

EquiPlus

Verdünnern für Hengstsamen
Culture Medium for Stallion Semen
Medio de conservación para Semen Equino
Культуральная среда для спермы жеребцов



EquiPlus

13570/0202 (LS, 1 l)
13570/0210 (LS, 100 ml)
13570/0215 (AP, 100 ml)

EquiPlus ohne/without/sin/без AB

13570/0201 (1 l)
13570/0240 (100 ml)

EquiPlus Combi

13570/0221 (G, 100 ml)
13570/0220 (LS, 100 ml)

EquiPlus Combi ohne/without/sin/без AB

13570/0222 (100 ml)



31357/0020



EquiPlus ist ein Verdünner für Hengstsamen und geeignet zur Konservierung bei ca. +5°C für ca. 3 Tage. Des Weiteren eignet sich EquiPlus als Zentrifugierverdünner. EquiPlus wird in Pulverform geliefert und erfordert zur Herstellung des fertigen Verdünners steriles Reinstwasser.

EquiPlus Combi wird in einer speziellen Flasche geliefert und enthält Pulver und Reinstwasser getrennt.

1. Zusammensetzung

EquiPlus ist ein Verdünner, basierend auf Magermilch.

Die Produkte Ref. 13570/0202, /0210, /0215, /0220 und /0221 enthalten Antibiotika.

2. Packungsgrößen und Varianten

Ref.	Antibiotika pro 1000 ml Verdünner:
13570/0202 13570/0210 13570/0220	0,15 g Lincomycin und 0,25 g Spectinomycin
13570/0215	1 g Amikacin und 0,64 g Penicillin
13570/0221	0,25 g Gentamicin

EquiPlus	1 l	100 ml	ohne Antibiotika	Lincomycin/ Spectinomycin	Amikacin/ Penicillin
13570/0201	X		X		
13570/0202	X			X	
13570/0210		X		X	
13570/0215		X			X
13570/0240		X	X		

EquiPlus Combi	1 l	100 ml	ohne Antibiotika	Gentamicin	Lincomycin/ Spectinomycin
13570/0220		X	X		
13570/0221		X		X	
13570/0222		X			X

3. Anwendung

3.1. Zubereitung des fertigen Verdünners

3.1.1. EquiPlus pulverförmig im Beutel

Der Inhalt eines EquiPlus Beutels ist ein weißes Pulver ohne Beimengungen und Klumpen. Das Pulver wird in 1000 ml bzw. 100 ml sterilem Reinstwasser gelöst. Das Wasser wird zuvor auf +30°C bis +35°C erwärmt. Durch Schwenken oder Rühren wird die Flüssigkeit so lange gemischt, bis sich das Pulver komplett gelöst hat.

Wird mit EquiPlus ohne Antibiotikum gearbeitet und ein Antibiotikum hinzugefügt, sollte der pH des fertig angemischten Verdünners überprüft und gegebenenfalls eingestellt werden (z.B. mit Natriumhydrogenkarbonat). Der pH sollte etwa 6,8 betragen.

Der fertige Verdünner ist flüssig, ohne Klumpen oder sichtbare Partikel, hat eine grau-weiße Farbe und ist trüb. Nach einer Anpassungszeit von 15 bis 20 Minuten kann mit der Verdünnung begonnen werden

3.1.2. EquiPlus Combi

Das pulverförmige EquiPlus befindet sich im Deckel der Flasche. Das EquiPlus Pulver wird durch Drehen des Deckels freigesetzt und fällt in das Reinstwasser in der darunterliegenden Flasche. Das Wasser wird zuvor auf +30°C bis +35°C erwärmt. Durch Schwenken oder Rühren wird die Flüssigkeit so lange gemischt, bis sich das Pulver komplett gelöst hat. Der fertige Verdünner ist flüssig, ohne Klumpen oder sichtbare Partikel, hat eine grau-weiße Farbe und ist trüb. Nach einer Anpassungszeit von 15 bis 20 Minuten kann mit der Verdünnung des Spermas begonnen werden.

3.2. Wasserqualität

Die Qualität des verwendeten Wassers ist von sehr großer Bedeutung. Geeignet ist Wasser, welches durch Destillation, Deionisierung, Umkehrosmose oder mit einer Kombination der vorigen Verfahren aufbereitet wurde und folgende Eigenschaften aufweist:

Leitfähigkeit unter 1 µS/cm

Keimgehalt unter 1 KBE (Kolonie bildende Einheiten) pro 10 ml

Besonderes Augenmerk erfordert, möglichen Keimeintrag in bereits aufbereitetes Wasser, z.B. durch unsterile Schläuche, Leitungen oder Vorratsgefäße zu vermeiden.

Wenn keine geeignete Wasseraufbereitungsanlage zur Verfügung steht, ist bidestilliertes, steriles Wasser eines zuverlässigen Herstellers zuzukaufen.



Verwenden Sie niemals destilliertes Wasser für den Haushalt.

3.3. Anwendungsempfehlung

3.3.1. Frischsamenverdünnung

Das frisch gewonnene Hengstejakulat wird bei einer Temperatur von +30°C bis +33°C gehalten und untersucht. Nach Entfernung des gelatinösen Anteils werden Volumen, Konzentration und Motilität festgestellt. Sofern das Ejakulatsvolumen reduziert werden soll, wird zunächst 1:1 mit **EquiPlus** verdünnt und zentrifugiert (siehe Punkt 3.3.2.) Andernfalls wird je nach gewünschter Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien in der Besamungsdosis die erforderliche Menge **EquiPlus** Verdünner errechnet. Die Temperatur von Verdünner und Samen müssen im Moment der ersten Verdünnung gleich sein (+/-1°C). Der Verdünner wird langsam dem gefilterten, gelfreien Ejakulat hinzugefügt und die beiden Flüssigkeiten werden vorsichtig aber gründlich durchmischt.

Nach der Verdünnung kann der Samen langsam abkühlen. Die empfohlene Abkühlrate liegt bei < 0,3°C pro Minute, d.h. von Umgebungstemperatur auf +5°C beträgt die Zeitspanne bis zu 5 Stunden.



Berechnung des Endvolumens der Verdünnung:

Verdünnung ohne Zentrifugation:

Die optimale Verdünnungsrate liegt bei mindestens 1:3 (Samen:**EquiPlus** Verdünner), bzw. 25 Millionen motile Spermien pro Milliliter in der Endverdünnung. Die empfohlene Anzahl an motilen Samenzellen pro Besamungsdosis beträgt 600 Mio. Das Besamungsvolumen sollte 10-30 ml betragen.

Beispiel:

Ejakulatsdaten nach der Gewinnung:

Ejakulatsvolumen = 45 ml

Samendichte = 145 Mio./ml

Gesamtzahl Spermienzellen = 6,525 Milliarden Spermien

Motilität = 60%

→ motile Spermienzellen im Ejakulat = 3,915 Milliarden Spermien

Es können 6 Besamungsportionen aus diesem Ejakulat gewonnen werden, die jeweils 600 Mio Samenzellen pro Dosis enthalten ($3,915 \text{ Mrd.} / 600 \text{ Mio.} = 6,5 \text{ Portionen}$).

Um eine optimale Verdünnung mit 25 Mio. motilen Spermien pro Milliliter herzustellen, muss das Endvolumen somit 156 ml betragen ($3,915 \text{ Mrd.} / 25 \text{ Mio.} = 156,6 \text{ ml}$) und eine Besamungsdosis besteht aus 26 ml ($156 \text{ ml} / 6 \text{ Dosen} = 26 \text{ ml}$).

Verdünnung mit Zentrifugation:

Die optimale Verdünnungsrate und die Anzahl der motilen Samenzellen pro Dosis bleiben unverändert. Das Besamungsvolumen kann hier niedriger eingestellt werden (10–15 ml).

Beispiel:

Ejakulatsdaten nach der Gewinnung:

Ejakulatsvolumen = 45 ml

Samendichte = 145 Mio./ml

Gesamtzahl Spermienzellen = 6,525 Milliarden Spermien

Motilität = 60%

→ motile Spermienzellen im Ejakulat = 3,915 Milliarden Spermien

Nach der Zentrifugation (siehe 3.3.2) wird das Volumen bestimmt, die Motilität beurteilt und die neue Anzahl der Spermienzellen durch Zählkammerverfahren ermittelt. Alternativ kann mit der Konzentration des Nativejakulats, korrigiert um 20% für die Verluste durch die Zentrifugation, gerechnet werden.

Daten nach der Zentrifugation:

Volumen = 10 ml

Samendichte = 522 Mio./ml

Gesamtzahl Spermienzellen = 5,22 Milliarden Spermien

Motilität = 60%

→ motile Spermienzellen im Ejakulat = 3,132 Mrd. Spermien

Es können 5 Besamungsportionen aus diesem Ejakulat gewonnen werden, die jeweils 600 Mio Samenzellen pro Dosis enthalten ($3,132 \text{ Mrd.} / 600 \text{ Mio.} = 5,2 \text{ Portionen}$).

Das Endvolumen beträgt bei 15 ml pro Dosis somit 75 ml ($5 \times 15 \text{ ml}$) und es müssen 65 ml Verdünner zugegeben werden.

EquiPlus eignet sich zur Konservierung des Samens für ca. 3 Tage bei ca. +5°C. Eine tägliche Qualitätsuntersuchung bis zur Anwendung ist sehr zu empfehlen.

3.3.2. Zentrifugation

Das gefilterte, gelfreie Ejakulat wird mit dem vorbereiteten **EquiPlus** Verdünner 1:1 verdünnt. Die Zentrifugation erfolgt bei 500-800 g für 5-10 Minuten. Nach der Zentrifugation wird der Überstand entfernt (ein Anteil von 5% Seminalplasma des Überstandes sollte mindestens verbleiben) und das Pellet in 3-5 ml **EquiPlus** Verdünner gelöst (resuspendiert). Um eine höhere Ausbeute an Spermienzellen zu erhalten, kann mit CushionFluid (Ref. 13580/0001) gearbeitet werden. Dazu wird das verdünnte Ejakulat vor dem Zentrifugieren mit 3-4 ml CushionFluid im Zentrifugenglas unterlegt. Dann kann mit bis zu 1000 g für bis zu 20 Minuten zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation befinden sich die Spermienzellen als Band zwischen dem CushionFluid und dem Überstand. Das CushionFluid muss (wie der Überstand) vor der Weiterverarbeitung entfernt werden.

4. Lagerung, Haltbarkeit und Hinweise

4.1. Lagerung, Haltbarkeit

Die luftdicht verschlossenen Packungen müssen kühl (unter +15°C), trocken und dunkel gelagert werden. Die Mindesthaltbarkeit ist auf der Packung aufgedruckt. Fertig zubereiteter Verdünner ist bis zu 3 Tage im Kühlschrank (+2°C - +8°C) haltbar. Ebenso kann der Verdünner portioniert eingefroren werden und bei -18°C für 6 Monate gelagert werden.

4.2. Wichtige Hinweise



**Nicht in Reichweite von Kindern lagern.
Das Pulver nicht ohne Handschuhe berühren und nicht einatmen.
Der Verdünner ist nicht für die Behandlung oder den Konsum von Mensch und Tier geeignet.**

Vor jeder Verwendung des Verdünners bitte sorgfältig überprüfen, ob der Verdünner die unter Ziff. 3.1. beschriebenen Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich Konsistenz und Aussehen aufweist. Für den Fall, dass die übliche Konsistenz und/oder das übliche Aussehen nicht gegeben ist, darf der Verdünner nicht verwendet werden.

4.3. Fehleranalyse

Eine Reihe von Faktoren ist ausschlaggebend für gute Samenkonservierung und Befruchtungserfolg, unter anderem:

- Verwendung ausschließlich spermienfreundlicher Materialien und Oberflächen für Samen und Verdünner (Absamhandschuhe, Samen- und Verdünnerflaschen, Gläser frei von mineralischen Rückständen)
- Gutes Temperaturmanagement, und insbesondere Vermeidung von Temperaturen unter +30°C für unverdünnten, und unter +4°C für verdünnten Samen, sowie Temperaturschwankungen
- Vermeidung bakterieller Kontamination (entsprechende Maßnahmen in Haltung und Sprungvorbereitung der Hengste, Samengewinnung in sauberer Umgebung, geeignete Hygienemaßnahmen im Labor)
- Vermeidung spermientoxischer Faktoren (Wasser, UV Licht, Staub, Waschmittel)
- Qualität des verwendeten Wassers (siehe Punkt 3.2)



4.4. Beratung und Schulung

Für Fachfragen stehen die Minitüb Experten für Samenproduktion und künstliche Besamung zu Verfügung. Minitüb Schulungen werden individuell angeboten. Das aktuelle Schulungsangebot entnehmen Sie bitte unserer Web Page.

5. Herstellungsstandard und Qualitätskontrolle

5.1. Rohstoffqualität

Alle in Minitüb Medien verwendeten Rohstoffe werden nach GMP und DIN ISO 9001:2015 Normen hergestellt, und sind nach Ph Eur, BP oder USP Standards zertifiziert. Sie sind gemäß international gültigen Qualitätsvorschriften über die Prüfung von Arzneistoffen getestet und entsprechen diesen Vorschriften.

5.2. Fertigungsstandard

Die Produktion aller Minitüb Medien erfolgt unter GMP Bedingungen im Reinraum und wird mit Wägeprotokollen dokumentiert. Unter fachtierärztlicher Leitung wird jede produzierte Charge einer Reihe chemisch-physikalischer Tests unterzogen und unter praxisnahen Bedingungen in der Samenkonservierung eingesetzt. Damit garantieren Minitüb Medien eine dauerhafte Samenkonservierung mit hoher spermatologischer Wirksamkeit unter verschiedensten klimatischen Praxisbedingungen.

5.3. Zertifikate

Auf Anfrage sind ein allgemeines Qualitätszertifikat sowie ein Chargenzertifikat erhältlich.

EquiPlus is a culture medium in which stallion semen can be preserved at approx. +5°C for approx. 3 days. **EquiPlus** is also recommended for centrifugation of stallion semen. **EquiPlus** is supplied in powder form and requires sterile ultrapure water to produce the finished extender. **EquiPlus Combi** comes in a special bottle and contains powder and ultrapure water separately.

1. Composition

EquiPlus is an extender based on skim milk.

The products Ref. 13570/0202, /0210, /0215, /0220 and /0221 are supplemented with antibiotics.

2. Package sizes and alternatives

Ref.	Antibiotics per 1000 ml extender:
13570/0202 13570/0210 13570/0220	0.15 g Lincomycin and 0.25 g Spectinomycin
13570/0215	1 g Amikacin and 0.64 g Penicillin
13570/0221	0.25 g Gentamicin

EquiPlus	1 l	100 ml	without antibiotics	Lincomycin/ Spectinomycin	Amikacin/ Penicillin
13570/0201	X		X		
13570/0202	X			X	
13570/0210		X		X	
13570/0215		X			X
13570/0240		X	X		

EquiPlus Combi	1 l	100 ml	without antibiotics	Gentamicin	Lincomycin/ Spectinomycin
13570/0220		X	X		
13570/0221		X		X	
13570/0222		X			X

3. Application

3.1. Preparation of the final extender

3.1.1. EquiPlus in powder form in sealed bags

The content of an **EquiPlus** bag is a fine, white powder with no particles of other colours and no clumps.

Warm the sterile pure water to a temperature of +30°C to +35°C.

Dissolve the content of one bag of **EquiPlus** in 1000 ml respectively 100 ml purified, sterile water by agitating or stirring.



If EquiPlus without antibiotics is used and an antibiotic is added, the pH of the prepared extender should be checked and adjusted if necessary (e.g. by adding sodium hydrogen carbonate). The pH should be at approx. 6.8.

The ready-to-use extender is liquid, contains no clumps or particles, it has a grey-white colour and it is cloudy. The semen dilution can start after an adaptation time of 15 to 20 minutes.

3.1.2. EquiPlus Combi

EquiPlus Combi has the extender powder included in the lid of the bottle, and the sterile pure water in the bottle itself. To mix the powder with the water, screw and push the upper part of the lid so that the powder is released into the sterile pure water (prewarmed to +30°C to +35°C). Then dissolve the powder completely by gently shaking or agitating the bottle until the extender is homogeneous. The ready-to-use extender is liquid, contains no clumps or particles, it has a grey-white colour and it is cloudy. The semen dilution can start after an adaptation time of 15 to 20 minutes.

3.2. Water quality

The quality of the water used in all the procedures is of a great importance. The water must be purified either by distillation, deionisation, reverse osmosis, or preferably a combination of these methods, and if necessary by additional sterilization. The purified water must have the following characteristics:

Conductivity less than 1 µS/cm

Bacteria level below 1 CFU (colony forming units) per 10 ml

Of utmost importance, all potential sources for bacterial contamination of the prepared water must be identified and eliminated. Unsterile tubing, pipes, or storage containers represent some potential sources for contamination.

If there is no appropriate equipment for water treatment available, bi-distilled and sterile water should be bought from a reliable source.



Never use distilled water for household use!

3.3. Recommended application

3.3.1. Preparation of chilled semen

The freshly collected stallion semen is maintained at a temperature of +30°C to +33°C and analysed. After removing the gel, volume, concentration and motility are determined. If the volume of the ejaculate should be reduced, at first a dilution 1:1 with **EquiPlus** extender and centrifugation must be performed (see 3.3.2). Otherwise the necessary volume of extender is calculated depending on the required number of motile sperm cells per insemination dose. The **EquiPlus** extender and the semen must have the same temperature at the moment of the first dilution (+/-1°C). The extender is slowly added to the filtered, gel-free ejaculate and the 2 fractions are mixed gently but thoroughly in several steps.

After the dilution, the semen is no longer maintained in warm conditions. The recommended cooling rate < 0,3°C per minute, respectively from ambient temperature to +5°C it takes up to 5 hours.

Calculating the final volume of extended semen:

Dilution without centrifugation

The optimum dilution rate should be at least 1:3 (semen:**EquiPlus** extender), or 25 million motile semen cells/ml after final dilution. The recommended motile sperm per insemination dose amounts 600 million. The inseminated volume should be 10-30 ml.

Example:

Data of the freshly collected ejaculate:

Volume of ejaculate = 45 ml

Concentration of semen = 145 million/ml

Total number of sperm = 6.525 billion (6.525×10^9)

Motility = 60%

→ motile sperm in the ejaculate = 3.915 billion

From this ejaculate 6 insemination doses can be obtained, each containing 600 million sperm ($3.915 \text{ billion} / 600 \text{ million} = 6.5 \text{ doses}$). To reach an optimum dilution with 25 million motile sperm/ml, the final volume must be 156 ml ($3.915 \text{ billion} / 25 \text{ million} = 156.6 \text{ ml}$). Each semen dose will amount 26 ml ($156 \text{ ml} / 6 \text{ doses} = 26 \text{ ml}$).

Dilution with centrifugation:

The optimum dilution rate and the number of motile sperm per dose remain equal. The volume of the doses may be reduced (10-15 ml).

Example:

Data of the freshly collected ejaculate:

Volume of ejaculate = 45 ml

Concentration of semen = 145 million/ml

Total number of sperm = 6.525 billion

Motility = 60%

→ motile sperm cells in the ejaculate = 3.915 billion

After centrifugation (see 3.3.2.), the volume is determined, motility evaluated and based on counting with the counting chamber, the new number of sperm cells of the ejaculate is calculated. Alternatively, the new concentration is estimated taking the sperm count of the native ejaculate determined by photometer and adjusted by -20% to account for the loss of cells in centrifugation.

Data after centrifugation:

Volume = 10 ml

Concentration of semen = 522 million/ml

Total number of sperm = 5.22 billion

Motility = 60%

→ motile sperm = 3.132 billion

5 insemination doses can be generated from this ejaculate with 600 million motile semen cells per dose ($3.132 \text{ billion} / 600 \text{ million} = 5.2 \text{ doses}$). The final volume will be 50 ml with 15 ml per insemination dose ($5 \times 15 \text{ ml}$). 65 ml of **EquiPlus** extender must be added to the semen.

EquiPlus is recommended for semen preservation up to 3 days at approx. +5°C. A daily quality analysis until the application is highly recommended.



3.3.2. Centrifugation

The prepared **EquiPlus** extender and the gel-free ejaculate are mixed 1+1. Centrifugation is performed at 500-800 g for 5-10 minutes. After centrifugation the supernatant is removed (a proportion of at least 5% of seminal plasma of the supernatant should remain) and the pellet re-suspended with 3-5 ml of **EquiPlus** extender. To achieve a higher yield of sperm cells it is recommended to work with CushionFluid (Ref. 13580/0001). Therefore, the extended ejaculate is put on top of a layer of 3-4 ml of CushionFluid in the centrifugation vial before centrifugation. Centrifugation is performed at up to 1000 g for up to 20 minutes. After centrifugation, the sperm cells are located in a layer between CushionFluid and supernatant. CushionFluid has to be removed (as well as supernatant) before further semen processing.

4. Storage, shelf life and important hints

4.1. Storage, shelf life

The airproof sealed packages must be stored in cool (below +15°C), dry and dark conditions. The minimum shelf life is printed on each package.

Ready-made extender can be kept up to 3 days if stored in the refrigerator (+2°C - +8°C). It can also be aliquoted and stored at -18°C for approx. 6 months.

4.2. Important hints



**Keep the product out of the reach of children.
Do not touch the powder without gloves and do not breathe in.
The product is not suitable for treatment or consumption by human beings or animals.**

Before each use of the extender, make sure to analyse precisely, whether the extender shows the properties described under 3.1., especially regarding its consistency and aspect. If the extender shows a different consistency or aspect as normal, it must not be used.

4.3. Trouble shooting

A couple of factors are crucial for good semen conservation and insemination success, among others:

- Use of exclusively sperm friendly materials and surfaces for semen and extender (collection gloves, semen and extender bottles, glassware free of mineral residues)
- Good temperature management, particularly avoiding temperatures below +30°C for undiluted semen and below +4°C for diluted semen, as well as temperature fluctuations
- Avoiding bacterial contamination (appropriate stallion management and preparations of collection; semen collection in clean ambient, appropriate hygiene protocol in the lab)
- Avoiding sperm toxic factors (water, UV light, dust, detergent)
- Quality of the purified water (see point 3.2)

4.4. Consulting and training

You can rely on the Minitube scientific experts for advice and technical support concerning all aspects of your semen production and/or artificial insemination process. Workshops and seminars are offered regularly and also on an individual basis. Please refer to our web site for information regarding our current program.

5. Production standard and quality control

5.1. Raw material quality

All raw materials used in Minitube media are produced according to GMP and DIN ISO 9001:2015 norms, and are certified for meeting Ph Eur, BP or USP standards. They are tested and comply with the current international guidelines regulating the quality of pharmaceutical substances.

5.2. Production standard

Production of all Minitube media is performed under GMP conditions in a clean room and documented with weighing records. Under expert veterinary supervision, each batch of the final product is subjected to a series of chemical and physical tests and used under practical conditions to conserve semen. This ensures that Minitube media consistently provide semen conservation with high spermatological efficacy over a wide range of climatic and process conditions.

5.3. Certificates

The general quality certificate and the batch certificate are available upon request.



EquiPlus es un diluyente para semen equino, adecuado para la conservación por aprox. 3 días a temperatura de aprox. +5°C. EquiPlus también se recomienda como diluyente de centrifugación. EquiPlus se suministra en forma de polvo y requiere agua ultrapura estéril para producir el diluyente terminado.

EquiPlus Combi viene en una botella especial y contiene polvo y agua ultrapura por separado.

1. Composición

EquiPlus es un diluyente a base de leche descremada.

Los productos Ref. 13570/0202, /0210, /0215, /0220 y /0221 se complementan con antibióticos.

2. Presentación

Ref.	1000 ml de diluyente contienen:
13570/0202 13570/0210 13570/0220	0,15 g de Lincomicina y 0,25 g Espectinomicina
13570/0215	1 g de Amikacina y 0,64 g Penicilina
13570/0221	0,25 g Genatimicina

EquiPlus	1 l	100 ml	sin antibióticos	Lincomicina/ Espectinomicina	Amikacina/ Penicillina
13570/0201	X		X		
13570/0202	X			X	
13570/0210		X		X	
13570/0215		X			X
13570/0240		X	X		

EquiPlus Combi	1 l	100 ml	sin antibióticos	Gentamicina	Lincomicina/ Espectinomicina
13570/0220		X	X		
13570/0221		X		X	
13570/0222		X			X

3. Modo de empleo

3.1. Preparación

3.1.1. EquiPlus en polvo, sobre de aluminio

El contenido de una bolsa de EquiPlus es un polvo fino y blanco sin partículas de otros colores y sin grumos.

Calentar el agua pura estéril hasta una temperatura de +30°C a +35°C.

Disolver el contenido de una bolsa de EquiPlus en 1000 ml de agua pura estéril, agitando o removiendo.

Si se utiliza EquiPlus sin antibióticos y se añade un antibiótico, debe comprobarse el pH del diluyente preparado y ajustarlo si es necesario (por ejemplo, añadiendo por ejemplo con bicarbonato sódico). El pH debe ser de aproximadamente 6,8.

El diluyente listo para usar es líquido, no contiene grumos ni partículas, tiene un color blanco grisáceo y es turbio. La dilución del semen puede comenzar tras un periodo de adaptación de 15 a 20 minutos.

3.1.2. EquiPlus Combi

EquiPlus Combi incorpora el diluyente en polvo en la tapa y el agua pura estéril en el frasco. Para mezclar el polvo con el agua, enrosque y empuje la parte superior de la tapa para que el polvo caiga en el agua (precalentada entre +30°C y +35°C). A continuación, disolver completamente el polvo agitando suavemente el frasco hasta que el diluyente quede homogéneo. El diluyente listo para usar tiene forma líquida, no contiene grumos ni partículas, tiene un color blanco grisáceo y es turbio. La dilución del semen puede comenzar tras un tiempo de adaptación de 15 a 20 minutos.

3.2. Calidad del agua

La calidad del agua utilizada en todos los procedimientos es de gran importancia. El agua debe ser purificada por destilación, desionización, osmosis inversa o, preferiblemente, por una combinación de estos métodos y, si es necesario, por una esterilización adicional. El agua purificada debe tener las siguientes características:

Conductividad inferior a 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$

Nivel de bacterias inferior a 1 UFC (unidades formadoras de colonias) por 10 ml

Debe identificarse y eliminarse la posible contaminación bacteriana del agua ya preparada: por ejemplo, los tubos no estériles, las tuberías o los recipientes de almacenamiento representan posibles fuentes de contaminación.

Si no se dispone de un equipo adecuado para el tratamiento del agua, se debe comprar agua bidestilada y estéril de un proveedor de confianza.



¡No utilice nunca agua destilada de uso doméstico!

3.3. Recomendaciones de uso

3.3.1. Diluyente para semen fresco

El eyaculado recién colectado, se mantiene a una temperatura de +30°C a +33°C y se analiza. Después de retirar el gel, se determina su volumen, concentración y motilidad. En función del número que se desea de espermatozoides con motilidad progresiva en la dosis de inseminación, se calcula la cantidad necesaria de diluyente. El diluyente y el semen deben tener la misma temperatura en el momento de la primera dilución (+/-1°C). El diluyente se añade lentamente al eyaculado filtrado y sin gel y ambos líquidos se mezclan suavemente.

Después de la dilución, el semen debe enfriarse lentamente. La velocidad de enfriamiento recomendada es de < 0,3°C por minuto, es decir, hasta 5 horas cuando se enfría de la temperatura ambiente a +5°C.



Cálculo del volumen final del semen diluido:

Dilución sin centrifugación:

La tasa de dilución óptima debe ser de al menos 1:3 (semen : diluyente) para obtener 25 millones de espermatozoides motiles/ml después de la dilución final. Los espermatozoides motiles recomendados por dosis de inseminación es de 600 millones. El volumen de inseminación debe ser de 10-30 ml.

Ejemplo:

Datos del eyaculado recién colectado:

Volumen del eyaculado = 45 ml

Concentración del semen = 145 millones/ml

Número total de espermatozoides = 6,525 mil millones ($6,525 \times 10^9$)

Motilidad = 60%.

→ espermatozoides motiles en el eyaculado = 3,915 mil millones

De este eyaculado se pueden obtener 6 dosis de inseminación, cada una de las cuales contiene 600 millones de espermatozoides ($3,915 \text{ mil millones} / 600 \text{ millones} = 6,5 \text{ dosis}$).

Para alcanzar una dilución óptima que contenga 25 millones de espermatozoides motiles/ml, el volumen final debe ser 156 ml ($3,915 \text{ mil millones} / 25 \text{ millones} = 156,6 \text{ ml}$). Cada dosis de semen será de 26 ml ($156 \text{ ml} / 6 \text{ dosis} = 26 \text{ ml}$).

Dilución con centrifugación:

La tasa de dilución óptima y el número de espermatozoides motiles por dosis siguen siendo iguales. El volumen de las dosis puede reducirse (10-15 ml).

Ejemplo:

Datos del eyaculado recién colectado:

Volumen del eyaculado = 45 ml

Concentración del semen = 145 millones/ml

Número total de espermatozoides = 6,525 mil millones

Motilidad = 60%.

→ espermatozoides motiles en el eyaculado = 3,915 mil millones

Tras la centrifugación (véase 3.3.2.), se determina el volumen, se evalúa la motilidad y, basándose en la evaluación de la concentración con la cámara de recuento, se calcula de nuevo el número de espermatozoides del eyaculado. Otra opción es calcular la nueva concentración tomando el recuento de espermatozoides del eyaculado nativo determinado por el fotómetro y ajustado en un -20% para tener en cuenta la pérdida de células durante la centrifugación.

Datos después de la centrifugación:

Volumen = 10 ml

Concentración de semen = 522 millones/ml

Número total de espermatozoides = 5,220 mil millones

Motilidad = 60 %.

→ Espermatozoides motiles = 3,132 mil millones

De este eyaculado se pueden obtener 5 dosis de inseminación con 600 millones de espermatozoides motiles por dosis ($3,132 \text{ mil millones} / 600 \text{ millones} = 5,2 \text{ dosis}$). El volumen final será de 75 ml con 15 ml de volumen por dosis de inseminación ($5 \times 15 \text{ ml}$). Hay que añadir 65 ml de diluyente EquiPlus al semen.

EquiPlus es adecuado para la conservación del semen durante 3 días a aproximadamente +5°C. Hasta su aplicación es muy recomendable el control diario de calidad.

3.3.2. Centrifugación

El diluyente EquiPlus preparado y el eyaculado libre de gel, se mezclan 1+1. La centrifugación se realiza a 500-800 g durante 5-10 minutos. Después de la centrifugación se elimina el sobrenadante (debe quedar al menos un 5% de plasma seminal del sobrenadante) y el pellet se vuelve a suspender con 3-5 ml de diluyente EquiPlus. Para conseguir un mayor rendimiento de espermatozoides se recomienda trabajar con CushionFluid (Ref. 13580/0001). Para ello, antes de la centrifugación se coloca el eyaculado diluido sobre una capa de 3-4 ml de CushionFluid en un vial. La centrifugación se realiza a 1000 g durante un máximo de 20 minutos. Después de la centrifugación, los espermatozoides se encuentran en la capa entre el CushionFluid y el sobrenadante. El CushionFluid debe ser eliminado (así como el sobrenadante) antes de continuar con el procesamiento del semen.

4. Almacenamiento, caducidad y consejos importantes

4.1. Almacenamiento, estabilidad

Los envases de **EquiPlus** deben almacenarse en condiciones frescas (por debajo de +10°C), en ambiente oscuro y seco. La vida útil mínima aparece impresa en cada envase.

El diluyente ya preparado puede conservarse hasta 3 días si se almacena en el frigorífico (+2°C - +8°C). También puede alicuotarse y almacenarse a -18°C durante aproximadamente 6 meses.

4.2. Consejos importantes



**Mantenga fuera del alcance de niños.
El diluyente no es adecuado para el tratamiento o consumo de
personas o animales.**

Antes de cada uso, compruebe que el diluyente tiene las propiedades descritas, especialmente en cuanto a su consistencia y aspecto. En caso de que dicha apariencia no sea la normal, el diluyente no podrá ser utilizado o sólo podrá serlo después de haber consultado a Minitube.

4.3. Solución de problemas

Para una buena conservación del semen y el éxito de la inseminación son cruciales, entre otros, algunos factores

- Utilización de materiales y superficies exclusivamente inocuos para el semen y el diluyente (guantes de recogida, bolsas para el semen y el diluyente, recipientes libres de residuos).
- Buena gestión de la temperatura, en particular evitando diferencias de temperatura > 1°C al mezclar el semen y el diluyente.
- Evitar la contaminación bacteriana (manejo adecuado de los verracos y preparación de la recogida; recogida de semen en ambiente limpio y con doble guante, protocolo de higiene adecuado en el laboratorio).
- Evitar los factores tóxicos para el semen (agua, luz UV, polvo, detergente).
- Calidad del agua utilizada (ver punto 3.2).

4.4. Asesoramiento y formación

Puede confiar en los científicos del equipo de Minitube para que le asesoren y apoyen técnicamente en todos los aspectos relacionados con la producción de semen y el proceso de inseminación artificial. Se organizan cursos y seminarios de forma personalizada. Consulte nuestra página web para obtener información acerca de la programación actual.



5. Estándares de producción y controles de calidad

5.1. Calidad de materias primas

Todas las materias primas utilizadas en los medios de Minitube se producen de acuerdo con las normas GMP y DIN ISO 9001:2015, y están certificadas para cumplir con las normas Ph Eur, BP o USP. Se someten a pruebas y cumplen con las directrices internacionales vigentes que regulan la calidad de las sustancias farmacéuticas.

5.2. Estándar de producción

La producción de todos los medios Minitube se realiza en condiciones GMP (buenas prácticas de manejo) en sala blanca con protocolos de pesaje documentados. Bajo la dirección de veterinarios especializados, cada lote del producto final pasa por una serie de pruebas físico-químicas y se utiliza en condiciones prácticas para conservar el semen. Esto garantiza que los medios Minitube puedan proporcionar de forma consistente las condiciones óptimas para la conservación seminal bajo condiciones climáticas diversas.

5.3. Certificados

El certificado de calidad del producto y el certificado de lote están disponibles a petición del cliente

EquiPlus - это культуральная среда для спермы жеребцов, которая подходит для сохранения спермы при температуре от прибл. +5°C в течение прибл. 72 часов. Кроме того, **EquiPlus** пригодна для центрифугирования спермы жеребцов. **EquiPlus** поставляется в виде порошка и требует стерильной сверхчистой воды для производства готового разбавителя.

EquiPlus Combi поставляется в специальном флаконе и содержит порошок и сверхчистую воду отдельно.

1. Состав

EquiPlus - это разбавитель на основе обезжиренного молока.

Продукты Арт. 13570/0202, /0210, /0215, /0220 и /0221 содержат антибиотики.

2. Объемы упаковок и варианты

Арт.	Содержание антибиотика на 1000 мл разбавителя:
13570/0202 13570/0210 13570/0220	0,15 г линкомицина и 0,25 г спектиномицина
13570/0215	1 г амикацина и 0,64 г пенициллина
13570/0221	0,25 г Гентамицин

EquiPlus	1 l	100 ml	без Антибиотики	линкомицина спектиномицина	амикацина пенициллина
13570/0201	X		X		
13570/0202	X			X	
13570/0210		X		X	
13570/0215		X			X
13570/0240		X	X		

EquiPlus Combi	1 l	100 ml	без Антибиотики	Гентамицин	линкомицина спектиномицина
13570/0220		X	X		
13570/0221		X		X	
13570/0222		X			X

3. Применение

3.1. Приготовление разбавителя, готового к использованию

3.1.1. **EquiPlus** в форме порошка в герметичных пакетиках

Содержимое пакетика **EquiPlus** - это белый порошок, не содержащий частиц другого цвета, и без комков. Порошок **EquiPlus** нужно растворить в 1000 мл или 100 мл очищенной, стерильной воды. Вода предварительно подогревается до температуры +30-35°C. Жидкость смешивают путем легкого взбалтывания или перемешивания до тех пор, пока порошок полностью не растворится.



Если используется EquiPlus без антибиотиков и добавляется какой-либо антибиотик, то необходимо проверить pH приготовленного разбавителя и подкорректировать кислотность в случае необходимости (напр., добавлением гидрокарбоната натрия). Кислотность (pH) должна быть прибл. 6.8.

Готовый к использованию разбавитель представляет собой непрозрачную жидкость серо-белого цвета, без комков или частиц. Можно начинать разбавлять им сперму после адаптации в течение 15 - 20 минут.

3.1.2. EquiPlus Combi

Порошкообразный EquiPlus находится в крышке флакона. Порошок EquiPlus высвобождается при повороте крышки и падает в очищенную воду в бутылке. Воду предварительно нагревают до температуры от +30°C до +35°C. Жидкость перемешивают взбалтыванием или перемешиванием до полного растворения порошка. Готовый разбавитель жидкий, без комков и видимых частиц, серо-белого цвета, непрозрачный. После периода адаптации от 15 до 20 минут можно начинать разведение спермы.

3.2. Качество воды

Качество используемой воды имеет очень большое значение. Подходит вода, очищенная дистилляцией, деионизацией, через систему обратного осмоса, либо путем сочетания этих методов, и которая отвечает следующим требованиям в отношении показателей:

Удельная проводимость менее 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$

Количество бактерий менее 1 CFU (колониеобразующая единица) на 10 мл

Следует обратить особое внимание на исключение возможности бактериального загрязнения уже приготовленной воды, например, при использовании нестерильных шлангов, трубок, или емкостей для хранения.

Если нет соответствующего оборудования для очистки воды, то бидистиллированную стерильную воду следует покупать у надежного поставщика.



Никогда не используйте дистиллированную воду, применяемую для бытовых приборов!

3.3. Рекомендуемое применение

3.3.1. Разбавление свежей спермы

Свежеполученную сперму жеребца сохраняют при поддерживаемой температуре +30°C - +33°C и проводят ее анализ. После удаления гелеобразного компонента определяют объем, концентрацию и подвижность спермы. Если объем эякулята необходимо уменьшить, то сначала следует выполнить первичное разбавление 1:1 с использованием **EquiPlus** и центрифугирование (см. 3.3.2). В противном случае объем разбавителя **EquiPlus** рассчитывается в зависимости от желаемого количества подвижных спермиев в спермодозе. В момент первого разбавления температура разбавителя и спермы должна быть одинаковой (+/- 1°C). Разбавитель медленно добавляют к отфильтрованному эякуляту, не содержащему гелевого компонента, и 2 фракции аккуратно, но тщательно перемешиваются.

После разбавления сперму больше не нужно сохранять в теплых условиях. Рекомендуемая скорость охлаждения составляет 0,3°C в минуту, соответственно охлаждение от комнатной температуры до температуры +5°C занимает до 5 часов.

Расчет конечного объема разбавленной спермы:

Разбавление без центрифугирования:

Оптимальная степень разбавления должна составлять не менее 1 : 3 (сперма : разбавитель **EquiPlus**), или 25 миллионов подвижных спермиев/мл после окончательного разбавления. Рекомендуемая доза подвижных спермиев на спермодозу – 600 миллионов. Объем для осеменения должен составлять 10-30 мл.

Пример:

Данные по свежеполученному эякуляту:

Объем эякулята = 45 мл

Концентрация спермы = 145 млн./мл

Общее количество спермиев в эякуляте = 6,525 млрд. ($6,525 \times 10^9$)

Подвижность = 60%

→ подвижных спермиев в эякуляте = 3,915 млрд. спермиев

Из данного эякулята можно получить 6 спермодоз для искусственного осеменения, каждая из которых будет содержать 600 миллионов спермиев ($3,915 \text{ млрд.} / 600 \text{ млн.} = 6,5 \text{ доз}$).

Чтобы достичь оптимального разбавления с содержанием 25 миллионов подвижных спермиев/мл, окончательный объем должен составлять 156 мл ($3,915 \text{ млрд.} / 25 \text{ миллионов} = 156,6 \text{ мл}$). Объем каждой спермодозы будет равняться 26 мл ($156 \text{ мл} / 6 \text{ доз} = 26 \text{ мл}$).

Разбавление с центрифугированием:

Оптимальная степень разбавления и количество подвижных сперматозоидов на спермодозу остаются неизменными. Объем доз может быть уменьшен (10 - 15 мл).

Пример:

Данные по свежеполученному эякуляту:

Объем эякулята = 45 мл

Концентрация спермы = 145 миллионов/мл

Общее количество спермиев в эякуляте = 6,525 млрд.

Подвижность = 60%

→ подвижных спермиев в эякуляте = 3,915 млрд. спермиев

После центрифугирования (см. 3.3.2) определяют объем, проводят оценку подвижности и, на основе подсчетов, проведенных с помощью счетной камеры, рассчитывают новое число спермиев в эякуляте. В качестве альтернативы можно рассчитать концентрацию нативного эякулята с поправкой на 20% потерь из-за центрифугирования.

Данные после центрифугирования:

Объем = 10 мл

Плотность семян = 522 миллиона / мл.

Общее количество сперматозоидов = 5,22 миллиарда сперматозоидов.

Подвижность = 60%

→ подвижные сперматозоиды в эякуляте = 3,132 млрд. сперматозоидов

Из этого эякулята можно получить 5 порций для осеменения, каждая из которых содержит 600 миллионов сперматозоидов на дозу ($3,132 \text{ млрд.} / 600 \text{ млн.} = 5,2 \text{ порции}$). Таким образом, конечный объем 15 мл на дозу составляет 75 мл ($5 \times 15 \text{ мл}$), и необходимо добавить 65 мл разбавителя.

EquiPlus подходит для сохранения спермы сроком до 3-х дней при температуре прибл. +5°C. Очень рекомендуется до применения ежедневно проводить анализ качества.



3.3.2. Центрифугирование

Отфильтрованный, не содержащий геля эякулят разбавляют 1: 1 приготовленным разбавителем EquiPlus. Центрифугирование происходит при 500-800 г в течение 5-10 минут. После центрифугирования супернатант удаляется (должно оставаться не менее 5% семенной плазмы супернатанта), а осадок растворяется (ресуспендируется) в 3-5 мл разбавителя EquiPlus. Чтобы получить более высокий выход сперматозоидов, можно работать с CushionFluid (Арт. 13580/0001). Для этого разбавленный эякулят помещают под стакан центрифуги с 3-4 мл амортизирующей жидкости перед центрифугированием. Затем его можно центрифугировать при 1000 г до 20 минут. После центрифугирования сперматозоиды располагаются в виде полосы между CushionFluid и супернатантом. CushionFluid (как и супернатант) необходимо удалить перед дальнейшей обработкой.

4. Способ хранения, срок годности при хранении, важные указания

4.1. Способ и срок хранения

Герметичные упаковки следует хранить в прохладном (ниже +15°C), сухом и темном месте. Минимальный срок годности при хранении напечатан на каждой упаковке.

Готовый к употреблению разбавитель можно хранить до 3-х дней в холодильнике (+2°C - +8°C). Разбавитель можно также разделить на необходимые дозы и хранить в замороженном состоянии при -18°C около 6 месяцев.

4.2. Важные указания



**Хранить в местах, недоступных для детей.
Не касайтесь порошка руками без перчаток и не вдыхайте его.
Продукт не предназначен для потребления людьми или животными, или применения в качестве лекарственного препарата.**

Перед каждым использованием разбавителя следует тщательно проверять его соответствие характеристикам, описанным в п.3.1., особенно в плане консистенции и внешнего вида. Если консистенция или внешний вид разбавителя отличаются от обычных, то такой разбавитель использовать нельзя.

4.3. Устранение возможных проблем

Для надежного сохранения спермы и успеха искусственного осеменения решающими являются несколько факторов, а именно:

- Использование только таких материалов и поверхностей, которые безвредны для спермы и разбавителя (перчатки для сбора спермы, бутылочки для спермы и разбавителя, отсутствие минеральных осадков внутри стеклянной лабораторной посуды).
- Надежный температурный контроль, в частности недопущение возможности падения температуры ниже +30° для неразбавленной спермы и ниже +4°C для разбавленной спермы, а также исключение температурных колебаний.
- Исключение возможности бактериального загрязнения (путем соответствующей организации работы с жеребцами и препаратами для взятия спермы; сбор спермы в чистых условиях, соблюдение соответствующего гигиенического протокола в лаборатории).
- Исключение возможности воздействия на сперму токсических факторов (вода, УФ излучение, пыль, моющее средство).
- Качество очищенной воды (см. пункт 3.2).

4.4. Консультирование и обучение

По любым техническим вопросам, связанным с производством спермы и искусственным осеменением, Вы можете обращаться к экспертам Minitüb. Компания Minitüb предлагает индивидуальную подготовку. Актуальные предложения по тренингам представлены на нашей web-странице.

5. Стандарт производства и контроль качества

5.1. Качество исходных материалов

Все используемые Minitüb исходные материалы производятся в соответствии с нормами GMP и DIN ISO 9001:2015, и сертифицированы по стандартам Ph Eur, BP или USP. Они протестированы в соответствии с международными директивами проверки адекватности качества фармакологических веществ и соответствуют названным требованиям.

5.2. Стандарт производства

Производство всех сред Minitüb осуществляется в соответствии с требованиями GMP в чистом помещении и документируется протоколами о взвешивании. Под квалифицированным ветеринарным надзором каждая партия продукции подвергается ряду химико-физических испытаний и используется в практических условиях для консервации спермы. Это гарантирует, что среда Minitüb неизменно обеспечивает высокую сперматологическую эффективность при консервации спермы в широком диапазоне климатических и технологических условий.

5.3. Сертификаты

Общие сертификаты качества, а также Сертификаты анализа конкретных партий предоставляются по запросу.

8. Auflage/Edition/Edición/Издание 2023

© 2023 Minitüb GmbH, Tiefenbach

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, vorbehalten.
Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit schriftlicher Genehmigung. Kein Teil des Handbuchs darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Zustimmung der Minitüb GmbH reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.
Alle Marken-Produktamen sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Titelhälter.
Irrtum und technische Änderungen vorbehalten.
Produkt nur in einwandfreiem Zustand und unter Beachtung der Bedienungsanleitung betreiben/ verwenden.
Zum künftigen Nachschlagen aufbewahren (gem. EN ISO 12100).
Übersetzt aus dem Deutschen.

All rights reserved, including the translation.
Reprint, even in extracts only with a prior written permission. No part of this manual may be reproduced or transmitted in any form or by any means electronic, mechanical, photocopying, without the prior written permission of Minitüb GmbH.
All brand product names are trademarks or registered trademarks of the respective title holder.
Errors and technical alterations excepted.
Use product only in perfect condition and in compliance with the manual.
Keep safe for future consulting (according to EN ISO 12100).
Translated from German.

Todos los derechos reservados, incluyendo la traducción.
Reimpresión, incluyendo reimpresión parcial, sólo permitida previa autorización escrita. Sin la autorización escrita de Minitüb, ninguna parte del manual debe ser procesada, reproducida y difundida mediante sistemas electrónicos.
Todos los nombres de marcas o productos son marcas de producto o marcas registradas propiedad del fabricante.
Reserva del derecho a error y a modificaciones.
Operar/utilizar el producto sólo en estado inobjetable y en estricta observación del manual de operación.
Conservar para consultas posteriores (según EN ISO 12100).
Traducción del Alemán.

Полная или частичная перепечатка материалов допускается только при условии получения предварительного письменного разрешения. Копирование или передача данного Руководства в любой форме и с использованием любых средств, в том числе электронных, механических или фотокопируемых, без предварительного письменного разрешения Minitüb GmbH запрещена.
Все торговые марки и коммерческие наименования являются товарными знаками или зарегистрированными торговыми марками соответствующего правообладателя. Все права сохранены, включая перевод.
Оставляем за собой право на неточности и изменения.
Разрешается использовать продукт только в надлежащем состоянии и в строгом соответствии с Руководством по эксплуатации.
Храните инструкции в надежном месте для обращения к ним в будущем (в соответствии с EN ISO 12100).
Перевод с немецкого языка.

Minitüb GmbH
Hauptstrasse 41
84184 Tiefenbach
Germany

Phone: +49 8709 9229 0
Fax: +49 8709 9229 39
email: minitube@minitube.de
Internet www.minitube.com

CEO: Dr. Christian Simmet
Register Court Landshut: HRB 4129
VAT-Id.No.: DE 182191255