900	1,119	23	2.06
峡谷灌丛、草甸	林周、昌都、洛隆	3,100—3,600	1,400	183	13.07
亚高山针叶林、草甸	巴夏、古井	3,000—3,500	319	45	14.07
山地针阔混交林	易贡、吉公、下察隅	1,100—2,900	1,213	115	9.48

* $X^2 = 4.93--71.62$

生，可见与居民关系密切。在询问当地皮肤变态反应阳性者的接触史时，几乎都诉说有多次被蜱叮咬的历史，直接接触动物者极少。这一类型中居民感染率在10%左右，明显高于前一类型疫源地，两者差异是非常显著的($P < 0.01$)。但宽大硬蜱的分布范围不如灰尾兔广泛，故本类型疫源地范围可能较局限。

源地如果按照景观类型、地区海拔高度和人群感染率之间的关系来分析(表6)，并结合细菌学材料，大致分三种类型：一是以灰尾兔为主要宿主的疫源地，分布在海拔3,600~4,600米高度，包括两个景观类型，即4,000米以上草原为主要景观；及3,600~3,900米属宽谷耕地与草甸相接，均属于高山草甸与草甸草原地带。这一类型疫源地居民感染率不高，调查中证明一般在2%左右。根据已从灰尾兔检出本菌和临床病例感染方式证明，灰尾兔确为人群受染的主要来源，猎取、接触、剥食野兔是主要方式。人群感染率不高的主要原因是：人口稀少(4,000米以上)地区辽阔，生活上不喜剥食野兔，以及宽谷谷地多为农田，野兔数量减少。鉴于灰尾兔在青藏高原草甸草原上广泛分布[10]，在草甸与灌丛交错的环境中数量居优势，故这一类型疫源地分布范围，可能是相当广泛的。

第二个类型可能是以蜱为人类主要传染来源，分布在海拔1,100~2,900米之间，气候温和湿润，以针阔混交林为主要景观。调查中未见野兔栖息，中华姬鼠为这一类地区的优势动物，其体外寄生的宽大硬蜱成虫和幼稚虫均已分离到本菌。构成这一类型疫源地具重要意义的宽大硬蜱为当地优势种，在家畜体外也有寄

第三个类型是野兔和媒介昆虫都可能使人受染的疫区。分布在海拔约3,000~3,600米之间，以峡谷地形、灌丛和亚高山针叶林景观为主，这里上接草甸草原，下连针阔混交林，既有野兔栖息，也存在姬鼠和硬蜱。地形起伏很大，植被随地形起伏而交错。居民感染率高于上述两类疫源地。但也并非类似景观中都有类

似的感染率，已调查的各点在12~22%不等。对这类疫源地，我们目前尚未获得细菌学直接材料，应是今后调查的重点。其中尤其是洛隆县孜托、昌都市区及俄洛，察隅县古井、林周县的旁多等地，有可能发现新的宿主和媒介。

结 语

本文报道首次以细菌学证实西藏存在土拉弗氏菌病。曾先后自病人(1962)、两组宽大硬蜱(1964)及灰尾兔自毙兔尸(1971)分离到本菌共7株。菌株性状类似奥尔苏非也夫所谓的土拉弗氏菌欧亚变种。1962~73年作者等用皮肤变态反应及土拉弗氏菌凝集反应在西藏24万平方公里范围内调查健康居民5,034人，阳性为375人(阳性率7.44%)。据调查分析，可能存在不同景观，不同传染来源，不同感染方式与

感染率的三类疫源地。

(参加此项工作的还有王明泽、贾安成、尹策、许德馨、曲久文和次仁诸同志)

参 考 文 献

1. 耿贯一主编: 流行病学。上册, 387~402, 下册, 267~275, 1980。
2. 中华人民共和国卫生部生物制品委员会: 苏联生物制品法规汇集(内部资料), 1957。
3. Foshay Lee: J Infect dis, 51:286, 1932。
4. Sase W; Fukushma J Med Sci, 4(4):179, 1957。
5. Philip RN et al: Indian J Inf Dis, 10(3):221, 1962。
6. 孙耀东等: 鼠疫丛刊, (2):4, 1958。
7. 内蒙鼠防所: 鼠疫丛刊, (2):15, 1958。
8. 康成贵等: 流行病学杂志, 1(4):248, 1980。
9. 内部资料, 1971。
10. 高耀亭等: 动物分类学报, 1:19, 1964。
11. 奥尔苏非也夫HF: 苏联自然疫源地考察团文集, 177~196, 1960。
12. 周艾登等: 中华眼科杂志, (1):95, 1965。

《中华放射医学与防护杂志》创刊

中华医学会放射医学与防护学会的学术刊物——《中华放射医学与防护杂志》已于1981年2月创刊。该刊主要发表有关电离辐射生物效应、放射病诊断治疗、放射卫生防护、辐射剂量学、环境放射性监测、剂量监测仪器、防原医疗救护等方面的论著、简报、综述、讲座及学术动态等各类稿件。读者对象为从事放射生物学、放射医学、辐射防护、环境保护、核辐射探测等方面的科技人员、临床医师、高等院校师生、放射性厂矿技安工作人员等。

该刊每逢双月25日出版，每期72页，定价0.6元，国内外公开发售。今年除发行6期外，还出版增刊一册(内容系国际放射防护委员会专家访华学术报告)。目前暂由杂志编辑部办理订阅。现刊及过刊均可直接向编辑部邮购。如从银行汇款请寄：北京市人民银行新街口分理处，帐号：9303；帐户：卫生部工业卫生所；用途栏请写：购杂志。联系人：北京市德胜门外新康街2号《中华放射医学与防护杂志》编辑部郑钧正。