



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

LEPEX – LEPEX Instruction Manual

The LEPEX extender is produced through the mixing and fine crushing of biochemical compounds (without water and being of pharmaceutical quality) and a minimal quantity of antibiotics in a controlled environment, with the help of special equipment and under special conditions of use. This process results in the formation of a high-quality, homogeneous, micronised powder which is easily soluble in water. After the preparation of the extender, it is essential to allow the mixture to stand for one hour to ensure complete hydration.

This LEPEX product is stored in polypropylene vials which are hermetically sealed with the help of a tight screw-on lid.

Each vial contains 62 grams of powder which corresponds to the preparation of one litre of the diluent.

Collecting, evaluating, diluting and storing the rabbit sperm

1. Preparing the extender

The extender can be prepared in a number of ways.

- a. Dilute the powder the day before collection in an adequate quantity of distilled water at room temperature and then store the mixture in the fridge. *If clumps* begin to form, these can be easily broken up using a spoon.* On the day of the collection, gently shake the extender and then store it at 32°C. The extender then needs to be kept in an oven and maintained at a temperature of 32°C.
- b. On the day of the collection, dilute the powder in the correct amount of water at 32°C. *If clumps* begin to form, these can be easily broken up using a spoon.* Leave to set for one hour before gently shaking. The extender then needs to be kept in an oven and maintained at a temperature of 32°C.

***Note: As a result of a physical reaction, small portions of micronised powder can clump. This is a natural occurrence and does not have any negative effect on the high quality of the extender. It is advisable to keep the extender in the fridge (4°C) to minimise the formation of clumps and also to respect the storage duration of the product.**

Any supplementary products (such as GnRH types - which are not delivered by HuVeSearch and are solely the responsibility of the user) being used should be added to the mixture shortly before the collection.

Note: Any surplus of the extender can be aliquoted into plastic tubes and placed in the freezer in order to be used in the weeks that follow. On the day of the collection, the tubes should be taken out of the freezer and placed in a water bath at 32°C. Alternatively, they can be placed in the fridge the day before collection to allow them to defrost slowly.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

2. Preparing the artificial vagina.

The artificial vagina can be prepared in numerous ways.

- a. Prepare the artificial vaginas the day before collection. Fill with cold water and place them in an incubator at 45°C.
- b. Prepare the artificial vaginas on the day of collection. Fill them with water heated to approximately 50°C. It is essential to be sufficiently exact and to check the temperature with the help of a thermometer.

Bring the number of collection vials needed to the desired temperature. This can be done in two ways:

- a. Keep the collection vials in an incubator at 32°C with the extender (32 °C)
- b. Store the vials in an incubator or a water bath at 50 °C.

3. Collecting the sperm.

Shortly before carrying out the collection of sperm, place the collection vial in the collection system (artificial vagina). The time between set-up and collection needs to remain as short as possible in order to avoid the cooling down of the collection vial. Collect the sperm following normal procedures.

4. Macroscopic visual observation of the sperm

Observe the collected sperm in order to evaluate defects and quality.

If there is not enough sperm or if the sperm is too transparent, yellow, brown or red, the collected sperm cannot be used.

If any gel is present, this should be removed with the help of a pipette.

Good quality sperm has a milky, white appearance.

5. Initial dilution of sperm

After quickly observing the sperm, dilute the sperm in the vial using the extender. This can be done in a number of ways:

- a. Carefully add a volume of the extender equal to the amount of the collected sperm and shake carefully
- b. Carefully add a couple of millilitres of the extender to the sperm to dilute the sperm to a rough ratio of 1:10. (1 part sperm to 9 parts extender)

6. Microscopic evaluation of the sperm

For a microscopic evaluation of the sperm, the sperm should further be diluted. To do this, take a small quantity of pre-diluted sperm and dilute it again in the same extender in order to obtain a final dilution with a ratio of 1:200.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

In the case of a first step 1:1 dilution (ref. point A above), it is necessary to dilute further to a ratio of 1:100.

In the case of a pre-dilution of 1:10 (ref. point B above), it is necessary to dilute the pre-diluted sperm further to a ratio of 1:20.

Take 10 micro-litres of this diluted sperm and place onto a microscopic slide (preheat to 37°C) and place a 22x22mm cover-slide over it.

A counting chamber can also be used.

Only use ejaculates which have a total mobility of above 75%.

7. Timing the mixing of different ejaculates.

The desired end result is the mixing of different ejaculates in order to be able to distribute high-quality, commercial quantities. This can be achieved in a number of different ways:

- a. Mixing sperm directly after ejaculation
- b. Mixing pre-diluted sperm
- c. Mixing post-diluted sperm which has the final desired concentration.

Each method has both advantages and disadvantages.

Method A appears to be the simplest but prevents the microscopic testing of different samples and forces the use of a fixed-ratio dilution.

Method B also prevents microscopic testing but works on the assumption that it is better to allow the cells to stabilise in a smaller quantity of extender.

Method C has the advantage of being able to optimise each ejaculate individually after microscopic observation.

In all circumstances, it is essential to proceed in the quickest amount of time possible to the dilution steps, including the last one, to guarantee the quality of sperm.

8. Final dilution of the sperm

The final dilution of the pre-diluted sperm occurs in order to optimise the production on the basis of the final concentration of sperm cells. The final concentration can be influenced by different factors. A target concentration of 20 million cells per millilitre acts as a good reference value. For precise calculations, the only solution is the use of a counting chamber.

9. Storage of diluted sperm

Once it has reached its target concentration, the diluted sperm should be stored at an ideal temperature of 17°C. In order to maintain fertility, it is essential that the time between the collection of the sperm and its storage at 17°C is reduced as much as possible.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

LEPEX – Mode opératoire

Le diluant LEPEX est produit par mélange et broyage très fin de composé biochimiques (sans eau et de qualité pharmaceutique) et d'une quantité minimale d'antibiotiques dans une atmosphère contrôlée et l'aide d'appareillage spéciaux et sous des conditions d'utilisation spécifiques. Ce processus conduit à l'obtention d'une poudre micronisée de haute qualité, homogène et facile soluble dans l'eau. Après mise en solution, il est essentiel de laisser reposer le mélange durant une heure pour garantir une hydratation complète.

Le produit LEPEX est conditionné dans des flacons en polypropylène, fermés hermétiquement à l'aide d'un couvercle vissé et scellé.

Chaque flacon contient 62 gr de poudre qui correspond à la préparation d'un litre de diluant.

Collecte, évaluation, dilution et conservation du sperme de lapin

1. Préparation du diluant

Le diluant peut être préparé de plusieurs façons.

- a. Diluer la poudre le jour précédant la collecte dans la quantité adéquate d'eau distillée à température ambiante et conserver ensuite la préparation au frigo. *En cas de formation de petits grumeaux*, ceux-ci peuvent être aisément brisés avec une cuillère.* Le jour de la récolte, agiter délicatement le diluant et ensuite le placer à 32°C. Celui-ci doit dès cette étape être maintenu à 32°C dans une étuve.
- b. Diluer la poudre le jour de la collecte dans la juste quantité d'eau portée à 32°C. *En cas de formation de petits grumeaux*, ceux-ci peuvent être aisément brisés avec une cuillère.* Laisser reposer une heure et mélanger délicatement. Celui-ci doit dès cette étape être maintenu à 32°C dans une étuve.

***Remarque :** De petites portions de poudre micronisée peuvent, par réaction physique, former des grumeaux. Ce phénomène est naturel et n'entraîne aucun impact négatif sur la haute qualité du diluant. Il est conseillé de garder le diluant au frigo (4°C) pour minimiser la formation de ces grumeaux et également respecter le temps de conservation du produit.

Si un produit complémentaire (type GnRH – non fourni et sous la responsabilité exclusive de l'utilisateur) doit être ajouté au mélange, il y a lieu de le faire juste avant la collecte.

Note : En cas de surplus de diluant préparé, ce surplus peut être aliquoté en tubes en plastique et placé au congélateur pour être utilisé dans les semaines qui suivent. Le jour de la collecte, les tubes doivent être retirés du congélateur et placés dans un bain-marie à 32°C ou le jour précédent placés au frigo pour permettre une décongélation lente.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

2. Préparation de la gaine de collecte.

La gaine de collecte peut être préparée de plusieurs manières.

- a. Préparer les gaines de collectes la veille de la collecte, remplir d'eau froide et placer celles-ci dans un incubateur à 45°C.
- b. Préparer les gaines de collecte le jour de la collecte et les remplir avec de l'eau chaude portée à 50°C environ. Il est essentiel d'être suffisamment précis et de contrôler cette température à l'aide d'un thermomètre.

Amener un nombre suffisant de flacons de récolte propres à température désirée. Cela peut se faire de deux manières :

- a. Garder les flacons de collecte dans l'incubateur à 32°C avec le diluant (32 °C)
- b. Garder les flacons dans un incubateur ou un bain-marie à 50 °C.

3. Collecte du sperme.

Juste avant de réaliser la collecte du sperme, placer le flacon de collecte sur le système de collecte (vagin artificiel). Le temps entre le montage du système et la collecte doit rester le plus court possible afin d'éviter tout refroidissement du flacon de collecte. Collecter ensuite le sperme de façon habituelle.

4. Observation visuelle macroscopique du sperme

Observer le sperme recueilli afin d'évaluer les défauts et les qualités.

Trop transparent, trop peu, jaune, brun ou rouge, le sperme recueilli ne peut être utilisé.

En cas de présence de gel, celui-ci doit être éliminé à l'aide d'une pipette.

Un sperme de bonne qualité présente un aspect laiteux et de couleur blanche.

5. Première dilution du sperme

Juste après avoir réalisé la rapide observation, le sperme doit être dilué dans le flacon à l'aide du diluant. Ceci peut se faire de plusieurs manières :

- c. Ajouter avec précaution un volume de diluant égal au volume de sperme récolté, remuer alors avec précaution
- d. Ajouter avec précaution quelques millilitres du milieu de dilution afin d'obtenir une dilution d'un facteur 1/10 environ. (Une part de sperme et 9 parts de diluant)

6. Évaluation microscopique du sperme

Pour permettre une évaluation microscopique du sperme, celui-ci doit encore être dilué. Pour se faire, prélever une petite quantité du sperme pré-dilué et le re-diluer dans le même diluant afin d'obtenir une dilution finale d'un facteur 1/200. Dans le cas d'une première étape de dilution à un facteur 1/1 (cfr point a ci-dessus), il faut à nouveau diluer d'un facteur 1/100.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

Dans le cas d'une pré-dilution à 1/10 (cfr point b ci-dessus), il faut à nouveau diluer le sperme pré-dilué d'un facteur 1/20.

Placer cette dilution de sperme à raison de 10 microlitres sur une lame microscopique préchauffée à 37°C et couvrir d'une lamelle couvre-objet de 22x22mm.

Une chambre de comptage peut également être utilisée.

N'utilisez que les éjaculats présentant une mobilité totale supérieure à 75%.

7. Moment idéal de mélange de différents éjaculats.

Il est vraisemblable que, pour des raisons commerciales de distribution de quantités optimales, le mélange de différents éjaculats soit envisagé. Pour se faire, différentes options sont possibles :

- a. Mélange du sperme juste après éjaculation
- b. Mélange du sperme pré-dilué
- c. Mélange du sperme après dilution dans la forme de dilution finale des éjaculats.

Chaque méthode présente ses avantages et inconvénients.

La méthode a paraît être la plus simple mais empêche le contrôle microscopique des différents prélèvements et force l'utilisation d'un facteur de dilution fixe.

La méthode b empêche également l'observation microscopique mais part du principe qu'il est mieux de laisser les cellules se stabiliser dans une plus petite quantité de diluant.

La méthode c présente l'avantage de pouvoir optimiser chaque éjaculat individuellement après observation microscopique.

Il est, quoi qu'il en soit, essentiel de procéder aux étapes de dilution, dernière y compris, dans le temps le plus court possible pour garantir la qualité du sperme.

8. Dilution finale du sperme

La dilution finale du sperme pré-dilué afin d'optimiser le produit sur base d'une concentration finale de cellules spermatiques. La concentration finale peut être influencée par différents facteurs. Une concentration cible de 20M/ml présente une bonne valeur de référence. Pour fixer des normes précises, la seule option reste de décompte en chambre de comptage.

9. Conservation du sperme dilué

Le sperme dilué à sa concentration finale doit être conservé à une température idéale de 17°C. Pour le maintien de la fertilité, il est essentiel de garder le temps entre la collecte de sperme et sa mise en conservation à 17°C aussi courte que possible.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

LEPEX – Gebruiksaanwijzing

LEPEX wordt geproduceerd door het mengen en het fijnmalen van biochemische producten (watervrij en met farmaceutische kwaliteit) met een minimale hoeveelheid antibiotica in een atmosferisch gecontroleerde omgeving door gebruik te maken van speciale apparatuur en onder specifieke omstandigheden. Dit leidt tot het bekomen van een hoog, kwalitatief en homogeen gemicroniseerd poeder dat gemakkelijk oplost in water. Eenmaal opgelost in water, dient de LEPEX-oplossing één uur te blijven staan om volledige hydratatie te bekomen.

LEPEX wordt geleverd in polypropyleen potjes, hermetisch afgesloten met een verzegeld schroefdeksel.

Elke potje bevat 62 gr LEPEX poeder om één liter LEPEX verdunner te maken.

Het vangen, beoordelen, verdunnen en bewaren van sperma van konijnen.

1. Klaarmaken van de verdunner

De verdunner kan op verschillende manieren klaargemaakt worden.

- a. Los het poeder de dag vóór het vangen op in de juiste hoeveelheid gedestilleerd water bij kamertemperatuur en bewaar daarna in de koelkast. *Indien er zich echter kleine klontvorming* zou voordoen, kunnen deze met een lepel doorbroken worden.* Op de dag van vangen wordt de verdunningsvloeistof eerst rustig geschud en dan naar 32 °C gebracht en bewaard in een box of incubator bij 32 °C.
- b. Los het poeder op de dag van vangen op in water van 32 °C. *Indien er zich echter kleine klontvorming* zou voordoen, kunnen deze met een lepel doorbroken worden.* Laat een uur staan en schud daarna voorzichtig. Bewaar de aldus verkregen verdunningsvloeistof in een incubator bij 32 °C.

**** Opmerking: Zeer kleine gemicroniseerde deeltjes kunnen fysisch door cohesie een klontvorming veroorzaken. Dit is een natuurlijk fenomeen en heeft geen enkele negatieve invloed op de hoge kwaliteit van de verdunner. Er wordt aangeraden op de verdunner te bewaren op frigotemperatuur (4°C) op deze klontvorming te minimaliseren en ook om de bewaartijd te respecteren.***

Indien een complementair product gebruikt wordt (zoals bijv. een vorm van GnRH - niet aangeleverd door HuVeSearch en enkel op verantwoordelijkheid van de gebruiker) moet dit pas vlak voor het vangen van het sperma toegevoegd worden aan de verdunningsvloeistof.

Nota: Bij overschot van verdunner, kan deze hoeveelheid overgegoten worden in plastieken tubes en daarna diepgevroren (-20°C) om zodoende daarna, na enkele weken, te gebruiken. Op de dag van opvang, de nodige tube(s) uit de vriezer halen en de tubes in een waterbad plaatsen bij 32°C of de dag voordien de tubes in de frigo langzaam te laten ontdooien.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

2. Klaarmaken van de kunstschede.

De kunstschede kan op verschillende manieren klaargemaakt worden.

- a. Zet de kunstschede(s) de dag voor het vangen in elkaar (gebruik koud water) en zet deze in een incubator die ingesteld staat op 45° C.
- b. Zet de kunstschede op de dag van vangen in elkaar en vul deze met heet water. De temperatuur van het hete water moet ongeveer 50 °C zijn. Gebruik hiervoor een thermometer ter controle.

Breng schone sperma-opvangbuisjes – zoveel als nodig is – op temperatuur. Dit kan op verschillende manieren:

- a. Bewaar de buisjes in een incubator bij de verdunningsvloeistof (32 °C)
- b. Bewaar de buisjes in een waterbad of incubator bij 50 °C.

3. Vangen van het sperma.

Vlak voor het vangen van het sperma wordt het opvangbuisje in de kunstschede geplaatst. De tijd tussen in elkaar zetten en sperma vangen moet zo kort mogelijk zijn zodat kunstschede en opvangbuisje niet te veel afkoelen. Vang het sperma op de gebruikelijke manier.

4. Visuele beoordeling van het sperma.

Bekijk het sperma op visuele afwijkingen en op kwaliteit.

Te doorzichtig, te weinig, en geel, bruin of rood sperma wordt niet gebruikt.

Als er gel aanwezig is wordt dit met een pipet verwijderd.

Goede kwaliteit sperma heeft een melkachtig witte kleur.

5. Eerste verdunning van het sperma.

Direct na de snelle visuele beoordeling wordt het sperma in het buisje verdund met verdunningsvloeistof. Dit kan op verschillende manieren.

- a. Giet voorzichtig een hoeveelheid verdunningsvloeistof gelijk aan het volume van het sperma bij het sperma en schud het buisje voorzichtig.
- b. Giet voorzichtig enkele milliliters verdunningsvloeistof bij het sperma om het sperma ongeveer 1: 10 te verdunnen (één deel sperma en 9 delen verdunner)

6. Microscopische beoordeling van het sperma.

Voor de microscopische beoordeling moet het sperma verder verdund worden. Verdun een klein gedeelte van het voorverdunde sperma met dezelfde verdunningsvloeistof zodanig dat het originele sperma 1:200 verdund wordt. In het geval van het 1:1 voorverdunde sperma (zoals hierboven vermeld) dient er dus verder verdund te worden met een factor 1: 100.



Produced By HuVeSearch BVBA/SPRL
Europalaan, 11 - 3900 PELT - BELGIUM

In het andere geval dat men reeds 1:10 voorverdund sperma bezit, dient men deze verdunning verder door te verdunnen tot 1:20.

Neem zorgvuldig met een pipet, 10 microliter op een voorverwarmd microscoopglasje (37 °C) en bedek met een dekglasje van 22 x 22 mm.

Als alternatief kan een telkamer gebruikt worden.

Gebruik alleen ejaculaten met een totale motiliteit vertonen van meer dan 75%.

7. Het tijdstip van mengen van verschillende ejaculaten.

Uiteindelijk wil men dat verschillende ejaculaten bij elkaar komen om een commerciële hoeveelheid verdund sperma te verkrijgen. Hiervoor zijn verschillende mogelijkheden.

- a. Mengen van het sperma direct na ejaculatie
- b. Mengen van voorverdund sperma
- c. Mengen van doorverdund sperma dat de gewenste concentratie cellen bevat.

Elke methode heeft zijn voor- en nadelen.

Methode a. lijkt het eenvoudigst, maar dan ziet men af van microscopische beoordeling en hanteert men een vaste verdunningsfactor.

Methode b. ziet ook af van microscopische beoordeling maar gaat ervan uit dat het beter is om de spermacellen even te laten wennen aan een kleine hoeveelheid verdunningsvloeistof.

Methode c. heeft het voordeel om elk ejaculaat te optimaliseren na microscopische beoordeling.

In ieder geval dient het doorverdunnen met verdunningsvloeistof van 32 °C zo snel mogelijk te gebeuren.

8. Verdere verdunning van het sperma.

De doorverdunning van het voorverdunde sperma gebeurt zodanig dat men uit wil komen op de gewenste concentratie spermacellen. De uiteindelijke concentratie hangt af van verschillende factoren. Een concentratie van 20 miljoen cellen per milliliter is een goed uitgangspunt. Maar door visuele schatting zal men daar in de praktijk flink van afwijken. Wil men toch een correcte schatting maken, dan is een telkamer de enige oplossing.

9. Bewaren van het verdunde sperma.

Het doorverdunde sperma met zijn uiteindelijke concentratie dient bewaard te worden bij 17 °C. Voor het behoud van fertiliteit, dient de tijd tussen vangen van het sperma en de bewaring bij 17°C zo kort mogelijk gehouden te worden.