

Fructose Test

96 Testen

FOTOMETRISCHE TEST VOOR HET KWANTIFICEREN VAN FRUCTOSE IN HUMAAN SEMINAAL PLASMA

Document referentie: FP09 I29 R01 B.12 Update: 1/07/2020

Fructose standaard bevat 0.09% Na-Azide

Voor in vitro diagnostisch gebruik – Reagentia enkel voor professioneel gebruik.



ALGEMENE INFORMATIE

Fructose in semen geeft een indicatie van de secretorische functie van de seminale vesikels.

Het doel van de Fructose Test is om de hoeveelheid fructose in humaan sperma of seminaal plasma te meten. De Fructose Test kan helpen bij de diagnose en de behandeling van mannelijke infertiliteit.

TEST PRINCIPE

Fructose reageert, in de aanwezigheid van HCl bij hitte, met indool en produceert een gekleurd complex dat kan gemeten worden bij een golflengte van 450-492nm.

MATERIAAL AANWEZIG IN DE KIT

- Reagens 1 - 50ml TCA oplossing
- Reagens 2 - 25ml Geconcentreerd HCl (32%)
- Reagens 3 - 3ml Indool in methanol
- Reagens 4 - 25ml NaOH (0.5M)
- Fructose Standaard - 10ml (5mg/ml)

Een certificaat van analyse en MSDS zijn beschikbaar op verzoek of kunnen gedownload worden van de website (www.fertipro.com).

MATERIAAL NIET AANWEZIG IN DE KIT

Plate reader / fotometer (met 450-492nm filter), pipetten en verse tips, centrifuge tubes, titer plaat, centrifuge (> 1000g), kleine reageerbuisjes of Eppendorf epjes, waterbad of hitteblok.

TYPE STAAL

Voer de test bij voorkeur uit op (bevroren/ontdooit) seminaal plasma in plaats van op het volledige semen staal, vooral in gevallen waar het staal niet onmiddellijk geanalyseerd wordt (i.e. niet binnen de 3 uur na ejaculatie). Dit is om te vermijden dat de spermatozoa de fructose metaboliseren wat leidt tot een onderschatting van de fructose concentraties. Vries seminaal plasma in als het staal niet op dezelfde dag van ejaculatie kan getest worden.

METHODE

We raden aan om onze demonstratie video te bekijken voordat je aan de test begint. Download de video via de link op onze website, of scan de barcode:



1. Laat het spermastaal vervloeien bij kamertemperatuur
2. Meet het totaal sperma (plasma) volume (vb. met een steriele spuit)
3. Pipeteer 100µL spermastaal/seminaal plasma naar aparte test tubes
4. Pipeteer 100µL van de Fructose standaarden (zie hieronder de voorbereiding van de standaarden) in een test tube en behandel zoals het spermastaal
5. Voeg 500µL Reagens 1 (TCA oplossing) toe aan de stalen en standaarden en mix
6. Centrifugeer 10 minuten aan 1000g of meer
7. Pipeteer 20µL supernatant/standaard uit stap 6 in een leeg Eppendorf epje of een klein reageerbuisje
8. Blanco staal: pipeteer 20µL gezuiverd water in een leeg Eppendorf epje of een klein reageerbuisje
9. Voeg 200µL van Reagens 2 (HCl) toe aan elk epje/buisje

Opmerking: voer stap 10-13 onder een afzuigkast omdat Reagens 3 toxisch is bij inademen (zie waarschuwingen en voorzorgen)

10. Voeg 20µL van Reagens 3 (indool) toe aan elk epje/buisje
11. Sluit of verzegel de epjes/buisjes en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C in een waterbad of een gepaste hitteblok (deze laatste is aanbevolen), of 60 minuten bij 37°C in een droge incubator
12. Voeg 200µL Reagens 4 toe om de kleurreactie te stoppen
13. Pipeteer 200µL van het staal in een leeg welletje en lees de resultaten af bij 450-492nm in een fotometer.

FRUCTOSE STANDAARDEN

De kit bevat een 5mg/ml Fructose oplossing. Maak een standaardcurve met de volgende fructose concentraties:

Standaard	Fructose standaard	Water
5mg/ml	100µl	0µl
2.5mg/ml	50µl	50µl
1mg/ml	20µl	80µl

Opmerking: Maak de verdunningen van de standaard met gezuiverd water (vb. gedistilleerd water).

INTERPRETATIE

Download het Excel bestand voor de berekening van onze website en voeg de data toe in het bestand om de resultaten te berekenen:

<https://fertipro.com/2019/11/07/fructose-test/>

De gemeten (OD) waarden van het staal worden geplotted tegen de standaard curve (gebruikmakend van de 3 standaarden zoals hierboven vermeld). De OD waarden worden op de Y-as geplaatst en de fructoseconcentratie op de X-as. Om de totale fructose hoeveelheden te bekomen, moet het resultaat vermenigvuldigd worden met het totale volume van het spermastaal of het seminaal plasma.

Normale waarden volgens het WHO handboek:

- 2.4mg/ejaculaat of meer
- 13µmol/ejaculaat of meer

Opmerking: De standaardcurve is lineair tot 0.5mg/ml, kleinere fructose hoeveelheden kunnen niet accuraat gemeten worden met deze kit.

Een lage fructoseconcentratie in sperma is karakteristiek voor een obstructie van het ejaculatoire kanaal, bilaterale congenitale afwezigheid van de vas deference, gedeeltelijke retrograde ejaculatie en androgene deficiëntie (WHO, 2010).

ASSAY PERFORMANTIE PARAMETERS

Intra-assay CV: 8% (herhaalbaarheid)

Inter-assay CV: 13% (totale precisie)

BEWAARCONDITIES

De kit kan getransporteerd en kortstondig bewaard worden bij hogere temperaturen (tot 5 dagen op 37°C). Bewaar de reagentia tussen de 2°C en 8°C. Vermijd blootstelling aan (zon)licht. Product kan gebruikt worden tot 12 maanden na de productiedatum.

De fles met Reagens 2 (HCl) zou een kleine kleurverandering kunnen vertonen van oranje naar roze (de vloeistof blijft kleurloos). Dit heeft geen invloed op de resultaten.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGEN

Reagens 1 (TCA oplossing): Veroorzaakt erge brandwonden. Zeer toxisch voor aquatische organismen, zou op lange termijn nadelige effecten kunnen veroorzaken in aquatisch milieu. Bij oogcontact, spoel onmiddellijk met een overvloed aan water en zoek medisch advies. Bij een ongeluk of wanneer u zich onwel voelt, zoek onmiddellijk contact op met een arts.

Reagens 2 (32% HCl oplossing): Veroorzaakt brandwonden. Irriterend voor het ademhalingsstelsel. Bij oogcontact, spoel onmiddellijk met een overvloed aan water en zoek medisch advies. Bij een ongeluk of wanneer u zich onwel voelt, zoek onmiddellijk contact op met een arts. Voeg nooit water toe aan geconcentreerd HCl.

Reagens 3 (Indool in methanol): Schadelijk na inslikken. Vermijd contact met de huid en ogen. Licht ontvlambaar. Toxisch na inademen en na inslikken. **Werk altijd onder een afzuigkast bij gebruik van dit reagens.**

Reagens 4 (NaOH): Veroorzaakt brandwonden. Bij oogcontact, spoel onmiddellijk met een overvloed aan water en zoek medisch advies. Bij een ongeluk of wanneer u zich onwel voelt, zoek onmiddellijk contact op met een arts.

Humaan, organisch materiaal moet altijd als mogelijks infectieus worden beschouwd. Behandel alle specimens alsof ze HIV of hepatitis kunnen overdragen. Draag altijd beschermende kledij wanneer er gewerkt wordt met stalen en reagentia (handschoenen, labovest, oog/gezichtsbescherming).

BEREKENING VAN DE G-KRACHTEN

De g-kracht van uw centrifuge kan berekend worden met de formule:

$$g = 1.118 \times r \times \text{rpm}^2 \quad \text{of} \quad \text{rpm} = \sqrt{\frac{g}{1.118 \times r}}$$

r = straal van de centrifuge in mm; rpm = rotaties per minuut / 1000
vb.1

$$r = 100 \text{ mm} \quad \text{rpm} = 3000 \text{ rotaties per minuut}$$

$$g = 1.118 \times 100 \times 9 = 1006g$$

vb.2

$$r = 100 \text{ mm} \quad g = 1200g \\ \text{rpm} = \sqrt{\frac{1200}{1.118 \times 100}} = 3.28 \\ = 3280 \text{ rotaties per minuut}$$

BIBLIOGRAFIE

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen - 5th Edition. World Health Organization, 2010.



FertiPro N.V., Industriepark Noord 32
8730 Beernem - Belgium
E-mail: info@fertipro.com
URL: <http://www.fertipro.com>



REF FRUCTO