



Medizinische Labordiagnostika Soukou

SemenFru

(Semen fructose test/Spermien Fruktose Test/Test de fructose des spermatozoïdes)

MANUAL

PAGE 2-4

GEBRAUCHSANWEISUNG

SEITE 5-7

INSTRUCTIONS (EN RÉDACTION)

PAGE 8-10



ANTIGENES
Medizinische Labordiagnostika
Soukou
Hustadttring 151
44801 Bochum
Germany

Tel.: +49 234-91795580
Fax: +49 234-91795581
Email: info@antigenes.de
Homepage: www.antigenes.de

REF Art.-No. ZR10200
up to 88 Applications



IVD *in vitro diagnostics*

Manual

PLEASE READ CAREFULLY

SemenFru

(Semen fructose test)



For Professional use Only

Application

The determination of the content of fructose in the seminal fluid is a biochemical marker for the secretory function of the seminal vesicle (seminal vesicle). It is also an additional diagnostic value in terms of transport abnormalities in sperm or closures of the seminal tract (high shutter near the urethra or vas deferens aplasia).

Principle

Under the influence of concentrated hydrochloric acid (low pH), combined heat, fructose forms in the presence of indole a color complex, which can be determined spectrophotometrically.

Storage and stability

- ☒ 2-8°C (light protected)
- ☒ 24 months from date of manufacture

Content

▪ Reagent 1 (TCA)	10 ml
▪ Reagent 2 (Fructose)	10 ml
▪ Reagent 3 (Indole)	5 ml
▪ Reagent 4 (HCl)	2 x 10 ml
▪ Reagent 5 (NaOH)	5 ml
▪ Micro titer plate	

Required utensils (not included)

- Distilled water
- Gloves
- Native ejaculate or seminal plasma (100 µl)
- Slides
- Paper towels
- Pipettes and tips (10-100 and 100-1000 µl)
- Test tubes (1.5 or 2 ml)
- Test tube holder
- Centrifuge
- Micro-plate reader
- Water bath or incubator 37°C
- Vortex / mixer

Examination of fructose standard curve

		Dist. H ₂ O	Reagent 2	Fructose- concentration
1. Blank	V ₀	100 µl	0 µl	0 mg/ml
2. Dilution	V ₁	80 µl	20 µl	1 mg/ml
3. Dilution	V ₂	60 µl	40 µl	2 mg/ml
4. Dilution	V ₃	40 µl	60 µl	3 mg/ml
5. Dilution	V ₄	20 µl	80 µl	4 mg/ml
6. Dilution	V ₅	0 µl	100 µl	5 mg/ml

It is recommended to re-create the standard curve in each experiment.

Procedure

1. Spin ejaculate 10 min at 1000xg.
2. Transfer 100 µl of the supernatant (seminal plasma) in a new tube
3. Add 100 µl of reagent 1 and incubate 15 min at room temperature.
4. Centrifuge then 15 min at 1000xg.
5. Transfer carefully the supernatant in a new reagent (sample is free of protein) and store in a cooled tube holder.
6. Pipette 25 µl of this sample and of standard dilution series in new tubes.
7. Pipette 25 µl of reagent 3 to the sample and to the dilution series and mix.
8. Pipette 200 µl of reagent 4 to all test tubes.
9. Close the tubes and incubate 30 min in a water bath or 60 min in an incubator
10. Stop the reaction with 200 µl of reagent 5.
11. Centrifuge all tubes for 1 min at 1000xg.
12. Pipette 200 µl of the supernatant (see scheme below) to the microtiter plate and measure the OD values (optical density, absorbance) at 470 nm in a micro-plate reader.

	1	2	3	4	5	...	12
A	V_0	V_0	P_1	P_1			
B	V_1	V_1	P_2	P_2			
C	V_2	V_2	P_3	P_3			
D	V_3	V_3					
E	V_4	V_4					
F	V_5	V_5					
G							
H							

Standard dilution: A1 and A2 to F1 and F2

Evaluation goal: To determine the fructose amount in total ejaculate.

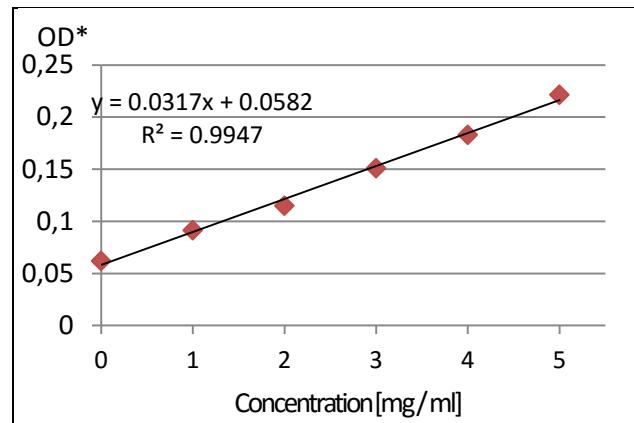
The average value is 13 µMol of fructose (2.4 mg) per ejaculate. If the amount is less than 13 µMol probably a blockage of the vas deferens, a congenital absence of the vas deferens, a partial reflux of ejaculate, an underactive glands within the seminal vesicle or an androgenic deficiency impairment is possible (WHO, 2010).

I. OD of the standard curve and samples:

	1	2	3	4	5	...	12
A	0.07	0.06	0.29*	0.31*			
B	0.10	0.09	0.20	0.21			
C	0.12	0.11	0.22*	0.38*			
D	0.16	0.15					
E	0.19	0.18					
F	0.22	0.22					
G							
H							

Creating of a fructose standard curve:

The fructose standard curve is created using a spreadsheet program (e.g. Microsoft Excel®). On the x-axis, the fructose concentrations (mg/ml) and on the y-axis the OD values were plotted. This also allows the calculation of the coefficient of determination (R^2), which is used to determine the working precision (1 to 99% and from 0.01 to 0.99) in the preparation of the standard curve; in the case of lower values than 0.99 the standard curve should be re-created.



*ODs of samples which are not within the range of the standard curve cannot be used for concentration determination. This must then be repeated with adjusted sample volumes.

II. Calculation of sample concentration:

The concentration of the sample can now be read or determined by using the slope function. The general formula of the standard curve is:

$$y = ax + c$$

y = OD sample

x = concentration of sample used (mg/ml)

a = slope function

c = linear constant of the curve

III. Calculation of the dilution factor:

Total volume (450 µl): (12.5 µl seminal plasma + 12.5 µl reagent 1 + 25 µl reagent 3 + 200 µl reagent 4 + 200 µl reagent 5) / 12.5 µl = 36

IV. We are looking for the total amount of fructose per ml of ejaculate. The calculation is performed in three steps:

1. Calculation of the concentration x of the sample used, derived from the general formula of the absorbance:

$$x \text{ (mg / ml)} = (y - c) / a$$

2. Calculation of the concentration of the undiluted sample

$$x \cdot \text{dilution factor}$$

3. To determine the total amount of fructose, the result is to be multiplied by the total volume (V) in ml of seminal plasma.

$$x \cdot \text{dilution factor} \cdot V$$

Note: The standard curve is linear up to 0.5 mg/ml; lower fructose concentrations cannot be accurately determined with this test.

Example

We are looking for the fructose amount of the discharged semen of patients P1 (3 ml) and P2 (5 ml). The calculation is performed in three steps:

1. Calculation of the amount of fructose in samples

$$x \text{ (mg/ml)} = (y - c) / a$$
$$P_2 \text{ (mg/ml)} = (0.205 - 0.065) / 0.03 \text{ ml/mg} =$$

4.66 mg/ml

2. Calculation of the amount of fructose in diluted samples

$$x / \text{ml} \cdot \text{dilution factor} = 4.66 \text{ mg/ml} \cdot 36 =$$

167.76 mg/ml

3. Calculation of the amount of fructose in ejaculate volume

amount of fructose (not diluted) • ejaculate volume

$$167.76 \text{ mg/ml} \cdot 5 \text{ ml} = \mathbf{838.8 \text{ mg}}$$

Results: The sample of patient 2 is noticeable.

Example 1: OD value above the highest standard

	old	new
Volume sample	25 µl	12.5 µl
Reagent 3	200 µl	237.5 µl

After measuring, the result is to be multiplied by a factor of 73. Total volume (450 µl): (6.25 µl seminal plasma + 6.25 µl reagent 1 + 25 µl reagent 3 + 212.5 µl reagent 4 + 200 µl reagent 5) / 6.125 = **73**

Example 2: OD below the lowest standard

	old	new
Volume sample	25 µl	50 µl
Reagent 3	200 µl	175 µl

After measuring, the result is to be multiplied by a factor of 18. Total volume (450 µl): (25 µl seminal plasma + 25 µl reagent 1 + 25 µl reagent 3 + 175 µl reagent 4 + 200 µl reagent 5) / 25 = **18**

Safety information / precautions (Please also consult SDS)

- All semen samples should be considered potentially infectious.
- Handle with all samples like HIV or hepatitis infected material.
- When working with samples and reagents wear always protective clothing (gloves, gowns, eye / face protection).
- Reagent 1 contains Trichloroacetic acid solution. It causes severe burns, is very toxic to aquatic organisms and may cause long-lasting adverse effects on the aquatic habitat. In case of eye contact, immediately rinse with plenty of water and seek medical advice. In

case of accident or if you feel unwell seek immediate medical attention.

- Reagent 3 (Indole) is harmful if swallowed and highly flammable. Avoid skin and eye contact.
- Reagent 4 (HCl). It causes burns on contact and irritation of the skin and respiratory tract irritation. In case of eye contact, immediately rinse with plenty of water and seek medical advice. In case of accident or if you feel unwell seek immediate medical attention.
- Reagent 5 (NaOH) causes burns. In case of eye contact, immediately rinse with plenty of water and seek medical advice. In case of accident or if you feel unwell seek immediate medical attention.

Never put water to concentrated acid (danger of explosion!).

References

1. Cooper TG et al. (1991) Variations in semen parameters from fathers. *Human Reproduction*, 6:859-866
2. Daudin M et al. (2000) Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, 74:1164-1174
3. Eckardstein S et al. (2000) Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 73:1226-1231
4. Karvonen MJ, Malm M (1955) Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian journal of clinical and Laboratory Investigation*, 7; 305-307
5. De la Taille A et al. (1998) Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, 8:370-376
6. WHO Press, (2010) Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th. Edition



REF Art.-Nr. ZR10200
bis zu 88 Anwendungen



IVD *in vitro* Diagnostik

Gebrauchsanweisung

BITTE SORGFÄLTIG LESEN



SemenFru

(Spermien Fruktose Test)

Nur für den professionellen Gebrauch

Anwendung

Die Bestimmung des Fruktose-Gehaltes in der Samenflüssigkeit ist ein biochemischer Marker für die sekretorische Funktion der Samenblase (*Vesicula seminalis*). Er ist auch ein zusätzlicher diagnostischer Wert in Hinblick auf Transportstörungen der Spermien bzw. Verschlüsse der Samenwege (hoher Verschluss nahe der Harnröhre oder Samenleiteraplasie).

Prinzip der Methode

Unter der Wirkung von konzentrierter Salzsäure (niedrigem pH-Wert), kombiniert mit einem Hitzeinfluss, bildet Fruktose in Gegenwart von Indol einen Farbkomplex, der spektralphotometrisch bestimmt werden kann.

Lagerung und Haltbarkeit

⚠ Lichtgeschützt bei 2-8°C (Kühlschrank)

📅 24 Monate ab Herstellungsdatum

Inhalt

▪ Reagenz 1 (TCA)	10 ml
▪ Reagenz 2 (Fruktose)	10 ml
▪ Reagenz 3 (Indol)	5 ml
▪ Reagenz 4 (Salzsäure)	2x 10 ml
▪ Reagenz 5 (Natriumhydroxid)	5 ml
▪ 1 Mikrotiterplatte	

Benötigte Utensilien

- Aqua dest.
- Handschuhe
- Nativejakulat oder Seminalplasma (100 µl)
- Papiertücher
- Mikroplatten Lesegerät
- Pipetten und Spitzen (10-100 und 100-1000 µl)
- Reagenzgefäß 1,5 oder 2 ml
- Reagenzgefäßhalter
- Tischzentrifuge

- Vortex oder ähnlicher Mischer

- Wasserbad oder Wärmeschrank (37°C)

Vorbereitung der Fruktose-Standardkurve

	A.dest.	Reagenz 2	Fruktose-konzentration
1. Leerwert	V ₀	100 µl	0 mg/ml
2. Verdünnung	V ₁	80 µl	1 mg/ml
3. Verdünnung	V ₂	60 µl	2 mg/ml
4. Verdünnung	V ₃	40 µl	3 mg/ml
5. Verdünnung	V ₄	20 µl	4 mg/ml
6. Verdünnung	V ₅	0 µl	5 mg/ml

Es ist zu empfehlen, bei jedem Versuch die Standardkurve neu zu erstellen.

Durchführung

1. Ejakulat 10 min bei 1000xg zentrifugieren.
2. 100 µl des Überstandes (Seminalplasma) in ein neues Reagenzgefäß pipettieren.
3. 100 µl Reagenz 1 hinzufügen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Anschließend 15 min bei 1000xg zentrifugieren.
5. Überstand vorsichtig in ein neues Reagenzgefäß überführen (Probe ist proteinfrei) und in einem Reagenzgefäßständer kühl lagern.
6. 25 µl dieser Probe und der Standardverdünnungsreihe in neue Reagenzgefäße pipettieren.
7. 25 µl Reagenz 3 zur Probe und Verdünnungsreihe hinzufügen und mischen.
8. 200 µl Reagenz 4 zu allen Reagenzgefäßen hinzugeben.
9. Gefäße schließen und für 30 min im Wasserbad oder 60 min im Wärmeschrank inkubieren.
10. Die Reaktion mit 200 µl Reagenz 5 stoppen.
11. Zentrifugieren Sie alle Reagenzgefäß 1 min bei 1000xg.

12. Je 200 µl des Überstandes (siehe Schema) in die Mikrotiterplatte geben und im Mikroplatten Lesegerät die OD-Werte (Optische Dichte, Extinktion) bei 470 nm messen.

	1	2	3	4	5	...	12
A	V ₀	V ₀	P ₁	P ₁			
B	V ₁	V ₁	P ₂	P ₂			
C	V ₂	V ₂	P ₃	P ₃			
D	V ₃	V ₃					
E	V ₄	V ₄					
F	V ₅	V ₅					
G							
H							

Standardverdünnungsreihe: A1 und A2 bis F1 und F2

Auswertungsziel: Bestimmung des Fruktosegehaltes im Gesamtejakulat

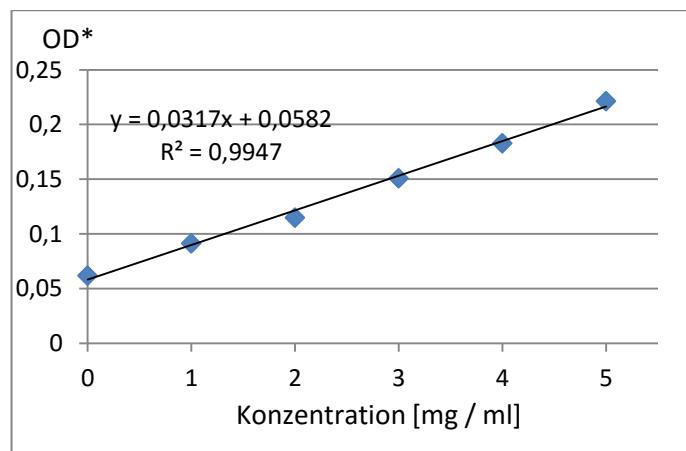
Der durchschnittliche Wert liegt bei 13 µMol Fruktose (2,4 mg) pro Ejakulat. Bei einem Wert unter 13 µMol, liegt womöglich eine Verstopfung des Samenleiters, ein angeborenes Fehlen eines Samenleiters, ein partieller Rückfluss des Ejakulates, eine Unterfunktion der Drüsen innerhalb der Samenblase oder eine androgene Mangelfunktion vor (WHO, 2010).

I. OD Werte der Standardgerade und Proben:

	1	2	3	4	5		12
A	0,07	0,06	0,29	0,31*			
B	0,10	0,09	0,20	0,21			
C	0,12	0,11	0,22*	0,38*			
D	0,18	0,15					
E	0,19	0,18					
F	0,22*	0,22*					
G							
H							

Erstellung der Fruktose-Standardkurve:

Die Fruktose-Standardkurve wird mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (z.B. Microsoft Excel®) erstellt. Auf der x-Achse werden die Fruktosekonzentrationen (mg/ml) und auf der y-Achse die OD-Werte aufgetragen. Dies ermöglicht auch die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes (R^2), welches zur Bestimmung der Arbeitsgenauigkeit (1 bis 99% bzw. 0,01 bis 0,99) bei der Erstellung der Standardkurve dient; sollte der Wert niedriger als 0,99 liegen, so muss die Standardkurve erneut angefertigt werden.



*ODs von Proben, die nicht im Bereich der Standardkurve liegen, können nicht für eine Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Diese sind dann mit angepassten Probenmengen zu wiederholen.

II. Konzentrationsberechnung der Probe:

Die Konzentration der Probe kann nun abgelesen werden oder mittels der Steigungsfunktion ausgerechnet werden. Die allgemeine Formel der Standardkurve lautet:

$$y = ax + c$$

y = OD der Probe

x = Konzentration der eingesetzten Probe (mg/ml)

a = Steigungsfunktion;

c = Linearkonstante der Kurve

III. Berechnung des Verdünnungsfaktors:

Gesamtvolumen (450 µl): (12,5 µl Seminalplasma + 12,5 µl Reagenz 1 + 25 µl Reagenz 3 + 200 µl Reagenz 4 + 200 µl Reagenz 5) / 12,5 µl = 36

IV. Gesucht wird die Gesamtmenge an Fruktose pro ml Ejakulat. Die Berechnung erfolgt in drei Schritten:

1. Berechnung der Konzentration x der eingesetzten Probe, abgeleitet aus der allg. Formel des Extinktionswertes:

$$x \text{ (mg / ml)} = (y - c) / a$$

2. Berechnung der Konzentration der unverdünnten Probe

$$x \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

3. Um die Gesamtmenge an Fruktose zu ermitteln, wird das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen (V) in ml des Seminalplasmas multipliziert.

$$x \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot V$$

Hinweis: Die Standardkurve verläuft linear bis 0,5 mg/ml; geringere Fruktosekonzentrationen können mit diesem Test nicht exakt bestimmt werden.

Beispielrechnung

Gesucht wird der Fruktosegehalt der abgegebenen Samenflüssigkeit des Patienten P₁ (3 ml), P₂ (5 ml). Die Berechnung erfolgt in drei Schritten:

1. Berechnung des Fruktosegehalts in den Proben

$$x \text{ (mg/ml)} = (y - c) / a$$

$$\begin{aligned} P_2 \text{ (mg/ml)} &= (0,205 - 0,065) / 0,03 \text{ ml / mg} \\ &= 4,66 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

2. Berechnung des Fruktosegehalts der unverdünnten Proben

$$\begin{aligned} x \text{ (mg/ml)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} &= 4,66 \text{ mg / ml} \cdot 36 \\ &= 167,76 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

3. Berechnung des Fruktosegehalts im Ejakulatvolumen

$$\text{Fruktosegehalt (unverdünnt)} \cdot \text{Ejakulatvolumen}$$

$$167,76 \text{ mg/ml} \cdot 5 \text{ ml} = 838,8 \text{ mg}$$

Ergebnis: Die Probe des Patienten 2 ist auffällig.

Beispiel 1: OD-Wert über höchstem Standardwert

	alt	neu
Volumen Probe	25 µl	12,5 µl
Reagenz3	200 µl	237,5 µl

Nach dem Messen ist das Ergebnis mit dem Faktor **73** zu multiplizieren: Gesamtvolumen (450 µl): (6,25 µl Seminalplasma + 6,25 µl Reagenz 1 + 25 µl Reagenz 3 + 212,5 µl Reagenz 4 + 200 µl Reagenz 5) / 6,125 = **73**

Beispiel 2: OD-Wert unter geringstem Standardwert

	alt	neu
Volumen Probe	25 µl	50 µl
Reagenz3	200 µl	175 µl

Nach dem Messen ist das Ergebnis mit dem Faktor **17** zu multiplizieren: Gesamtvolumen (450 µl): (25 µl Seminalplasma + 25 µl Reagenz 1 + 25 µl Reagenz 3 + 175 µl Reagenz 4 + 200 µl Reagenz 5) / 25 = **17**

Sicherheitshinweise/ Vorsichtsmaßnahmen

(Bitte auch Sicherheitsdatenblätter lesen)

- Alle Spermienproben sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie HIV oder Hepatitis übertragen könnten.
- Tragen Sie immer Sicherheitskleidung, wenn Sie mit Proben und Reagenzien arbeiten (Handschuhe, Kittel, Augen-/Gesichtsschutz).
- Reagenz 1 enthält (Trichloressigsäure). Es verursacht schwere Verbrennungen, ist sehr giftig für Wasserorganismen und kann lang anhaltende Beeinträchtigungen des aquatischen Lebensraumes hervorrufen. Bei Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Im Falle eines Unfalls oder bei Unwohlsein suchen Sie sofort einen Arzt auf.

- Reagenz 3 (Indol) ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken sowie leicht entzündlich. Vermeiden Sie Haut- und Augenkontakt.
- Reagenz 4 enthält konzentrierte Salzsäure. Es verursacht bei Kontakt Verbrennungen und Irritationen der Haut sowie Reizungen der Atemwege. Bei Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Im Falle eines Unfalls oder bei Unwohlsein suchen Sie sofort einen Arzt auf.
- Reagenz 5 (NaOH) verursacht Verbrennungen. Bei Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Im Falle eines Unfalls oder bei Unwohlsein suchen Sie sofort einen Arzt auf.

Geben Sie niemals Wasser zur konzentrierten Säuren (Explosionsgefahr!).

Referenzen

1. Cooper TG et al. (1991) Variations in semen parameters from fathers. *Human Reproduction*, 6:859-866
2. Daudin M et al. (2000) Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, 74:1164-1174
3. Eckardstein S et al. (2000) Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 73:1226-1231
4. Karvonen MJ, Malm M (1955) Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian journal of clinical and Laboratory Investigation*, 7: 305-307
5. de la Taille A et al. (1998) Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, 8:370-376
6. WHO Press, (2010) Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th. Edition