

土拉伦菌病

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

1959.12

目 录

(1) 简 史	1
(2) 病原体	3
✓ 形态和染色特性	4
培养特性及生化反应	5
酶谱性能	7
抵抗力	8
✓ 致病性	10
变 異	13
✓ 噬菌现象	14
(3) 免 疫	15
(4) 致病机制及病理	21
(5) 土拉菌病的临床	26
土拉菌病的临床症状、诊断	27
鉴别诊断	29
实验诊断	31
变态反应	39
(6) 传染源及传播媒介	41
(7) 自然疫源地、传播方式、流行过程	45
(8) 预 防	49
(9) 结 语	50
(附)	
(1) 土拉佐菌苗	51
(2) 土拉佐菌素的制造方法	51
(3) 土拉佐诊断液制造方法	52
(4) 家兔诊断血清制造方法	53
(5) 培养基制造法	53

土拉倫菌病

(1) 簡史

土拉倫菌病是動物病，在自然條件下，主要侵犯野生啮齒動物，后者亦就是本病主要的傳染源。根據巴爾洛夫斯基的意見，土拉倫菌病是自然疫源性，兼性一虫媒傳染病。

廿世紀以前人類不能識別本病。由於醫學及醫學微生物學的發展，美國學者 Mac coy 和 Chapin 氏於 1902 年於加里福尼亞的土拉地區研究了當地的黃鼠 (*Citellus beecheyi*) 中的瘟疫，並從家鼠及黃鼠分離出一種微生物，據地名稱它為土拉菌 *Bacterium tulareense*。以後 1919 年 Francis 氏在美國南部的犹他州，從病人分離到土拉菌，當地居民稱它為“鹿額熱”。1921 年 Francis 氏詳記了該病的臨床症狀並稱它為土拉菌病。

但是不能認為本病是從 20 世紀開始存在，通過歷史病例的追溯考證及近年來世界各國的研究，證明本病很早即廣泛地存在於許多國家。

據歷史文獻材料記載有與土拉菌病類似症狀的疾病。如格 Horne 氏的資料 Orage Bornuys 氏在出版於 1653 年“動物史”一書中記載：在 17 世紀的挪威人群中曾發現一種表現為淋巴腺腫大的疾病；疾病的发生是由於挪威旅鼠 (*Lemmus lemmus*) 所致。因而被稱為 Lemmus 病。Horne 氏於 1896 年，1903 年間發生的挪威旅鼠的瘟疫，從屍體找到微生物斷定是土拉菌病。

大原氏堆刊日本在 1820 年即已存在本病(據 Xorn 氏的調查)，NapuhO 氏在法國發現一種 NapuhO 氏結膜炎 (1899 年) 它當時稱它為“動物傳播的傳染性結膜炎”，目前已證明它是

土拉菌病,而且在许多国家内记载有此病,因它特殊,颇引人注意。

在苏联,据历史资料的记载, 1825 年于 Валмнь 着有 120 名伴有淋巴节肿大之发热病人(据 Чернобаев 氏)。1877 年于阿斯特拉罕近郊发现“轻型鼠疫”的流行, 200 人,未有死亡(据 Мезовицкий 和 Чепнер 氏)。1897 年 Гамачинский 氏在上述地区记载类鼠疫疾患的流行。1903 年在顿河下游发生淋巴腺肿并发热的类似疾病,当地称之为“Маревик”。Грамашевский 氏等认为第一次世界大战期间,在俄法战线上部队中发生的“Вальмь热”,〔地名〕“战壕热”或“五日热”,虽有人认为是立克次体病,实例是土拉菌病。1926 年 Яворов Ваетфери 等首次分离出土拉菌。

法国在 1946 年确证土拉菌的存在(追溯论断 1945 年病例)。

罗马尼亚 1948 年,比利时 1949 年,波兰 1950 年都证实。

土拉菌病的地理分佈:整个美国,加拿大,阿拉斯加,爪哇、日本、意大利、挪威、瑞士、芬兰、突尼斯、澳大利、捷克、德国、北非。以上说明从热带—爪哇到寒带阿拉斯加,在中欧,在北非,在日本和在北美,在许多国家中有保存土拉菌的条件。

在我国尚对此病研究很少, 1957 年内蒙鼠疫所于通过冯金屯黄鼠体内首次分离出土拉菌,必须指出这是在苏联专家 B. B. 舒那也夫的启发帮助下,发现并证实的,遗憾的是对我国历史上是否有类似病例的记载尚无人进行过研究。估计我国鼠疫,轻症腺鼠疫的记载中,或个别的疑似鼠疫的报告中可能

混有土拉菌病之例。

苏联对本病的研究是很深刻的，例如皮内变态反应广泛的应用于早期诊断。自然疫源地的分类（Олцупбев 氏等）。土拉生菌疫苗（Ганецкий 氏）。相信我国由于苏联的帮助，这方面的研究工作将是迅速赶上世界水平的。

(2) 病原体

土拉伦菌，在病原性上、形态学及生化性状以及某些特征和云血性败血病菌群相类似，因本菌亦为啮齿动物败血症致病之一，则应列入巴氏菌属（*Pasteurella tularensis*）中来叙述。但本菌能发酵某些糖类，以此来区别与其极相似，而没有发酵能力的布鲁氏杆菌。而其抗原构造近于布鲁氏杆菌，土拉伦菌与布氏桿菌具有共同抗原性，彼此可以产生类属凝集，因此有学者将本菌列入于布鲁氏杆菌属（*Brucella tularensis*）中来讨论。

H. P. Олцупбев 教授主张：土拉伦菌与上述二属菌有明显区别，所以他提出将土拉伦菌列为单独的属。因此土拉伦菌的全名为 *Francisella tularensis* Mc Coy et Chapin。

土拉伦菌有二个地理变种：美洲变种（新大陆或新北区变种），欧亚洲变种（旧大陆或旧北区变种）。美洲土拉伦菌株与欧亚菌株不同，前者对实验动物及人具有更高的致病性，对某些生化特性亦不同，二变种的主要区别是美洲变种，对家兔有高度致病性，大多数情况不能发酵甘油，传播于美洲。

欧亚洲变种：对家兔致病性较小，大多数不发酵甘油。传播于欧亚洲。

中国所分离之土拉伦菌可能属于欧亚变种，对甘油不发酵。

酶，对家兔的致病性也非常低；皮下接种一亿个菌体家兔尚生存。只有大剂量的接种（十亿）才会引起家兔死亡。

形态和染色特性

土拉伦菌是比较小的球杆菌（ $0.3 \sim 0.5 \mu$ ）还能见到直径为 $0.1 \sim 0.2 \mu$ 的更微小的细菌。土拉伦菌的形态特点是呈多形态的，特别是由于培养基不良时的菌体，在一个视野中可看到呈球形短杆形和椭圆形等。易误认为杂菌，实际是本菌的多形性。此种多形态在毒力越强时表现的就更明显。以动物器官的压印标本可看到小而正圆形菌体。

本菌在培养基上经过传代几次其毒力减弱时，则倾向于单一形态为短小的球杆状。土拉伦菌为革兰氏阴性，不形成芽胞，动物脏器直接涂片时，用特殊染色法，可看到荚膜样物质，但组织染色时无两极浓染现象。不能运动，但根据大原氏等的报告：用镀银法或 *Itiuminor* 染色法，发现菌体一端有短小鞭毛一根。但 Hesselbrock 及 Foshay 二氏之详细讨论得知：鞭毛染色上本菌呈现之鞭毛状物，乃系连接于菌体一端之线状物质云（*J. Bact.*, 49: 209, 1945）我们在实际工作中曾用电子显微镜及镀银的方法，没有发现鞭毛。

本菌对染料着色不均，并比一般细菌的染色性微弱，并且菌体轮廓不清，其原因可能是由于菌体周围有粘液性物质包被。因此用一般的单染色法是染不上去的，必须除去粘性物质而后，再用着色力较强的染料才能染出菌体。

用菌体涂片染色时可用 3—5% 佛尔马林制成菌体悬液，用此菌液来涂片，干燥后再行单染或 Grams 染色法。一般单染色用稀释的复红或龙胆紫，Gimsa 染色时可看到菌体鲜明并且轮廓清晰。

脏器或组织液涂片染色时，可用 3% 过锰酸钾水作用五分钟后，经水充分洗滌，再放于 3% 盐酸酒精中固定五分钟，取出充分水洗，以石炭酸龙胆紫液染色时，则呈现界限鲜明紫色之大小不等形状不一之菌体。不用过锰酸钾水作用也可以，直接用盐酸酒精或酒精和乙醚等量的混合液加以固定，均可清晰的观察到菌体。

用 Gimsa 染色时，也可染上美丽的标本，並常云出现极染色。荚膜染色时可用 Reibiger 氏法，Hiss 氏法是不适当的。涂片干燥不用火焰固定（直接用龙胆紫 10 克，加上 100 毫升甲醛水混合数小时后滤过）用此液染 20~30 秒，迅速水洗干燥镜检。也可用 Bacha 氏法，将可检材料混稀于 2% 的 Congo rot 液中，取此液放到玻璃片上在空气中自然干燥后，再以 1% Wasserblau 溶液 10 毫升再加等量的 3% 盐酸酒精混合液复染之，不用水洗直接镜检，可看到窄的阴性象的荚膜包围在菌体周围。

在染色中必须注意的是诊断土拉伦菌的标本片要干净，在上面不应有丝毫灰尘和染料的沉渣等，因为本菌形态很小，会影响诊断的。

培养特性及生化反应

土拉伦菌是专性需氧菌，生长的至适温度是 $36^{\circ}\sim 37^{\circ}\text{C}$ ，PH 为 6.8~7.2。土拉伦菌在普通培养基和肉汤培养基上不生长。

Mc Coy 及 Chapin 氏，研究应用凝固的卵黄培养基，而成功的分离出土拉伦菌；以后，Francis 氏更改用血液葡萄糖胱氨酸培养基。土拉伦菌在猪肝水培养基上，生长的也很好。琼脂培养基中加入胱氨酸及血液等其他营养物质后，它

才繁殖。

土拉倫菌对培养基的严格要求，可能与酶的数量较少有关，因此对某些物质特别如氨基酸（如胱氨酸），只有在已制成的条件下才能利用。

土拉倫菌在卵黄培养基上生长的特别好，特别用它来直接从动物体分离培养菌时，经48小时，形成柔软的具有光泽的薄膜，表面凹凸不平湿润边缘整齐，有小的露珠状之菌落；呈现黄白色或稍带灰白色。如果培养感染动物血液时菌落周围的培养基稍变白色。

新制成的卵黄培养基上，每次最N的接种量可为1—10个菌；但可能至第十天在试管中才能出现菌的生长。将菌接种在 E MeЛbЯHOBa 培养基上，能很方便的获得单独的集落，菌落呈白色，带有淡青色的暗影，菌落圆形凸出，光滑边缘整齐。当接种菌量较少时，菌落直径能达到1—2 mm 甚至更大。当培养基上接种单个的土拉倫菌落时，亦能生长出菌落，不过只有从接种的第3—5天起才能看出菌落。有毒力的土拉倫菌落，无论在形态方面或在生化特性方面完全符合S型菌的特征（见抗原结构节）。

本菌在 Francis 及猪肝培养基上的生长特性大体同 E MeЛbЯHOBa 培养基上相同。用猪肝水培养基，培养土拉倫菌时，生长的也较好，特别用平板培养以血清代替血液时，观察菌落特别清楚，而生长的也较快。

土拉倫菌在液体培养基上的生长情况不如同本培养基生长得好，且只在培养基的表面可发现菌的生长，看来这与菌的需氧性有关，只有向培养基中加入胶质（卵黄、琼脂等）或增加培养基的通气，培养才能获得良好结果，亦可用鸡胚培养土拉倫菌，但方法复杂，故实际工作中一般不应用。

土拉倫菌的培养物在卵黄和 Francis, 培养基上可在48小时就生长的特别好, 但由动物体或人体分离土拉倫菌时需要5—7天, 甚至更长时间。如果在检验患者时利用直接作分离培养的方法, 是不易成功, 这可能由于人体对土拉倫菌有很大的抵抗性。在人体内土拉倫菌生命活动力的被削弱, 就使得用培养基直接从土拉倫病人身上分离病原体, 发生了很大的困难, 就是用卵黄培养基也不易成功, 因此要从病人分离土拉倫菌必须通过动物加以感染, 敏感动物最适用的是豚鼠、小白鼠。有时通过一代也分离不出菌来, 须传二代或三代以上, 然后才能在培养基上分离到土拉倫菌。在野外调查中所发现的带有土拉倫菌的动物也同样须经过动物试验, 才能得到纯培养的菌。土拉倫菌在由试验动物的脏器直接分离培养时与假疫苗不同, 必须用其组织块直接往培养基表面充分涂抹才能生长, 如果只用白金耳接触一下动物脏器作培养, 是不会生长出土拉倫菌的。

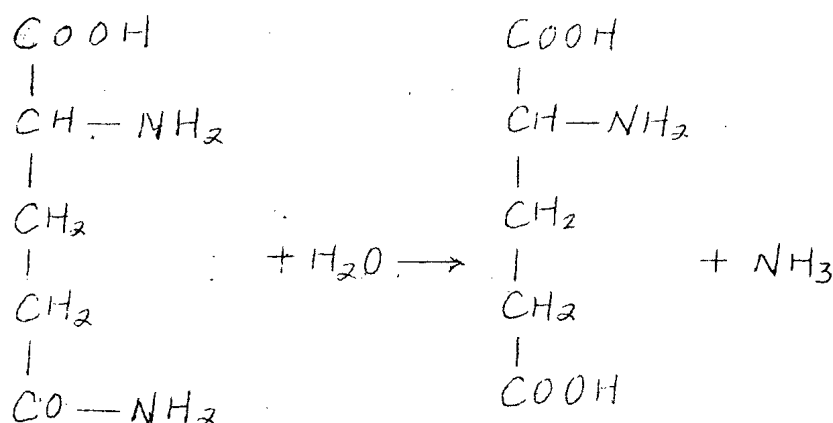
发酵性能:

由于本菌生长甚慢, 故生化反应在细菌诊断上意义是不大的。本菌发酵碳水化合物及醇类的能力较小, 只有在含有少量蛋白并且PH极恒定的固体培养基中, 才能可靠的发现这些特性。

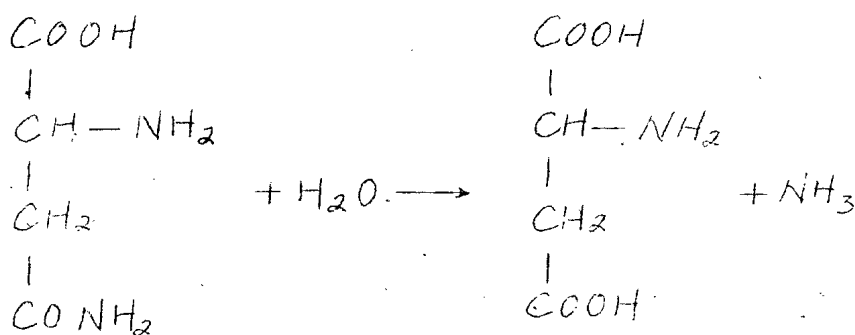
一般土拉倫菌能发酵葡萄糖, 麦芽糖及甘露糖产酸不产气; 对甘油、果糖、糊精的发酵能力是不一。对于乳糖、蔗糖、菊糖、水杨素、山梨醇及鼠李糖, 不能发酵。少量形成硫化氢, 不形成吲哚, 在牛乳及明胶培养基中不生长。

土拉倫菌能还原硫紫(thionin)、美兰、孔雀绿色素等。土拉倫菌有过氧化氢酶、脲素酶(урегуаза), 仅

发现于细菌。谷氨酰胺酶 (TM) Таминаза), 天门冬氨酰胺酶 (аспарагатиназа), 胱氨酸酶 (геза-миназа), 氨基转移酶 (Трансамугаза) 等。以上这些酶的主要作用如: 谷氨酰胺酶, 可使谷氨酰胺水解而生成谷氨酸及氨。



天门冬氨酰胺酶也同样使天门冬氨酰胺水解生成天门冬氨酸及氨。



各种酶的证明方法: 用化学方法测定生成物, 如谷氨酰胺酶就是测定其生成之 NH_3 。

抵抗力:

土拉伦菌对物理作用和消毒剂的抵抗力不强, 直射光下, 其生活力可保存3天。当菌处于0.1 ml ml 厚的液体内部时, 紫

紫外线能在极短期间内杀死土拉伦菌。但菌处于1~1.5厘米厚的壳类中时，紫外线在5小时内不能杀死土拉伦菌。(50个生物剂量)。超声波能杀死土拉伦菌。土拉伦菌对热非常敏感：将菌液加热到 $56^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ ，经30分或 60°C 经5~10分即死亡。

土拉伦菌在消毒剂的作用下很快死亡，1:1000的昇汞水30秒即可杀死。2~3%的来苏儿1~2分，对动物器官24小时。土拉伦菌对酒精的作用特别敏感，不到1分钟的时间菌即死亡。土拉伦菌能在较长的时间生存于水中(但不繁殖)，亦能在低温条件下保存于外界其他的物品上，例如在 4°C 时，菌在水中或潮湿土壤中可保存4个月以上，且毒力不降低。但温度增高时，保存时间亦相应减少，如在 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ，水中的微生物在10~15天中死亡。在 $13 \sim 17^{\circ}\text{C}$ 的自来水或井水中它能生存3个月，在尸体(腐烂)生存4~5天，零下 30°C 时，它仍能生存。土拉伦菌在 0°C 时可保存6个月，在 $8 \sim 12^{\circ}\text{C}$ 时，保5~6天。在 $20 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 时，不超过20天。

在乳及奶油中于 $8 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 时，不超过一夜。而当这些物质冰凉时，可保存3个月。在死于本病的冰凍的动物尸体中，菌可保存3个月以上。当温度增高时，保存期间亦相应缩短。死于土拉伦菌病的动物供兽皮中，在 $8 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 时，病原体能保存一个月以上，在 $32^{\circ}\text{C} \sim 33^{\circ}\text{C}$ 仅保存一星期。土拉伦菌在一定条件下可对抗干燥的作用，如在死于本病之小白鼠的血液及组织液泡的棉絮窝内，在 $13 \sim 21^{\circ}\text{C}$ 下，可在35天内仍有生活力(观察期限)。当没有保护物质时，土拉伦菌对于干燥抵抗力降低，在1~3日内即死亡。土拉伦菌含于病人的分泌物里的时候：如在感染小白鼠皮毛置于室温下，可以保存35~45天。感染之臭虫粪便干了以后能保存20~25天之久。

干燥菌种保存于 10°C 中22年仍可不死。在密封的试管中菌株可以生存1~2个月。

土拉伦菌对甘油有极大的抵抗力。在无菌的未经稀释的中性甘油中感染动物的组织放在甘油中，在 10°C 时，可以保存123天。这种特性可以利用来长途运送材料以备检查。但是必须注意，用甘油不能保存肝脏，因为在肝组织中该菌很快就死亡了，如果把肝脏和其他脏器放在一起，那就连其他组织中的土拉伦菌也会死掉。

Берлиух氏混合剂是保存土拉伦菌更好的保存液。其配制方法是：一分固体石蜡加10分凡士林，可以应用此种保存剂来运送土拉伦的脏器材料。

致病性：

土拉伦菌致病性主要与一种毒性物质有关。这种毒性物质看来是一种内毒素，从菌体细胞中获得纯粹的毒素是相当困难的，因为它们不稳定。

土拉伦菌在易感动物体内的繁殖，引起机体致症性反应，反应主要表现为血管病变，参与及增生，所发生的增生变化主要是形成特异性肉芽肿，后者与结核结缔有许多共同点。肉芽肿发生于病原体定居及繁殖的部位，其中主要是上皮样细胞及淋巴样细胞并混有多形核白血球及组织细胞。在对本病敏感的动物，其组织内形成的肉芽肿发生坏死，而当病程发展严重时，在炎症灶能形成较大的坏死，细菌的繁殖以及肉芽肿的形成发生于淋巴结、脾、肝、骨髓及肺。

土拉伦菌对许多哺乳动物都有致病性，但致病性对各种动物都不是一致的，对本病最易感，且传染敏感性最高的乃是水貂、砂土鼠、小家鼠、鼯鼠等（第一类动物）。对于这些动物

只要皮下注射1个微生物剂量(根据标准的比浊度)就必定引起死亡。动物发生急性败血症,一般于6~10天死亡,更晚者较少见,其内脏器官及血液,为菌严重污染。

黄鼠、海鼠、刺猬等,对本病的敏感性要小(第二类动物)。对于这些动物最小的完全致死量为10亿微生物,但第二类动物对于本病的敏感性较高,只用一个微生物剂量就可使它们感染,这时它们亦发生传染,但经过较轻,实质器官及血液仅稍有微生物污染。经6~8天后,内脏器官的微生物逐渐被肃清,动物恢复健康,它们对再感染有强固的免疫力。

最后,一些食肉动物如猫、狐、鼬等,即使以大剂量感染,疾病亦无明显临床症状,而当以少量感染时,则完全不能使它们感染(第三类动物)。

对有蹄类动物,以及鸟类及冷血动物,土拉伦菌在大多数情况下病原性都很小。

人体的感受性接近第二类动物。土拉伦菌对实验动物有致病性,所以,在检查病人、调查自然疫源地,以及作科学考察时,都可用小白鼠、豚鼠(第一类动物)作细菌学诊断,感染后经3~10昼夜,由明显的败血症而死亡(晚于3~10天者少见)。大白鼠及家兔(第二类动物)对本病敏感性较小,只有当注入大剂量土拉伦菌时,它们才死亡,测定土拉伦菌的毒力,可皮下感染各种剂量,可以看出最小的完全致死量或非全部致死量。当同时应用高度敏感及敏感性较低动物时,可获得极精确的结果。

一般测定土拉伦菌的毒力均用家兔、大白鼠、豚鼠、小白鼠。

以H. T. O'Leary教授的实验举例如下表:

[illegible]

变异

从自然疫源地的齧齿动物，蜱及其它物体和从病人分离出的土拉伦菌，其许多特征（其中亦包括毒力）极为相似。土拉伦菌的区别仅发现于不同的地理变种，即美洲菌株及欧亚菌株间。这说明自然界中土拉伦菌的特性，是发生变化的，不过这种变化的速度相当缓慢。

土拉伦菌在自然条件下的变异，受到许多因素的限制，其中包括：微生物是严格的寄生物，它不能在外界环境（水，土壤等）繁殖，主要通过吸血节肢动物传播，后者保证了在自然选择过程中，生存的仅是最有侵袭力的微生物（因为只有强毒的菌才能抵抗机体的保护作用，并有足够的菌侵入血液，后者足以使吸血节肢动物，并有效的传播本病）等。

土拉伦菌在人工培养基上培养时，土拉伦菌的毒力减弱，并从毒力S型变成无毒力R型，这过程与微生物于机体外人工所造成的新的生存条件相符合。变异的特征是菌落的透明度较小，菌落变得更透明，菌丧失V_i抗原复合物，菌体变大（约大1~2倍），但菌仍保持其球菌形态。其R型主要的培养特性，特别是对培养基的要求，在培养基上生长的性质，酸酵碳水化合物及醇类的特点，亦几乎仍然与S型相同。

菌苗菌株乃是毒力S型至无毒力R型间之变异型，我们可把它称为SR型。它们对本病敏感的动物（第一类动物）还保存残存的毒力。在菌落的结构上接近S型。有残存的V_i抗原复合物。但菌体细胞明显比毒力菌细胞大。将SR型接种敏感动物，可逐渐增高其毒力。阐明土拉伦菌变异的规律，乃是研究菌苗的基础。

噬菌現象：

土拉倫菌的噬菌現象，研究得極少。A. A. BOLOBOPU
(1935年)曾从豚鼠的卵黃培养基上获得噬菌体。在血液琼
脂葡萄糖脱氨酸培养基上接种土拉倫菌后，噬菌体可引起噬菌
斑。其后各研究者，亦曾观察了土拉倫菌培养物中的噬菌現象
，但到现在为止，还没有有人能分离出具有高度效力的噬菌体
株。

(3) 免疫

抗原結構及免疫反应

土拉倫菌除具有与布氏桿菌之共同抗原成份之外，尚具有种特异性抗原 (SPEC:ISSPEC:fi cartigen)，其免疫血清使用布氏桿菌吸收以后，将其共同抗原相对之抗体除去以后，仍可將本菌凝集故也。土拉倫菌与布氏桿菌在抗原結構上有近似，这可用下点証明：高效的土拉倫菌凝集血清能与布氏菌发生低价凝集，而布氏菌血清亦能与土拉倫菌凝集。

A. L. Litzki, et al (Schweiz. Z. Path. Bakt, 22: 506—510, 1959) 用丙酮处理的干燥菌体制成菌悬液后用超声波破坏菌体，再作扩散反应，结果如下表：

血 清 \ 抗 原	H.aegypt. 128a	H.influenzae	P.tular	P.pestis EV76	P.pest.TS	Br.suis
H.aegyptius 128a	10	5	1	1	1	—
H.influenzae 1	6	7	—	—	—	—
H.influenzae 2	6	6	—	—	—	—
P.pestis EV76	3	1	—	8	8	—
P.pestis TS	—	1	—	8	8	—
P.tularensis	2	—	5	—	—	—
Br.suis	—	—	—	—	—	6

R. A. Obmsbee, et al 报告：用琼脂扩散方法分析土拉倫菌至少有4~6种抗原 (J. Immunol, 74: 351-370 1955)。

到现在为止人们还不知道土拉倫菌是否分成几个血清型。