

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.2

一例牛源致病型大肠杆菌的分离鉴定

刘雪松, 朱庆贺, 杨旭东, 张 艳, 陈 曦, 王 爽, 王观悦, 穆永才, 罗天瑶, 史同瑞*

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2020-05-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0006-07 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为确定导致黑龙江省哈尔滨市周边某牛场犊牛出现腹泻症状的病原, 对病死犊牛进行剖检, 无菌采集其相关病料。试验对采集的病料进行病原菌的分离培养, 通过革兰氏染色镜检、生化特性考察、PCR 鉴定以及动物致病性试验的方式确定病原菌种类, 并对分离出来的病原菌进行药敏试验。结果表明: 引起该牛场犊牛腹泻的病原菌为含有毒力基因 K99 的产肠毒素性大肠杆菌 (ETEC), 该株细菌对氨苄西林、头孢曲松以及头孢噻肟敏感, 对环丙沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星以及四环素耐药, 对庆大霉素和土霉素处于中介状态, 说明分离出的大肠杆菌具有较强致病性, 用氨苄西林、头孢曲松以及头孢噻肟可以对其引起的疾病进行治疗。

[关键词] 犊牛腹泻; 致病性大肠杆菌; 毒力基因; 生化鉴定; 药敏试验; 动物试验

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of *Escherichia coli* from Calf

LIU Xue-song, ZHU Qing-he, YANG Xu-dong, ZHANG Yan, CHEN Xi, WANG Shuang,

WANG Guan-yue, MU Yong-cai, LUO Tian-yao, SHI Tong-rui*

(Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China)

Corresponding author: SHI Tong-rui, E-mail: systr@sina.com

Abstract: In order to determine what kind of pathogenic bacteria causes diarrhea of calves in a cattle farm around Harbin City, Heilongjiang Province, the dead calves were dissected, and the related disease materials were collected aseptically for isolation and culture of pathogenic bacteria, gram staining microscopy, investigation of biochemical characteristics, PCR identification and animal pathogenicity test. The drug sensitivity test was carried out on the isolated pathogens to provide scientific basis for clinical medication. The results showed that the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with virulence gene K99 was the pathogen causing diarrhea of calves. The strain was sensitive to ampicillin, ceftriaxone and cefotaxime, resistant to ciprofloxacin, enrofloxacin, levofloxacin and tetracycline. Gentamicin and oxytetracycline were intermediated. The results indicated that the isolated *Escherichia coli* had strong pathogenicity, ampicillin, ceftriaxone and

基金项目: 黑龙江科研机构创新能力提升专项“兽药新药新品种开发”(YC2016D004)

作者简介: 刘雪松, 助理研究员, 硕士研究生, 从事兽药研究。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

cefotaxime could be used to treat the disease.

Key words: calf diarrhea; pathogenic *Escherichia coli*; virulence gene; biochemical identification; drug sensitivity test; animal test

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 俗称大肠杆菌,属于肠杆菌科、埃希氏菌属,一种兼性厌氧、两端钝圆、革兰氏阴性短杆菌,几乎是所有动物肠道内的常在菌。但随着研究的不断加深,发现了一些大肠杆菌是有致病性的^[1],可引起多种动物疾病。致病性大肠杆菌可以引起犊牛腹泻,这种病发病急且具有传染性,2~3 日龄犊牛最易感染。本病又被称为牛白痢,一般在气温多变的冬末春初发病率较高^[2]。致病性大肠杆菌携带的毒力因子种类较多,其致病性也来源于多种毒力因子的相互作用。目前确定致病性大肠杆菌毒力因子主要有黏菌素菌毛、肠毒素、LEE 毒力岛、志贺毒素以及溶血素等。不同种致病性大肠杆菌所携带的毒力基因是不同的,因此可以通过 PCR 技术对致病性大肠杆菌进行分类。根据相关研究表明,产肠毒素性大肠杆菌 (ETEC) 目前是导致犊牛腹泻最常见的致病性大肠杆菌。目前牛源性致病性大肠杆菌所携带的毒力基因包括 K88、K99、F17 以及 F41 等^[3-4]。

2018 年 11 月黑龙江省哈尔滨市某牛场犊牛出现腹泻症状。患病犊牛出现暴发性腹泻,已导致 3 头犊牛死亡。本试验从该牛场送检病死犊牛器官中分离细菌,并通过生化试验、16S rRNA 基因序列测定、毒力基因测定等方法对该株细菌进行鉴定,通过药敏试验筛选出这株细菌的敏感药物,旨在为帮助该牛场治疗犊牛腹泻提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 无菌采集来自哈尔滨周边地区某牛场中死亡犊牛的病料,包括小肠、大肠、瘤胃、肝脏以及脾脏等。

1.1.2 试剂与仪器 伊红美蓝培养基、麦康凯培养基,北京奥博星生物技术有限公司生产。MH 培养基,广州鸿泉生物科技有限公司生产。50 × TAE,北京索莱宝科技有限公司生产。革兰氏染色

液,郑州理利生物工程有限公司生产。药敏纸片、生化试验管,杭州滨和微生物试剂有限公司生产。Taq Master Mix、DNA Marker,大连 Takara 公司生产。DNA 提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司生产。Bio-Rad 梯度 PCR 仪,伯乐生命医学产品有限公司生产。凝胶图像处理系统,青岛科易伟业生物有限公司生产。

1.1.3 试验动物 清洁级昆明雌鼠 10 只,40 日龄,体重大致在 22~25 g,购自哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 病原分离培养 分别无菌取病死犊牛的小肠、大肠、瘤胃、肝脏以及脾脏接种于麦康凯和伊红美兰琼脂平板上,37℃ 条件下培养 12 h,再挑取菌落形态特征明显的单菌落,划线传代培养,连续培养 3 代后挑取单菌落进行革兰氏染色,显微镜观察细菌形态。

1.2.2 生化试验鉴定 对分离出来的菌株进行相关生化试验,包括麦芽糖、甘露糖、VP、吲哚、尿素酶、乳糖、L 鼠李糖、间肌醇以及葡萄糖。

1.2.3 分离菌株的 PCR 扩增和测序 根据相关文献^[5],合成大肠杆菌 16S rRNA 的通用引物。菌液为模板提取 DNA,用细菌 16S rRNA 的通用引物,进行 PCR 扩增。引物序列如表 1 所示。

表 1 16S rRNA 通用引物序列

Tab 1 16S rRNA universal primer sequence		
引物	引物序列 (5'-3')	扩增长度/bp
16S rRNA	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1543
	R:TACGGTTACCTTGTTACGACTT	

1.2.4 毒力基因的测定 根据相关参考文献中的引物序列设计 CS31A、K88、K99、F17 以及 F41 等毒力基因引物^[6-7]。已提取的细菌 DNA 为模板进行扩增。引物序列如表 2 所示。

表 2 毒力基因引物序列

Tab 2 Primer sequence of virulence genes		
引物	引物序列(5' -3')	扩增长度/bp
F17	F:GGGCTGACAGAGGAGGTGGGGC R:CCCGGCGACAAC TTCATCACCGG	411
F41	F:GCATCAGCGGCAGTATCT R:GTCCTAGCTCAGTATTATCACCT	380
K88	F:GATGAAAAAGACTCTGATTGCA R:GATTGCTACGTT CAGCGGAGCG	841
K99	F:TATTATCTTAGGTTGGTATGG R:GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC	314
CS31A	F:GGGCGCTCTCTGCTTCAAC R:CGCCCTAATTGCTGGCGA	402

1.2.5 动物致病性试验 试验小鼠分为试验组和对照组,每组 5 只。试验小鼠在试验前适应环境一周。在试验前 24 h 禁食、禁水。根据相关文献^[3],将分离菌种进行培养,并对试验组小鼠进行腹腔注射。每只小鼠注射量为 1.5×10^9 CFU/只。对照组注射无菌生理盐水。

1.2.6 药敏试验 按照 CLSI 相关指导^[8]进行药敏试验。将分离得到的菌株用 MH 肉汤进行培养,用麦氏比浊仪将细菌浓度调整到 0.5 麦氏单位。将调整好的菌液均匀涂抹于 MH 琼脂平板上。将药敏纸片均匀的放置在涂抹细菌的平板上,两纸片之间圆心的距离不少于 24 mm,每个平板放置不超

过 5 个纸片。质控菌株为 ATCC25922。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与形态观察 分离出来的细菌在麦康凯培养基上呈现粉红色菌落。在伊红美兰琼脂培养基上菌落呈现黑色带金属光泽、边缘整齐、光滑湿润的菌落。挑取菌落进行革兰氏染色,通过镜检观察到阴性杆菌,多散在,两端稍钝圆(图 1)。

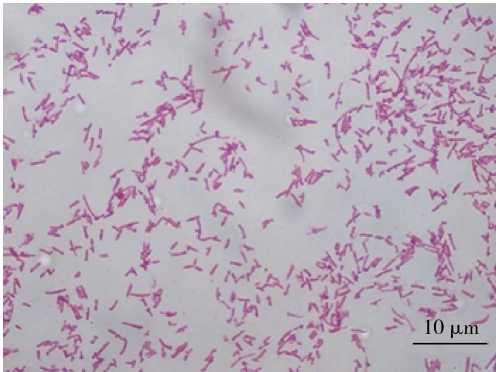


图 1 分离菌株镜检(10 ×100)

Fig 1 Morphology of isolates in the microscope(10 ×100)

2.2 生化鉴定 生化鉴定结果如表 3 所示。分离出的细菌能发酵乳糖,发酵葡萄糖产酸产气,发酵麦芽糖、甘露醇。吡唑试验、鼠李糖试验为阳性,VP、尿素酶以及间肌醇试验为阴性。分离细菌的生化特性与大肠杆菌生化特性相一致。

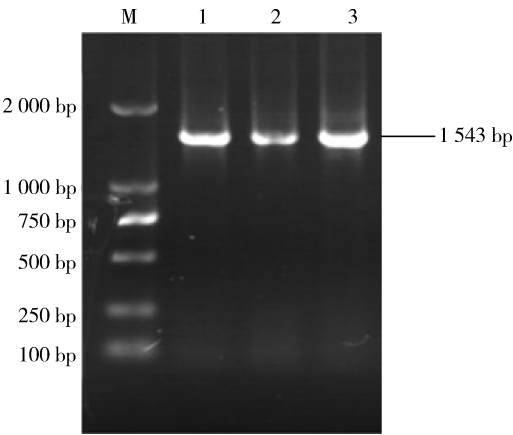
表 3 生化试验结果

Tab 3 Results of biochemical test									
生化试剂	麦芽糖	甘露醇	VP	吡唑	尿素酶	乳糖	L 鼠李糖	间肌醇	葡萄糖
结果	+	+	-	+	-	+	+	-	+

2.3 PCR 鉴定 分离菌株通过 DNA 提取试剂盒,提取出 DNA 模板。提取的 DNA 模板经合成 16S rRNA 通用引物进行扩增,凝胶电泳后,在 1543 bp 处获得明显的条带(图 2),复合预期大小。用胶回收试剂盒进行回收测序后,用 NCBI 的 Blast 功能进行比对,发现其与 GenBank 上已知的大肠杆菌 16S rRNA 序列同源性为 98% ~99%。结合生化试验与序列比对结果,确定该株分离菌株为大肠杆菌。

2.4 毒力基因鉴定 以分离出的细菌的 DNA 为模板,检测该株细菌是否具有 K88、K99、F17、F41 以及 CS31A 毒力基因。经过试验发现,该株细菌携带 K99 毒力基因,未检测到其他毒力基因,如图 3 所示,为产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)。

2.5 动物致病性试验 腹腔注射菌液的小鼠在注射完的 6 h 后,出现精神沉郁、颤栗等症状;8 h 后,小鼠排稀便;24 h,小鼠全部死亡。对死亡小鼠进

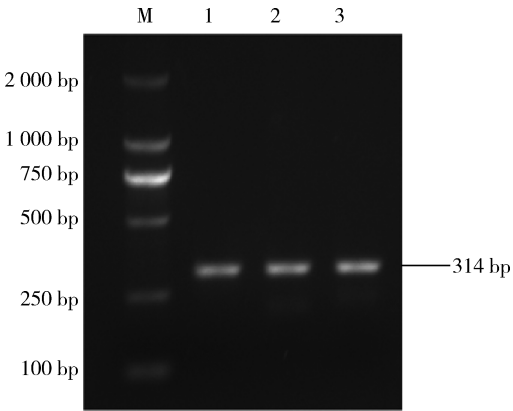


M. DL2000 Marker;1. 阳性对照 1;2. 阳性对照 2;3. 分离菌株

M. DL2000 Marker;1. Positive control 1;
2. Positive control 2;3 Isolated bacteria

图 2 细菌 16S rRNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 2 Results of bacterial 16S rRNA agarose gel electrophoresis



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照 1; 2. 阳性对照 2; 3. 分离菌株

M. DL2000 Marker; 1. Positive control 1;
2. Positive control 2; 3. Isolated bacteria

图 3 K99 基因 PCR 鉴定结果

Fig 3 Identification of K99 gene by PCR

行剖检,发现小鼠腹水增多,胃扩张鼓气,肠道积液,肠系膜充血,病变情况如图 4 所示。无菌采集病死小鼠的器官接种于麦康凯以及伊红美蓝培养基上。发现分别长出了粉红色菌落和带有金属光泽的菌落。可以认为是腹腔注射的大肠杆菌导致了小鼠的死亡。对照组小鼠注射了生理盐水,身体状况良好,无死亡现象。



图 4 小鼠病变情况

Fig 4 Pathological changes in mice

2.6 药敏试验结果 药敏试验结果如表 4 所示。将药敏试验结果与 CLSI 相关文件^[10]进行对比,发现这株大肠杆菌对氨苄西林、头孢曲松以及头孢噻肟敏感,对环丙沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星以及四环素耐药,对庆大霉素和土霉素素处于中介状态。

表 4 药敏试验结果

Tab 4 Results of drug sensitivity	
药敏片	抑菌环直径/mm
环丙沙星 (CIP,5 μg)	11.5 ± 2.39
恩诺沙星 (ENR,5 μg)	10.3 ± 1.15
氨苄西林 (AM,30 μg)	15.6 ± 1.15
头孢曲松 (CRO,30 μg)	25.7 ± 3.51
头孢噻肟 (CTX,30 μg)	30.5 ± 2.71
庆大霉素 (GM,15 μg)	13.4 ± 1.91
左氧氟沙星 (LVX,5 μg)	9.65 ± 0.71 mm
四环素 (TE,30 μg)	9.4 ± 2.35
土霉素 (OT,30 μg)	13.2 ± 1.41

3 讨论与结论

引起犊牛腹泻的因素有很多,根据其发生的原因不同,大致可以分为消化不良性腹泻以及传染性腹泻。传染性腹泻包括细菌、病毒以及寄生虫性腹泻^[9]。细菌性犊牛腹泻的病原菌很多,包括了大肠杆菌、沙门氏菌以及产气荚膜梭菌等^[10]。通过大

量的试验证明,在细菌性的腹泻病中,致病性大肠杆菌引起的腹泻病居多^[11],给相关养殖业造成了巨大影响。根据毒力因子、致病机理以及流行病学特征可以将致病性大肠杆菌分为五类,为产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(EHEC)、肠致病性大肠杆菌(EPEC)、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)以及肠粘附性大肠杆菌(EAEC)^[12]。目前主要应用 PCR 技术对相关毒力基因进行检测,来对大肠杆菌进行分型。其中 ETEC 主要检测的毒力基因为 K88、K99、F17 及 F41 等,EPEC 为 bfpA 基因,EHEC 主要检测 eaeA 以及 irp2 基因^[13-15]。通过检测致病性大肠杆菌所携带的毒力基因,可以迅速为大肠杆菌进行分型,了解其致病机理以及对其治疗方案提供科学依据。张震等研究发现,在黑龙江部分牧场致病性大肠杆菌毒力因子的调查与分析中,ETEC 菌株的检出率占比为 76.09%^[6]。经过流行病学调查已经证明,ETEC 是导致犊牛腹泻最常见的大肠杆菌,其致病性与毒力因子密切相关,其中就包括了黏附素性菌毛以及肠毒素。ETEC 被证实在进入机体后会依靠菌毛定殖于小肠黏膜进行繁殖,并分泌肠毒素,干扰正常的代谢,引起腹泻等症状,严重者可造成死亡^[16]。菌毛 K99 最早分离于腹泻的犊牛和羔羊,是 ETEC 常见的菌毛之一^[17]。本次从病死犊牛的体内检出的致病性大肠杆菌携带的毒力基因为 K99,属产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)。本次试验对分离出来的致病性大肠杆菌进行了分型,了解该株细菌的大体致病机理,为今后的治疗提供了一定的理论依据。

药敏试验可以为治疗某种病原菌造成疾病的临床用药提供依据。药敏试验结果显示,本次分离出来的致病性大肠杆菌对氨苄西林、头孢曲松以及头孢噻肟敏感,对恩诺沙星、环丙沙星、左氧氟沙星以及四环素展现出了耐药性,这可能与这些抗生素多年来的使用有关系。根据王宏、杨斯琴等对牛源致病性大肠杆菌耐药情况的研究^[18-19]可以看出,细菌的耐药性问题逐渐呈现出来,多重耐药的情况逐渐加重。研究表明,牛源致病性大肠杆菌对恩诺沙星、环丙沙星、庆大霉素、多西环素等抗生素展现

出较为强烈的耐药性,一些菌株多重耐药性情况严重,少则为 4 重耐药,多则达到 17 重耐药^[20],这对以后具有多重耐药性细菌的治疗会带来许多阻碍。面对这种情况,许多专家提出了解决方案,如抗生素的轮流使用、联合用药以及通过 PK/PD 模型对药物的剂量以及给药间隔重新进行评定^[21]等,其中通过 PK/PD 模型对现有以及正在研发的抗生素提供具有科学依据的给药剂方案被广泛使用^[22]。PK/PD 模型与其他模型以及软件的联用为今后抗生素的合理使用提供了一种新的方向。通过相应的药敏试验与 PK/PD 模型的联用会为减缓细菌耐药性的产生做出巨大贡献。

本试验从牛场病死犊牛体内中分离出了致病性大肠杆菌,通过毒力基因检测以及药敏试验确定了该株细菌的分型以及对何种抗生素敏感,为治疗这株细菌引起的犊牛腹泻提供合理的依据。与以往的细菌鉴定试验相比,本次试验测定了相关的毒力基因,从基因角度证明了该株大肠杆菌的致病性。

参考文献:

- [1] 刘少昆. 京津部分地区犊牛腹泻大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
Liu S K. Identification of calf diarrhea in some areas of Beijing and Tianjin and drug resistance of *E. coli* isolated[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [2] 王丽华. 犊牛大肠杆菌病的综合防治[J]. 中国动物保健, 2012, 11(9): 51-52.
Wang L H. Comprehensive control of colibacillosis in calves[J]. China Animal Health, 2012, 11(9): 51-52.
- [3] 宋美英. 致病性牛源大肠杆菌毒力基因分子流行病学调查和耐药突变选择窗的应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
Song M Y. Detection of virulence genes, antibiotic resistance and mutant prevention concentration of pathogenic *E. coli* isolated from cattle[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [4] 周虹, 朱军, 朱国强. 动物源产肠毒素大肠杆菌(ETEC)黏附素研究进展[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 679-686.
Zhou H, Zhu J, Zhu G Q. Fimbriae of animal-originated enterotoxigenic *Escherichia coli* - A review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 679-686.

- [5] Cheng D, Sun H, Xu J, *et al.* PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 115(4): 320–328.
- [6] 张震, 宋美英, 只勇, 等. 黑龙江省部分牛场致病性大肠杆菌毒力因子的调查与分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(2): 160–166.
- Zhang Z, Song M Y, Zhi Y, *et al.* Investigation and analysis of the virulence factors of pathogenic *Escherichia coli* from some cattle ranches in Heilongjiang Province[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(2): 160–166.
- [7] Zhang W, Zhao M, Ruesch L, *et al.* Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 123(13): 145–152.
- [8] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Fourth Edition and Supplement, VET01A4E and VET01S2E PA; Clinical and Laboratory Standards Institute [Z]. 2013.
- [9] 高睿. 陕西省犍牛大肠杆菌性腹泻的流行病学调查及初步免疫试验[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- Gao R. Epidemiologic investigation and primary immunologic test of cattle *Escherichia coli* diarrhea in Shanxi Province[D]. Yangling: Northeast A&F University, 2008.
- [10] 刘明春, 于立辉, 何剑斌, 等. 犍牛腹泻病原菌的分离鉴定及敏感药物筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(12): 42–46.
- Liu M C, Yu L H, He J B, *et al.* Isolation and identification of calf diarrhea pathogens and screening of sensitive drugs[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2005(12): 42–46.
- [11] 方光远, 张莉, 陆宇超, 等. 犍牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定和耐药性检测[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9): 273–277.
- Fang G Y, Zhang L, Lu Y C, *et al.* Isolation, identification and resistance testing of *E. coli* isolated from diarrheal calves[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 41(9): 273–277.
- [12] 张力国. 牛源大肠杆菌毒素基因、黏附素基因、O 血清型及耐药性调查[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- Zhang L G. Investigation of toxin gene, adhesin, O serotype and drug resistant of cattle *Escherichia coli* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [13] Valat C, Forest K, Auvray F, *et al.* Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine *Escherichia coli* [J]. Applied Environmental Microbiology, 2014, 80(23): 7230–7234.
- [14] 孟相秋. 黑龙江省犍牛腹泻粪便中大肠杆菌的毒力基因和耐药性调查[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- Meng X Q. The investigation of virulence genes and antibiotic resistance of *E. coli* strains isolated from feces of calves with diarrhea in Heilongjiang Province [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.
- [15] Bugrael M. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 1–10.
- [16] 张雪寒, 何孔旺, 张书霞. 产肠毒素性大肠杆菌肠毒素的研究概况[J]. 动物医学进展, 2003, 24(03): 39–41.
- Zhang X H, He K W, Zhang S X. Research survey of enterotoxin in enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(03): 39–41.
- [17] 张永红, 崔德凤, 李焕荣, 等. 大肠杆菌 K99 菌毛抗原的制备及其免疫抗体效价的测定[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(12): 10–16.
- Zhang Y H, Cui D F, Li H R, *et al.* Preparation of fimbriae antigen of *Escherichia coli* K99 and determination of its immunoantibody titer [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2003, 39(12): 10–16.
- [18] 王宏. 牛源大肠杆菌耐药性及耐药机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- Wang H. Study on antibiotic resistance and resistant mechanism of bovine *E. coli* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011.
- [19] 杨斯琴, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 内蒙古呼和浩特市牛源致病性大肠杆菌的血清型、毒力基因检测及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(10): 761–764.
- Yang S Q, Aori G L, Wang C J, *et al.* Prevalence of serotypes virulence genes and antimicrobial susceptibility of bovine pathogenic *Escherichia coli* isolates in Inner Mongolia [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 37(10): 761–764.
- [20] 纪亚楠. 牛源性大肠杆菌耐药基因流行病学调查及耐药突变选择窗的应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- Ji Y N. Epidemiological investigation of drug resistance genes of bovine-derived *E. coli* and application of drug resistance mutation selection window [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.3

HPLC 法同时测定复方磺胺间甲氧嘧啶钠粉中磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶的含量

梁劲康, 张桂君, 黎健业, 吴志玲, 黎乃添, 方炳虎*

(广东温氏大华农生物科技有限公司, 广东云浮 527400)

[收稿日期] 2020-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0012-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为建立同时测定复方磺胺间甲氧嘧啶钠粉中磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶的高效液相色谱方法, 采用 ECOSIL 120-5-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸溶液 (20:80, V/V) 为流动相进行洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C, 进样量为 20 μL。结果表明, 磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶色谱峰峰型良好, 均能达到完全分离。磺胺间甲氧嘧啶和甲氧苄啶分别在 0.10077 ~ 100.77 μg/mL 和 0.10036 ~ 100.36 μg/mL 范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.999$)。精密度和稳定性等考察结果的相对标准偏差 (RSD) 均小于 2.0%; 而磺胺间甲氧嘧啶和甲氧苄啶的平均加样回收率分别为 98.68% ~ 100.01% 和 98.84% ~ 99.94%, RSD 也均小于 2.0%, 均符合方法学要求。采用建立的高效液相色谱法测定了 5 份供试品中磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶的含量, 结果均符合规定, 且与原质量标准方法的测定结果无显著性差异。建立的高效液相色谱法能够用于定量测定磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶的含量。

[关键词] 磺胺间甲氧嘧啶钠; 甲氧苄啶; 高效液相色谱法; 含量测定

作者简介: 梁劲康, 硕士, 从事兽药新剂型与新技术研究。

通讯作者: 方炳虎。E-mail: fangbh@scau.edu.cn

[21] Toutain P L, Lees P. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2004, 27(6): 466-471.

veterinary field: dose optimization and drug resistance prediction [J]. Journal of Biomedicine Biotechnology, 2016 (16): 1-12.

(编辑: 李文平)

[22] Ijaz A, Huang L, Hao H, et al. Application of PK/PD modeling in