

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.05.06

中药精液消毒剂的消杀效果及安全性评价研究

范建华^{1,2}, 赵华轩^{1,2}, 李尚民^{1,2}, 蒋一秀^{1,2}, 孙常法³, 姚勤光³, 窦新红^{1,2*}

(1. 江苏省家禽研究所, 江苏扬州 225003; 2. 江苏省家禽遗传育种重点实验室, 江苏扬州 225003;

3. 江苏康世源药液有限公司, 江苏新沂 221400)

[收稿日期] 2020-02-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 05-0041-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了解新研制的中药精液消毒剂的消毒效果和安全性, 本研究开展了体外抑菌杀毒和安全性综合评价实验。体外药效学实验显示: 该消毒剂对大肠杆菌高敏, 对门氏菌、禽巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌均中敏, 4 种菌的体外 MIC 值分别为 31.3、62.5、62.5 和 31.3 mg/mL; 消毒剂按 1:400 及以上浓度与新城疫病毒互作, 可在 5 min 内对该病毒有 100% 杀灭率。安全性评价实验显示: 该消毒剂的小鼠急性毒性 LD₅₀ 值 > 5000 mg/Kg, 无毒性; 对兔子的皮肤和眼睛染毒, 无刺激; 消毒剂按 1:10 浓度及以下, 对常温稀释保存的种公鸡精液中精子生存指数影响不大。临床应用实验显示: 在冻融条件下, 该消毒剂 1:10 浓度组的种公鸡精液中精子存活率要显著高于其它试验组 ($P < 0.01$); 消毒剂按 1:10 浓度对种公鸡精液稀释消毒, 种蛋受精率和孵化率都有明显提高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。结果表明: 该消毒剂不仅对种公鸡精液中常见病原微生物具有较好的杀灭效果, 而且安全无刺激、无毒, 对种鸡繁育无不良影响。

[关键词] 中药精液消毒剂; 鸡精液; 病原微生物; 杀灭效果; 安全性评价

Study on the Germicidal Efficacy and Safety Evaluation of a Chinese Medicine Semen Disinfectant

FAN Jian-hua^{1,2}, ZHAO Hua-xuan^{1,2}, LI Shang-min^{1,2}, JIANG Yi-xiu^{1,2},
SUN Chang-fa³, YAO Qin-guang³, DOU Xin-hong^{1,2*}

(1. Jiangsu Institute of Poultry Sciences, Yangzhou, Jiangsu 225003, China;

2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of poultry genetics and breeding, Yangzhou, Jiangsu 225003, China;

3. Jiangsu Kangshiyuan Pharmaceutical Co., Ltd, Xinyi, Jiangsu 221440, China)

Corresponding author: DOU Xin-hong, E-mail: douxinhong611@163.com

Abstract: In order to know the disinfection effect and safety of the newly developed Chinese traditional medicine

基金项目: 江苏省苏北科技专项 (SZ-XZ2017028); 江苏现代农业产业技术体系 (JATS[2018]155); 江苏省创新能力建设计划 (科技设施类) 项目 [BM2018026]; 江苏省家禽遗传育种重点实验室资助项目 [JQLAB-ZZ-202004]

作者简介: 范建华, 博士, 主要从事养殖环境控制与设施技术研究。

通讯作者: 窦新红。E-mail: douxinhong611@163.com

semen disinfectant, the comprehensive evaluation and disinfection experiments *in vitro* was carried out. The tests of pharmacodynamics *in vitro* showed that the disinfectant was highly sensitive to *E. coli*, moderately sensitive to *Salmonella*, *Avian pasteurilla* and *Staphylococcus aureus*. The MIC values of four strains were 31.3, 62.5, 62.5 and 31.3 mg/mL, respectively. The kill rate of the disinfectant at a concentration of 1:400 or above to Newcastle disease virus in 5 minutes was 100%. The results of safety evaluation showed that the LD50 of the disinfectant was over 5000 mg/kg in acute toxicity in mice, and had no toxicity to the skin and eyes of rabbits. The disinfectant had little effect on the survival index of sperm in the semen of breeder roosters preserved at room temperature. The results of clinical application showed that the survival rate of sperm in 1:10 concentration group was significantly higher than that in other test groups ($P < 0.01$), and the sperm was diluted and disinfected at 1:10 concentration, the fertilization rate and hatch - ability of seed eggs were significantly increased, but the difference was not significant ($P > 0.05$). The results performed that the disinfectant not only had a good killing effect on the common pathogenic microorganisms in the semen of breeder roosters, but also was safe, non - irritating, non - toxic and had no adverse effect on breeding.

Key words: Chinese medicine semen disinfectant; chicken semen; pathogenic microorganism; killing effect; safety evaluation

在畜禽养殖中,垂直传播疾病一直困扰着我国畜牧业健康发展^[1]。垂直传播疾病,除了蛋胚源媒介外,另外一个重要环节就是公畜禽通过配种(包括人工授精和自然交配),将精液含有的病原微生物传给母体,其受孕的过程可能就是病原传播的过程。在生产实践中,曾发生过多种垂直传播疾病,如猪蓝耳病、猪瘟、猪圆环病毒病、禽流感、禽白血病、鸡传染性贫血等^[2,3],不仅给养殖业造成巨大的经济损失,而且还会通过种代扩繁传播至下一代^[4],造成更大范围的感染。

目前解决种畜禽精液中带菌或带毒问题的最常见方法是,在精液稀释过程中适量添加抗生素进行消毒。但该方法对病毒的作用微乎其微,并存在因长期应用而导致的细菌耐药性问题,而且还对精液精子活力存在极大的伤害^[5-7]。

为此,本研究对新创制开发的一种中药精液消毒剂进行了体外抑菌杀毒和急性毒性、刺激性,以及临床应用等安全性评价实验,以期今后进一步研制一种安全高效的中药精液消毒剂产品奠定基础。

1 材料

1.1 试验菌(毒)种 实验选用的细菌禽巴氏杆菌 C48 - 1 株、鸡白痢标准株 YD2 株、大肠杆菌

C15003 株和金黄色葡萄球菌 YD - 1 株均为本实验室保存菌株;选用的新城疫病毒 F48E8 为扬州大学兽医学院惠赠。

1.2 试验动物 实验选用的 BABC 小鼠、新西兰大白兔和鸡胚等均为市购。

1.3 主要仪器设备 主要仪器设备包括超净工作台、恒温培养箱、高压灭菌锅、高效液相色谱仪、电子显微镜、中药混悬液均质机、实验动物饲养笼具和小型孵化器等。

2 方法

2.1 中药精液消毒剂的制备 按成分重量比,取板蓝根、苦楝、地榆、大青叶和芦荟提取物各 1.5%、果糖 3.0%、甘油 4.0%、柠檬酸钠 2.5%、维生素 C 0.3%、余量为去离子水混合,并用柠檬酸钠调至 PH 值 7.5 ± 0.2 ,在 37℃、转速为 20 ~ 25 转/分的条件下低速搅拌 30 分钟混匀,经过滤除菌后澄清、透明溶液即为本实验用中药消毒剂。

2.2 对病原微生物的杀灭试验

2.2.1 对 4 种有害菌的体外抑菌试验 采用打洞法^[8]开展受试消毒剂对 4 种致病菌的药敏试验,根据抑菌圈直径 > 20 mm 为极敏,15 ~ 20 mm 为高敏,10 ~ 14 mm 为中敏, < 10 mm 为低敏来判定受

试药物敏感度高低^[9];将受试消毒剂用生理盐水按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 倍比稀释,测定其对 4 种致病菌的最小抑菌浓度。

2.2.2 对鸡新城疫病毒(NDV)的杀灭试验

2.2.2.1 鸡新城疫病毒(NDV)的定性杀灭试验

采用鸡胚感染法^[10],将受试消毒剂用去离子水稀释成 1:200、1:400、1:800、1:1000 的梯度浓度下各 2.5 mL,在室温条件下与 2×10^5 EID₅₀ 2.5 mL 的新城疫病毒分别感作 5、15 和 30 min,接种 10 日龄的鸡胚,24 h 后观察鸡胚死亡情况。

2.2.2.2 鸡新城疫病毒(NDV)的定量杀灭试验

将新城疫病毒液稀释成 2×10^5 EID₅₀ 2.5 mL,分别加入三个不同浓度的消毒剂 1:200、1:400、1:800、1:1000 各 2.5 mL,以 PBS 作为对照组。充分摇匀,置室温 5 min,吸取混合液 1 mL 加入 9 mL 硫代硫酸钠中和剂,作用 10 min 后,测定各组病毒滴度 EID₅₀ 值。EID₅₀ 值参照 Reed - Muench 方法^[11] 计算。

2.3 安全性评价试验

2.3.1 急性毒性试验

选择体重约 20 g 的 BABC 小鼠雌雄各 10 只。取原药液 10 mL 加去离子水 20 mL 稀释作为供试液,按 0.1 mL/10 g BW 的剂量一次性经口灌胃,最大限度灌胃剂量设计 5000 mg/kg BW (按体积重量比折算,5000 mg 为灌胃液中含原药液总重量),连续 2 周观察小鼠的采食、饮水及精神状态情况,计算体重变化、中毒死亡只数。

2.3.2 刺激性试验

2.3.2.1 皮肤刺激性试验

选择健康无眼部疾病,体重约 2.3 kg 的新西兰大白兔 3 只。试验前 24 h,将兔子背部脊柱两侧去毛,去毛范围 3 cm × 3 cm,第二天在左侧去毛部位划出 2.5 cm × 2.5 cm 试验区,在其上将受试消毒剂原液 0.5 mL 均匀涂布,并覆盖 2~4 层同样大小的纱布和一层稍大的玻璃纸,再用无刺激的胶布固定,使受试消毒剂与皮肤直接接触 4 h。右侧作为对照。试验结束后除去覆盖物,并用温水洗净。分别记录除去覆盖物后的 2 周内的皮肤刺激反应。

2.3.2.2 眼睛刺激性试验

选择健康无眼部疾病,体重约 2.3 kg 的新西兰大白兔 3 只。将动物左

侧眼睑轻轻分开,吸取 0.1 mL 受试消毒剂原液滴入眼结膜囊内,右侧眼滴入等量的生理盐水作为对照。滴眼后将上下眼闭合 30 s,再用生理盐水冲洗,除去受试药品。分别于滴眼后 1 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d 和 21 d,观察兔子角膜、虹膜和结膜刺激反应。

2.3.3 精子活力影响试验

2.3.3.1 常温保存条件下对精子生存指数影响

将新鲜采集的种公鸡精液,在 37 °C 水浴条件下,按照 1:2 分别加入原液受试消毒剂、10 倍原液稀释受试消毒剂和 100 倍原液稀释受试消毒剂,以及生理盐水对照,然后在 20 °C 条件下,每隔 2 h 观察精子的存活情况,最终统计精子生存指数。

2.3.3.2 冻融条件下对精子存活率影响

将活力不低于 0.7,密度在 $0.8 \sim 1.0 \times 10^8$ /ml 精子,按照有关参考文献方法,分别在原液受试消毒剂、10 倍原液稀释受试消毒剂和 100 倍原液稀释受试消毒剂中冷冻再解冻,并设生理盐水作为对照,观察冻后精子的存活率。

2.3.3.4 对种公鸡精液消毒后的次代孵化率和出雏率影响试验

将新鲜采集的种公鸡精液,在 37 °C 水浴条件下,按照 1:2 分别加入 10 倍稀释的受试消毒剂和 12% 的甘油稀释,并设生理盐水对照。然后按正常生产方式人工授精和收集种蛋,进行孵化,分别记录种蛋受精率和孵化率。取两次测定结果的平均值作为最终结果。

3 结果与分析

3.1 对病原微生物的杀灭效果

3.1.1 对 4 种鸡有害菌的杀灭效果

由药敏试验结果可知,该消毒剂对大肠杆菌的抑菌圈直径平均为 18 mm,属于高度敏感,对沙门氏菌、禽巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径范围为 11~12 mm,均为中度敏感;稀释 16 倍后,对禽巴氏杆菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度为 62.5 mg/mL,稀释 32 倍后,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 31.3 mg/mL。具体结果见表 1 和表 2。

3.1.2 对鸡新城疫病毒(NDV)的杀灭效果

对 NDV 的定性杀灭结果表明,受试消毒剂按 1:400 及

以上浓度稀释,最短作用时间 5 min,即对 NDV 具有良好的杀灭效果,病毒杀灭率为 100%,达到国内规定的消毒剂消毒标准。具体结果见表 3。

对 NDV 的定量杀灭结果表明,受试消毒剂按 1:400 及以上浓度稀释,鸡胚无死亡,病毒灭活率为 100%。具体结果见表 4。

表 1 中药消毒剂药敏试验测定结果

Tab 1 Results of drug sensitivity test of traditional Chinese medicine disinfectant

试验菌	抑菌圈直径/mm				判定结果
	1	2	3	平均	
大肠杆菌	17	18	19	18	高敏
沙门氏菌	10	12	10	11	中敏
禽巴氏杆菌	12	12	12	12	中敏
金黄色葡萄球菌	11	12	13	12	中敏

表 2 中药消毒剂最小抑菌浓度

Tab 2 MIC of traditional Chinese medicine disinfectant

试验菌				药物稀释倍数	抑菌浓度 (mg · mL ⁻¹)
大肠杆菌	沙门氏菌	禽巴氏杆菌	金黄色葡萄球菌		
-	-	-	-	1:2	500DW
-	-	-	-	1:4	250
-	-	-	-	1:8	125
-	+	+	-	1:16	62.5
+	+	+	+	1:32	31.3
+	+	+	+	1:64	15.7

表 3 中药消毒剂对 NDV 的定性杀灭结果

Tab 3 Qualitative killing results of traditional Chinese medicine disinfectant to NDV

稀释倍数 作用时间	试验菌				PBS 阳性对照组
	1:200	1:400	1:800	1:1000	
5 min	0/3 *	0/3	1/3	2/3	
15 min	0/3	0/3	1/3	2/3	3/3
30 min	0/3	0/3	2/3	2/3	

注: * 为阳性鸡胚数/试验鸡胚数

Note: * Positive Embryo Count / Test Embryo Count

表 4 中药消毒剂对 NDV 的定量杀灭结果

Tab 4 Qualified killing results of traditional Chinese medicine disinfectant to NDV

处理	病毒滴度 EID ₅₀	病毒灭活率/%
稀释倍数	1:200	10 ⁰
	1:400	10 ⁰
	1:800	10 ^{2.7}
	1:1000	10 ^{3.0}
PBS 阳性对照组	10 ^{3.3}	—

3.2 安全性评价

3.2.1 急性毒性试验结果 由表 5 可知,17 d 观察期内,20 只受试小鼠体重逐渐增加,未见任何中

毒体征和死亡。受试消毒剂经口半数致死量 $LD_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$ 。根据急性毒性评价规定,该消毒剂为无毒级。

表 5 小鼠急性毒性试验结果

Tab 5 Results of acute toxicity test in mice

性别	剂量组(mg/kg)	动物数(只)	体重($X \pm SD$ (g))			死亡数/只	死亡率/%
			0 天	7 天	17 天		
雄	5000	10	20.4 ± 0.1	26.8 ± 1.5	35.4 ± 1.7	0	0
雌	5000	10	20.2 ± 0.3	24.6 ± 1.2	31.1 ± 1.4	0	0

3.2.2 皮肤和眼睛刺激性试验结果 表 6 试验结果表明,受试消毒剂连续对新西兰大白兔皮肤涂抹 14 d,试验期间未见红斑和水肿等异常反应,刺激指数为 0,对皮肤无刺激。表 7 试验结果表明,给药

期间,受试动物眼均未出现角膜和虹膜损害以及结膜水肿或充血现象,眼刺激平均评分为 0,也未见全身中毒,对眼睛无刺激。

表 6 大白兔的皮肤刺激反应评分

Tab 6 Skin irritation response scores of white rabbits

涂抹天数	动物数/只	刺激积分					
		样品			对照		
		红斑	水肿	总分	红斑	水肿	总分
1	3	0	0	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0	0	0
4	3	0	0	0	0	0	0
5	3	0	0	0	0	0	0
6	3	0	0	0	0	0	0
7	3	0	0	0	0	0	0
8	3	0	0	0	0	0	0
9	3	0	0	0	0	0	0
10	3	0	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	0	0	0
12	3	0	0	0	0	0	0
13	3	0	0	0	0	0	0
14	3	0	0	0	0	0	0
2 周每只动物积分值		0			0		
每天每只动物积分值		0			0		

未见全身中毒体征

表 7 大白兔的眼部刺激反应评分

Tab 7 Eye irritation response scores of white rabbits

编号	表现	眼部刺激反应积分									
		1 小时		24 小时		48 小时		72 小时		平均评分	
		样品/对照	样品/对照	样品/对照	样品/对照	样品/对照	样品/对照	样品/对照	样品/对照	样品/对照	
1	角膜损害	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	虹膜损害	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	结膜充血	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	结膜水肿	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	角膜损害	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	虹膜损害	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	结膜充血	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	结膜水肿	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	角膜损害	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	虹膜损害	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	结膜充血	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	结膜水肿	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

3.2.3 对精子活力的影响 由表 8 可知,常温保存下,精子中加入受试消毒剂组生存指数均低于生理盐水对照组,原液组和 100 倍稀释组差异显著($P < 0.05$),但 10 倍稀释组差异不显著($P > 0.05$);3 个梯度受试消毒剂组间,10 倍稀释组要显著高于其它两组($P < 0.05$)。由表 9 可知,在冷冻条件下,受试消毒剂组精子的存活率均显著高于对照组($P < 0.05$),且 10 倍原液稀释受试消毒剂组差异极显著($P < 0.01$)。

表 8 种公鸡精液中精子的中生存指数

Tab 8 Median survival index of spermatozoa in semen of breeder cocks

稀释液	稀释倍数	生存指数
	原液	6.98 ± 0.45 ^{aa}
中药消毒剂	10 倍稀释	8.62 ± 0.14 ^{ab}
	100 倍稀释	7.04 ± 0.28 ^{aa}
生理盐水	—	9.12 ± 0.03 ^{bb}

注:肩头双字母中有一个不同,均表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: There was one difference of double letters in shoulder, which indicated significant difference ($P < 0.05$).

表 9 中药消毒剂对种公鸡精液中精子冷冻保护效果

Tab 9 Cryopreservation effect of traditional Chinese medicine disinfectant to breeder cocks sperm

稀释液	稀释倍数	精子保护率
中药消毒剂	原液	0.44 ± 0.05 ^a
	10 倍稀释	0.61 ± 0.06 ^b
	100 倍稀释	0.47 ± 0.03 ^a
生理盐水	—	0.29 ± 0.03 ^c

注:肩头字母不同,表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: The difference of shoulder letters is significant ($P < 0.05$).

3.2.4 对鸡次代孵化和出雏率的影响 中药精液消毒剂与精液作用后,对蛋鸡受精率和孵化率影响结果(表 10)表明,3 个组别对蛋鸡受精率和孵化率影响差异不显著($P > 0.05$),但受试消毒剂组和甘油组效果略佳。

4 讨论与结论

常见的畜禽消毒剂(如抗生素和各种化学试剂)虽然能够有效抑制或杀灭病原微生物,但都因为安全性问题很难在种畜禽精液中应用^[12]。本试验研发的中药消毒剂选用的板蓝根、苦楝、地榆、大青叶、芦荟等中草药提取物,具有清热解毒、杀菌消

表 10 中药精液消毒剂对蛋鸡受精率和孵化率的影响

Tab 10 Effect of traditional Chinese medicine semen disinfectant on fertilization rate and hatching rate of laying hens

测定指标	10 稀释消毒剂组	12% 甘油组	生理盐水对照组
种蛋受精率	85.33 ± 3.88	87.15 ± 1.42	82.17 ± 1.14
种蛋孵化率	87.49 ± 5.03	88.55 ± 4.23	83.28 ± 1.45

炎等实际功效,能够杀灭多种病毒和有害菌^[13];果糖能够为精子提供营养和能量^[14];甘油是常用的抗冻保护剂,能够防止精原细胞脱水,延迟精液保存时间;柠檬酸钠能调节精液的 pH 值,起缓冲保护和平衡电解质的作用;维生素 C 可以抗氧化并为精子提供营养。同时,各成分间功效相互增益,相互协同,对精液有较好的消毒效果。

通过药效学试验可知该中药消毒剂对大肠杆菌、沙门氏菌、禽巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌有普适性,其中对大肠杆菌杀灭效果最强。稀释 400 倍的中药消毒剂作用 5 min,即对 NDV 具有良好的杀灭效果,达到国内规定的病毒杀灭率标准^[15]。随着稀释倍数增加,中药消毒剂的杀灭效果降低,作用时间延长,杀灭效果增强,因此在实际使用时要按照具体情况,灵活调整消毒剂的浓度和作用时间,以达到彻底杀灭致病菌和病毒的目的。

通过急性经口试验、皮肤和眼睛刺激试验可知,该消毒剂安全无刺激性。而申玉玺等^[16]报道发现 5 种低毒化学消毒剂在低浓度下就可以有效灭活新城疫病毒,虽然安全性相对较高,但仍需另加化学缓冲剂中和残留消毒剂,以减少和试验细胞的损伤。

此外,本中药消毒剂对常温下种鸡精液中精子的生存指数影响不大,且能显著提高冷冻条件下精子的存活率,同时还提高了蛋鸡受精率和次代孵化率,可能均与该中药消毒剂对精液中病原微生物的杀灭作用有关。其中 10 倍稀释组要明显优于原液组和 100 倍稀释组。笔者分析,消毒剂浓度偏高使得药液中鞣酸、碱等有效成分也偏高,因而对精液精子的刺激伤害作用也增大,而消毒剂浓度降低,其中果糖和维生素 C 等精子有效保护因子也相对减少。因此,该消毒剂在临床应用时,要想既能达

到杀灭精液中病原微生物的效果,又要最大限度地减少精子的损害,必须选择一个适中稀释消毒浓度。

本试验研发的中药消毒剂原液在 400 倍及以上浓度稀释应用,可对大肠杆菌等 4 种常见病原菌有较好的消杀效果,在 5 min 内对新城疫病毒有 100% 杀灭率;经口灌胃急性毒性试验和粘膜染毒刺激性试验表明该消毒剂安全无毒无刺激;该消毒剂对种公鸡精液精子刺激性影响不大,且对冻融条件下精子有较好的保护效果;通过人工授精和孵化等试验证明,该消毒剂对提高蛋鸡受精率和次代孵化率有显著效果。

综上所述,建议对种畜禽精液消毒的临床最佳方法为:在人工输精前,将该中药消毒剂用去离子水按 10 倍量稀释后,按 1:2 与采集的精液体积稀释,并互作至少 5 min。

参考文献:

- [1] 孙泉云,周锦萍,曹建国,等. 通过精液传播的猪病毒性传染病[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006,24(3): 52-53.
Sun Q Y, Zhou J P, Cao J G, *et al.* Viral Infectious Disease of swine transmitted by semen[J]. Shanghai Animal Husbandry & Veterinary Communication, 2006,24(3): 52-53.
- [2] 朱瑞良. 种鸡垂直传播性疾病的危害及其控制[J]. 兽医导刊, 2011,24(5):21-24.
Zhu R L. Damage and control of vertically transmitted diseases in breeding chickens [J]. Guide to veterinary medicine, 2011, 24(5):21-24.
- [3] 刘成立. 几种可垂直传播的禽类传染病及其诊断[J]. 养殖技术顾问,2012,12(11): 106-106.
Liu Ch L. Several vertical-transmissible avian infectious diseases and diagnosis[J]. Consultant in aquaculture technology, 2012,12(11): 106-106.
- [4] 王汝都,赵敏,冯会利. 两种精液消毒剂在猪伪狂犬净化中的

- 应用研究[J]. 河南农业, 2018, 12(11): 44-46.
- Wang R D, Zhao M, Feng H L. Application of two semen disinfectants in purification of porcine Pig pseudorabies[J]. Henan Agriculture, 2018, 12(11): 44-46.
- [5] 张金龙, 刘贵阳, 姜勋平. 抗生素对猪精液常温保存效果的影响[J]. 黑龙江动物繁殖, 2005, 13(4): 5-7.
- Zhang JL, Liu GY, Jiang XP. Effect of Antibiotics on the Pig Semen Preserved at Room Temperature[J]. Heilongjiang Journal of Animal Reproduction, 2005, 13(4): 5-7.
- [6] Bry M, Trzcńska M. Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics[J]. Animal reproduction science, 2015, 163: 157-163.
- [7] 王健, 宋博宇, 梅军四, 等. 蛋氨酸碘对常温保存猪精液品质的影响[J]. 畜牧与兽医, 2016, 12(9): 45-50.
- Wang J, Song B Y, Mei J S, et al. Effect of Methionine Iodine on the Quality of Pig Semen Preserved at Room Temperature[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 12(9): 45-50.
- [8] 张沛, 阚威, 张总超, 等. 一起兔球虫病和大肠杆菌病混合感染的诊断及大肠杆菌药敏试验分析[J]. 中兽医学杂志, 2019, 12(7): 20-24.
- Zhang P, Kan W, Zhang Z Ch, et al. Diagnosis of a mixed infection of rabbit coccidiosis and Escherichia coli and drug sensitivity analysis of Escherichia coli[J]. Chinese Journal of Traditional Veterinary Science, 2019, 12(7): 20-24.
- [9] 国家药品监督管理局. 中药新药临床研就指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 342-345.
- National Medicine Products Administration. Guiding principles for clinical research of new traditional Chinese medicine[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002: 342-345.
- [10] 王文丽, 王雪峰, 闫丽娟, 等. 银翘散主要药物体外抑制流感病毒作用比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1634-1636.
- Wang W L, Wang X F, Yan L J, et al. Comparative Study on Inhibition of Influenza Viruses by Main drug of Yinqiaoan[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2009, 27(8): 1634-1636.
- [11] 马婧莉, 鲍玉林. 羊源伪狂犬病病毒的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 12(6): 127-129.
- Ma JL, Bao YL. Isolation and identification of sheep-derived pseudorabies virus[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016, 12(6): 127-129.
- [12] 孙守红, 王有森. 化学消毒剂毒理学安全性评价[J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(2): 153-155.
- Sun SHH, Wang YS. Evaluation of toxicological safety of chemical disinfectants[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2004, 21(2): 153-155.
- [13] 翁伟平, 郭蔚冰, 刘利杰. 一种具有抗病毒和免疫调节功效的兽用复方药剂. CN102688316A, 2012.
- Weng WP, Guo WBg, Liu LJ. The invention relates to a veterinary compound medicine with anti-virus and immunomodulatory effects. CN102688316A, 2012.
- [14] 李新红, 邹兴淮, 朱淑文, 等. 不同糖类对蓝狐精子常温及冷冻保存特性的影响[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(4): 334-338.
- Li X H, Zou X H, Zhu Sh W, et al. Effects of different sugars on sperm cryopreservation and normal temperature in Blue Fox[J]. Proceedings of the Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Sciences, 2004, 22(4): 334-338.
- [15] 农业农村部. 《兽用消毒剂鉴定技术规范》(1992)农(牧药)字第 101 号[S].
- Ministry of Agriculture and Rural Areas. Veterinary disinfectant identification technical code" (1992) agriculture (Animal Husbandry Medicine) word: 101[S].
- [16] 申玉玺, 游国静, 陈雯, 等. 5 种常用消毒剂对鸡新城疫病毒的灭活效果[J]. 中国消毒学杂志, 2019, 36(8): 571-573.
- Shen Y X, You G J, Chen W, et al. Inactivation effects of five common disinfectants on chicken Newcastle disease virus[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2019, 36(8): 571-573.

(编辑:陈希)