



## IMPACTO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM SÊMEN DE CACHAÇOS E RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DAS DOSES INSEMINANTES

**Helloa Alaide Siqueira - IFC- (siqueirahelloa@gmail.com)**  
**Alisson Leandro Ansolin - IFC - (alisson.ansolin@agroceres.com)**  
**Ivan Bianchi - IFC - (ivan.bianchi@ifc.edu.br)**

### RESUMO

A contaminação dos ejaculados suínos atrelada a fatores extrínsecos é fundamental para o desenvolvimento de medidas de controle. Isso pode resultar na melhoria da qualidade das doses de sêmen e na diminuição do uso de antimicrobianos. O objetivo foi avaliar o efeito da origem, local de alojamento, idade e lavagem prepucial sobre a contaminação bacteriana e produção de doses de ejaculados suínos. Os ejaculados (n= 201), provenientes de 144 machos da mesma linhagem genética foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: sem lavagem prepucial (G1, n= 81 ejaculados) e com lavagem prepucial (G2, n= 120 ejaculados). Os machos foram alojados e submetidos à coleta de sêmen pela mesma pessoa. A lavagem consistiu na infusão de 120 ml de solução de NaCl 0,9% dividido entre o canal prepucial e divertículo. Foram obtidas amostras de ejaculado fresco e dose diluída. E para parte dos machos (n= 47) a fração pré-espermática foi coletada independente do grupo. Em relação às UFC, foi observado diferença ( $P < 0,0001$ ) ao comparar o ejaculado puro entre os grupos ( $1,72 \pm 0,08$  vs  $2,47 \pm 0,14$  Log<sub>10</sub>, respectivamente). Nos dados de motilidade não foi observado diferença ( $P > 0,05$ ). A fração pré-espermática apresentou UFC mais elevada quando comparada ao restante do ejaculado ( $2,85 \pm 0,16$  vs  $2,02 \pm 0,07$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ). A origem, galpão de alojamento e idade dos machos tiveram efeito na produtividade da contaminação do ejaculado puro, das doses de inseminação e das intervenções medicamentosas. A lavagem prepucial e a fração do ejaculado influenciam no nível de contaminação bacteriana do ejaculado puro.

**Palavras-chave:** bacteriologia de sêmen; sêmen suíno; líquido prepucial; lavado prepucial.

### 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a inseminação artificial (IA) é uma das biotécnicas que mais apresentou avanços nos últimos anos (Ternus et al., 2017), as técnicas causaram inúmeros impactos na genética, biossegurança, fertilidade e eficiência na produção (Llamas-López, et al., 2019). O tipo de coleta do ejaculado tem papel essencial na carga bacteriana inicial do ejaculado, na dose armazenada e na eficiência do trabalho dentro de uma unidade de disseminação de genes, UDG (Paschoal et al., 2021). O diluidor possibilita meio para o crescimento de bactérias, embora em sua maioria os diluidores contenham antimicrobianos (Shaoyong et al., 2019). O crescimento bacteriano no ejaculado ocasiona mudanças no pH, competição por substrato, aglutinação espermática, afeta a viabilidade dos espermatozoides, danos à membrana acrossomal além de diminuir a motilidade e, portanto, a vida útil das doses inseminantes (Althouse & Lu, 2005; Kuster & Althouse, 2016).

Evitar a contaminação do ejaculado pode ser um processo potencialmente impossível, porém com medidas focadas em procedimentos higiênicos é possível reduzir a carga bacteriana desde a coleta até o processamento das doses (Bennemann et al., 2018). Dias et al. (2000), verificaram que o método de higienização pré-coleta, o foco na lavagem frequente de

toda a superfície corporal do macho com água e sabão dias próximos a coleta e os cuidados durante a fixação do pênis de forma que a sua extremidade fique livre durante a coleta, resultaram em menor grau de contaminação do ejaculado puro.

O método de fixação do pênis em sistemas semiautomáticos de coleta demonstrou diminuição na ocorrência de mesófilos aeróbios no ejaculados, principalmente quando a região prepucial se encontra com maior presença de sujidades ou em coletas prolongadas (Paschoal et al., 2021). A duração da coleta superior a 7 minutos apresentou razão de chance maior como potencial fator de risco para a ocorrência de ejaculados com mesófilos aeróbios (Goldberg et al., 2013). O líquido prepucial escorrendo pela luva do coletador e caindo dentro do copo de coleta propicia a contaminação bacteriana (Goldberg et al., 2013).

Em centrais de coleta e processamento de sêmen de touros, a lavagem do canal prepucial é utilizada rotineiramente (Meena et al., 2015; Paray et al., 2018; Kumar et al., 2019). No entanto, essa estratégia não tem sido utilizada nas UDG de machos suínos.

O objetivo deste trabalho foi analisar o uso de solução fisiológica para lavagem do canal prepucial de machos suínos durante a higienização pré-coleta e seu efeito sobre a carga bacteriana do ejaculado puro, das doses diluídas e armazenadas.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Materiais e Métodos**

Os procedimentos propostos foram aprovados a partir da aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais do Instituto Federal Catarinense (CEUA) sob protocolo número 382/2021. O estudo foi realizado em uma UDG situada na região Sul do Brasil.

Os reprodutores foram alojados sob as mesmas condições de ambiência, arraçamento e água. Foram 201 ejaculados provenientes de 144 machos da mesma linhagem genética com idade entre 8 e 17 meses. Foram formados dois grupos: Controle Sem lavado (n=81 ejaculados): machos que durante o processo de higienização pré-coleta passaram pelo processo de limpeza a seco do óstio e região externa do prepúcio através do uso de papel toalha descartável (Anexo A); e Com Lavado (n=120 ejaculados): machos que após a limpeza a seco, conforme descrito no grupo Sem Lavado, foi realizada lavagem do divertículo e canal prepucial com 120 mL de solução fisiológica à 0,9% de cloreto de sódio. Para isso foi utilizada uma bainha de inseminação artificial. Os primeiros 60 mL foram injetados diretamente no divertículo prepucial e 60 mL na extensão do canal prepucial. Em seguida foi realizado o esgotamento de do prepúcio para retirada da solução fisiológica, seguido de secagem com papel toalha.

Após a higienização, os machos foram transferidos para o manequim de coleta do ejaculado. A coleta foi realizada através do método da mão enluvada e fixação do pênis em manequim semiautomático. Os primeiros jatos da fração pré-espermática foram armazenados em um tubo estéril tipo Falcon de 15 mL. A fração rica em espermatozoides foi armazenada em uma bolsa plástica e posteriormente transferida para um tubo estéril tipo Falcon de 15 mL. Em seguida as demais frações do ejaculado foram coletadas em uma bolsa de coleta US Bag<sup>®</sup> sendo filtradas as impurezas e a fração gelatinosa. O envio do ejaculado para o laboratório foi através de um sistema pneumático a vácuo. Ao chegar no laboratório foi retirada uma amostra de 5 mL do ejaculado puro com auxílio de uma pipeta de Pasteur plástica estéril e desprezado o volume em um tubo tipo Falcon de 15 mL, sendo esse material mantido sob refrigeração entre 2 e 5 °C por um período de 24 h até a avaliação de mesófilos aeróbios em laboratório externo. Em seguida, as amostras de ejaculado puro foram avaliadas quanto a qualidade seminal e uma amostra de dose diluída foi retirada e mantida sob refrigeração em temperatura de 15 e 18 °C por um período de 120 h, até a avaliação de mesófilos aeróbios e qualidade seminal.

O volume do ejaculado foi mensurado através de balança. As análises de concentração, defeitos espermáticos (gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e cauda

dobrada), além da motilidade total e progressiva foram avaliadas utilizando-se um sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA, AndroVision® V 0.26; Minitube, Tiefenbach, Alemanha).

Os ejaculados aprovados de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos (Tabela 1) foram diluídos, envasados com máquina automática em flextubo de 80 mL e refrigerados à 15 - 18 °C até 5 d. A avaliação da motilidade das doses produzidas foi realizada através do sistema CASA após 120 h da coleta. Para as análises de motilidade total e progressiva as amostras foram pré-aquecidas a 37 °C por 12 min em placa específica.

**Tabela 1.** Parâmetros espermáticos para aprovação do ejaculado puro de machos suínos.

Parâmetro espermático	Valor
Total espermatozoides no ejaculado, bilhões	≥15,0
Motilidade total, %	≥80,0
Total defeitos morfológicos <sup>1</sup> , %	≤25,0
Aglutinação por campo, n	≤4

<sup>1</sup>Considerando defeitos de gota citoplasmática proximal, distal e cauda dobrada.

Foi realizada análise de mesófilos aeróbios totais da fração pré-espermática, ejaculado puro e doses diluídas. O número total de bactérias foi determinado através de diluições (1-7 log<sub>10</sub>) para cada amostra. Após a diluição foi repicado 1 mL em pacas de 90 x 15mm e adicionado 20 mL de ágar padrão para contagem (PCA: Plate Count Agar). As placas foram incubadas a 37 °C em aerobiose e após 24 h foi realizada a contagem de colônias (STOJANOV et al., 2020).

Os dados foram analisados utilizando MedCalc® Statistical Software version 22.007, considerando significância ao nível de  $P \leq 0,05$ . As variáveis utilizadas foram analisadas primeiramente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado de Tukey-Kramer como pós-teste. Os resultados obtidos, de todas as análises, foram descritos como as médias ± erro padrão da média ou percentual, de acordo com o tipo de variável.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi constatado o efeito da lavagem prepucial na diminuição da contaminação bacteriana no ejaculado puro em comparação com o grupo que passou apenas pelo processo de limpeza a seco.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as idades dos machos doadores de sêmen dos grupos com e sem lavado ( $373 \pm 6,4$  vs  $389 \pm 9,88$  d, respectivamente). Na análise de motilidade total e progressiva das amostras de ejaculado puro e doses diluídas armazenadas até 120 horas (Tabela 1) não foi encontrado diferença ( $P > 0,05$ ) entre o grupo com e sem lavado prepucial.

**Tabela 1.** Motilidade total e progressiva dos ejaculados de machos suínos e de doses às 120 h de acordo com os tratamentos.

Parâmetro	Com Lavado*	Sem Lavado	EPM**	Valor de P
Ejaculados, n	120	81	-	-
Motilidade total ejaculado puro, %	89,7	90,7	0,35	0,07
Motilidade progressiva ejaculado puro, %	86,2	87,6	0,48	0,06
Motilidade total dose 120 h, %	86,2	86,3	0,59	0,72
Motilidade progressiva dose 120 h, %	82,4	81,5	0,71	0,69

\*Lavagem do divertículo e canal prepucial com 120 mL de solução fisiológica à 0,9% de cloreto de sódio LBS®

\*\* EPM: Erro padrão da média.

Os resultados encontrados neste estudo foram inferiores aos encontrados por Schulze et al. (2015) que verificaram intervalos entre  $10^4$  e  $10^6$  UFC/mL e por Ciornei et al. (2021) que descreveram resultados de  $82 \pm 0,149 \times 10^3$  comumente encontrados em amostras de ejaculado. Também ficou abaixo do valor recomendado por Maroto Martín et al. (2010) de  $3,5 \times 10^3$ , cujo valor sugerido como limite para contaminação do ejaculado puro sem que ocorra danos as células espermáticas. Os resultados de crescimento bacteriano (UFC/mL) das amostras de ejaculado puro (Tabela 2) apresentaram diferença ( $P \leq 0,05$ ). No entanto a UFC/mL para doses diluídas e armazenadas até 120 h após o envase não foi observado diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos com lavado e sem lavado prepucial.

**Tabela 2.** Nível de contaminação por UFC/ml de acordo com o tipo de material colhido das amostras com lavado e sem lavado prepucial,  $\text{Log}_{10}$ .

Parâmetro	Com Lavado*	Sem Lavado	EPM**	Valor de P
Ejaculados, n	120	81	-	-
Motilidade total ejaculado puro, %	89,7	90,7	0,35	0,07
Motilidade progressiva ejaculado puro, %	86,2	87,6	0,48	0,06
Motilidade total dose 120 h, %	86,2	86,3	0,59	0,72
Motilidade progressiva dose 120 h, %	82,4	81,5	0,71	0,69

<sup>a, b</sup> Letras diferentes sobrescritas nas linhas representam diferença entre os grupos ( $P \leq 0,05$ ).

\* Lavagem do divertículo e canal prepucial com 120 mL de solução fisiológica à 0,9% de cloreto de sódio LBS®. \*\* EPM: Erro padrão da média.

O uso de solução fisiológica para lavagem do canal prepucial é frequente em centrais de touros (ROMANO et al., 2022). O uso de solução salina a 0,85 % de cloreto de sódio para lavagem prepucial em touros melhorou a qualidade do ejaculado e diminui a carga bacteriana do mesmo, ainda que os resultados de contagem bacteriana (UFC/mL) tenham sido superiores aos observados nesse estudo (MEENA et al., 2015).

A combinação de associações antimicrobianas também foi sugerida por outros autores como forma de redução exponencial da microbiota prepucial (PARAY et al., 2018), sendo relatado reduções na carga bacteriana do ejaculado puro em até 77 % (PRASAD; PACHAURI, 1985). Porém, o uso de substâncias antimicrobianas pode favorecer ao aparecimento de cepas multirresistentes (SCHULZE et al., 2016), sendo possível observar até 85 % de resistência ao uso de antimicrobianos das famílias dos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, polipeptídicos e macrolídeos (SCHULZE et al., 2015), os quais são comumente usados na saúde humana.

De acordo com Goldberg et al., (2013) o líquido prepucial foi o fator de maior risco para a contaminação bacteriana em amostras de ejaculado puro. Já Paschoal et al., (2021) sugeriram que a maior presença de sujidades na região ventral do abdômen do macho e o contato do prepúcio com a superfície contaminada do manequim após seguidas coletas favorece a contaminação do ejaculado. Os resultados de nosso estudo corroboram com os encontrados por Dias et al., (2000), que observaram menor UFC nos animais que foram lavados com água e sabão 2 dias antes da coleta em comparação aqueles cujo intervalo até a coleta foi de 5 a 7.

O antibiótico no diluente foi eficiente e restringiu o crescimento microbiológico, consequentemente não houve diferença na contaminação bacteriana das doses diluídas e armazenadas até 120 h. Apesar da maior contaminação do ejaculado puro no grupo controle a motilidade não foi impactada. Esse fato pode ser explicado pelo pequeno tempo de interação entre os espermatozoides e as bactérias (ÚBEDA et al., 2013), não permitindo crescimento exponencial ao ponto de causar queda na qualidade do ejaculado entre os grupos. Estudos mostraram que a motilidade das doses armazenadas a  $16^\circ\text{C}$  foi afetada a partir do quarto dia

de armazenamento quando a contagem bacteriana estava acima de  $1,4 \times 10^4$  UFC/mL (ALTHOUSE et al., 2000; BUSSALLEU et al., 2011). Como neste estudo não houve diferença entre os grupos avaliados no crescimento bacteriano ao longo dos dias de armazenamento das doses diluídas, a motilidade decorrente também não foi impactada.

Independentemente do tipo de tratamento utilizado há diferença ( $P \leq 0,05$ ) no parâmetro de UFC/mL comparando a fração pré-espermática e o restante do ejaculado (Tabela 3). Além disso, houve uma correlação positiva ( $r = 0,49$ ;  $P = 0,0005$ ) entre a contaminação bacteriana (UFC/mL) da fração pré-espermática e do ejaculado puro.

**Tabela 3.** Contaminação bacteriana de acordo com a fração do ejaculado colhida de machos suínos.

Parâmetro	Fração do Ejaculado		EPM*	Valor <i>P</i>
	Pré-espermática	Ejaculado Puro		
N	47	201		
UFC/mL, Log <sub>10</sub>	2,85 <sup>a</sup>	2,02 <sup>b</sup>	0,12	<0,0001

<sup>a, b</sup> Letras diferentes sobrescritas nas linhas representam diferença entre os grupos ( $P \leq 0,05$ ).

\*EPM: Erro padrão da média.

A fração pré-espermática do ejaculado apresentou maior contaminação, assim como uma correlação positiva ( $r = 0,49$ ;  $P = 0,0005$ ) em relação ao ejaculado puro. O volume desta fração é pequeno, representando menos de 10 % do volume total do ejaculado (EL-HAJJ GHAOUI et al., 2004), contendo principalmente secreção das glândulas anexas, e tem como principal função a limpeza da uretra (EL-HAJJ GHAOUI et al., 2004). Além disso possui restos celulares, urina e esmegma (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009), sendo, portanto, considerada a fração com maior contagem bacteriana e baixa contagem de células espermáticas (DZIEKONSKA et al., 2017; GARCÍA et al., 2009).

Dias et al., (2000) verificaram que a carga bacteriana foi em média 38,5 vezes menor no grupo de animais cujas coletas tiveram os primeiros jatos descartados em comparação ao ejaculado total. Os achados corroboram ainda com os encontrados por outros autores que verificaram uma carga bacteriana maior na fração pré-espermática em comparação a fração rica em espermatozoides (GALL; WILSON; ALTHOUSE, 1988). Assim, procedimentos que auxiliam na redução da contaminação bacteriana dos ejaculados podem ser destacados: eliminação da fração pré-espermática (COLENBRANDER; FEITSMA; GROOTEN, 1993), protocolos estabelecidos de higiene na coleta (GOLDBERG et al., 2017), processamento do ejaculado (SCHULZE; JUNG; HENSEL, 2022) e manejo das doses durante a inseminação artificial (NITSCHKE-MELKUS et al., 2020).

### 3 CONCLUSÃO

O descarte da fração pré-espermática do ejaculado é necessário devido a maior contagem bacteriana. A lavagem do canal prepucial do macho suíno reduz a contaminação bacteriano do ejaculado puro.

### REFERÊNCIAS

- Althouse, G.C.; Kuster, C.E.; Clark, S.G.; Weisiger, R.M. 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 53, 1167–1176. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00261-2)
- Althouse, G.C.; Lu, K.G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 63(2), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.031>
- Bennemann, P.E.; Machado, S.A.; Girardini, L.K.; Sonálio, K.; Tonin, A.A. 2018. Bacterial contaminants and antimicrobial susceptibility profile of boar semen in Southern Brazil Stud. *Revista MVZ Cordoba*. 23(2), 6637–6648. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1338>

- Bussalleu, E.; Yeste, M.; Sepúlveda, L.; Torner, E.; Pinart, E.; Bonet, S. 2011. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 127(3–4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.018>
- Ciornei, Ș.; Drugociu, D.; Ciornei, L.M.; Mareș, M.; Roșca, P. 2021. Total asepsitization of Boar Semen, to increase the biosecurity of reproduction in Swine. *Molecules*. 26(20), 1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules26206183>
- Colenbrander, B.; Feitsma, H.; Grooten, H.J. 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48, 207–215. <https://doi.org/10.1530/biosciproc.14.0014>
- Dias, C.P.; Castagna, C.D.; Reis, G.R.; Simonetti, R.; Bortolozzo, F.P.; Wentz, I.V.O.; Cardoso, M. 2000. Degree of bacterial contamination of swine ejaculate submitted to two hygienic and collection methods. *Arquivos Da Faculdade de Veterinária, UFRGS*. 28(2), 32–40. <https://www.ufrgs.br/actavet/1-29/2000-1.pdf>
- Dziekońska, A.; Świader, K.; Koziorowska-Gilun, M.; Mietelska, K.; Zasiadczyk, L.; Kordan, W. 2017. Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 20(1), 77–84. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0011>
- El-Hajj Ghaoui, R.; Thomson, P.; Evans, G.; Maxwell, W. 2004. Characterization and Localization of Membrane Vesicles in Ejaculate Fractions from the Ram, Boar and Stallion. *Reproduction in Domestic Animals*. 39(3), 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00499.x>
- Gall, T.J.; Wilson, M.E.; Althouse, G.C. 1988. Quantification of Bacteria in Fractionated Boar Ejaculates. *Allen D. Leman Swine Conference*. 45. <https://hdl.handle.net/11299/158003>
- Goldberg, A.M.G.; Argenti, L.E.; Faccin, J.E.; Linck, L.; Santi, M., Bernardi, M.L.; Cardoso, M.R.I.; Wentz, I., Bortolozzo, F.P. 2013. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in Veterinary Science*. 95(2), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.06.022>
- Goldberg, A.M.G.; Cardoso, M.; Bernardi, M.L.; Wentz, I.; Bortolozzo, F.P. 2017. The impact of bacterial contamination of the ejaculate and extender on the quality of swine semen doses. *Ciências Agrárias*. 38(5), 3095–3103. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3095>
- Kumar, A.; Kumar, B.; Pradesh, U.; Rahul Katiyar, I.; Ankesh Kumar, C.; Prasad, J.; Ghosh, S.; Das, G.; Yadav, H.; Katiyar, R. 2019. Effect of volume of washing fluid on bacterial load in preputial wash, fresh and post-thaw semen in crossbred bulls. *The Pharma Innovation Journal*. 8(9), 244–248. <https://www.researchgate.net/publication/344125655>
- Maroto Martín, L.O.; Muñoz, E.C.; De Cupere, F.; Van Driessche, E.; Echemendia-Blanco, D.; Rodríguez, J.M.M.; Beeckmans, S. 2010. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*. 120(1–4), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.008>
- Meena, G.S.; Raina, V.S.; Gupta, A.K.; Mohanty, T.K.; Bhakat, M.; Abdullah, M.; Bishist, R. 2015. Effect of preputial washing on bacterial load and preservability of semen in Murrah buffalo bulls. *Veterinary World*. 8(6), 798–803. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.798-803>
- Nitsche-Melkus, E.; Bortfeldt, R.; Jung, M.; Schulze, M. 2020. Impact of hygiene on bacterial contamination in extended boar semen: An eight-year retrospective study of 28 European AI centers. *Theriogenology*. 146, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.031>
- Paray, A.R.; Bhakat, M.; Lone, S.A.; Mohanty, T.K.; Sinha, R.; Ur, J.; Khanday, Z.B.; Danish, Z. 2018. Role of preputial washing in reducing microbial load and improving

bovine semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 7(3), 97–102. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.233570>

Paschoal, A.F.L.; Mellagi, A.P.G.; Ferrari, C.V.; Takeuti, K.L.; Oliveira, G. da S.; Bernardi, M. L.; Ulguim, R. da R.; Bortolozzo, F.P. 2021. Adjusted method of penis fixation during boar semi-automatic semen collection aiming to reduce bacterial contamination. *Reproduction in Domestic Animals*. 56(6), 897–904. <https://doi.org/10.1111/rda.13932>

Prasad, J.; Pachauri, A.K. 1985. Significance of intrapreputial wash in collecting low microbial count in ram semen. *Livestock Advisor*. 10(2), 9–11. <https://eurekamag.com/research/001/459/001459661.php>

Reicks, D.L. 2019. Effective biosecurity to protect North American studs and clients from emerging infectious disease. *Theriogenology*. 137, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.041>

Rodríguez-Martínez, H.; Kvist, U.; Saravia, F.; Wallgren, M.; Johannisson, A.; Sanz, L., Peña, F. J.; Martínez, E. A.; Roca, J.; Vázquez, J. M.; Calvete, J. J. 2009. The physiological roles of the boar ejaculate. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 66, 1–21. <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.18.0001>

Romano, J. E.; Zaroni, R. G.; Mislei, B.; Bucci, D.; Mion, D.; Mari, G. 2022. Comparison between chlorhexidine and povidone-iodine solutions for flushing the preputial cavity on penile mucosa and semen bacterial counts in beef bulls. *Theriogenology*. 193, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.09.012>

Schulze, M.; Ammon, C.; Rüdiger, K.; Jung, M.; Grobbel, M. 2015. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*. 83(3), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004>

Schulze, M.; Dathe, M.; Waberski, D.; Müller, K. 2016. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 85(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.016>

Schulze, M.; Jung, M.; Hensel, B. 2022. Science-based quality control in boar semen production. *Molecular Reproduction and Development*. 1–9. <https://doi.org/10.1002/mrd.23566>

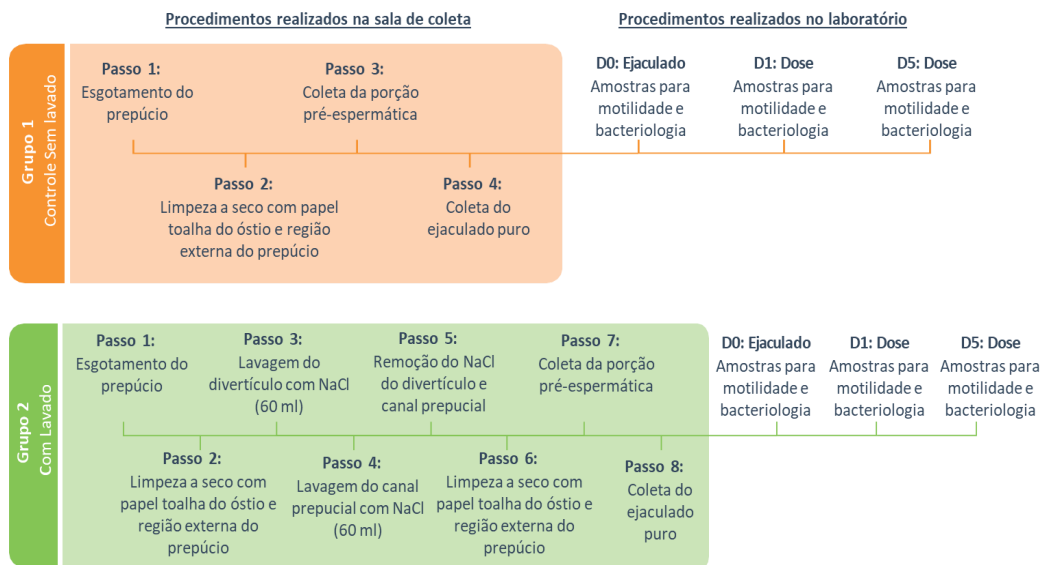
Shaoyong, W.; Li, Q.; Ren, Z. qiang.; Wei, C. sheng.; Chu, G. yan.; Dong, W. zi.; Yang, G. she.; Pang, W. jun. 2019. Evaluation of  $\epsilon$ -polylysine as antimicrobial alternative for liquid-stored boar semen. *Theriogenology*. 130, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.005>

Stojanov, I.; Milovanović, A.; Barna, T.; Prodanov Radulović, J.; Apić, J.; Stojanović, D.; Maksimović, N. 2020. Antimicrobial resistance as a problem for the quality of Boar Semen. *Acta Veterinaria*. 70(1), 136–146. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0010>

Ternus, E. M., Vanz, A. R., Lesskiu, P. E. Performance reprodutiva de leitoas submetidas à inseminação artificial pós-cervical", *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, n. 4, p. 777–784, 2017. DOI: 10.1590/1678-4162-9285

Úbeda, J.L.; Ausejo, R.; Dahmani, Y.; Falceto, M.V.; Usan, A.; Malo, C.; Perez-Martinez, F.C. 2013. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*. 80(6), 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.022>

## ANEXO A – Procedimentos realizados na sala de coleta



Procedimentos realizados durante a higienização pré e pós-coleta dos ejaculados de machos suínos de acordo com o tratamento.