

Avaluació del kit de congelació de semen a casa “«HOME SPERM FREEZING KIT”»

Informe de Resposta Ràpida

L'Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS) és una entitat de dret públic adscrita al Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya que actua al servei de les polítiques públiques. L'AQuAS té la missió de generar coneixement rellevant mitjançant l'avaluació i l'anàlisi de dades per a la presa de decisions amb la finalitat de contribuir a la millora de la salut de la ciutadania i la sostenibilitat del sistema de salut de Catalunya. L'AQuAS és membre fundador de la International Network of Agencies of Health Technology Assessment (INAHTA) i de la International School on Research Impact Assessment (ISRIA), del CIBER d'Epidemiologia i Salut Pública (CIBERESP), i de la Red de Investigación en Servicios Sanitarios en Enfermedades Crónicas (REDISSEC) i és Unitat Associada a INGENIO (CSIC-UPV). L'any 2019 AQuAS ha estat reconeguda amb la medalla Josep Trueta al mèrit sanitari per part del Govern de la Generalitat de Catalunya.

Es recomana que aquest document sigui citat de la manera següent: Estrada MD, Vivanco-Hidalgo RM, Pastells R. Avaluació del kit de congelació de semen a casa “«HOME SPERM FREEZING KIT” ». Barcelona: Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya; 2022.

Les persones interessades en aquest document poden adreçar-se a:

Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya.
Roc Boronat, 81-95 (segona planta). 08005 Barcelona
Tel.: 93 551 3888 | Fax: 93 551 7510 | <http://aquas.gencat.cat>
© 2022, Generalitat de Catalunya. Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya

Edita: Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya
Primera edició: Barcelona, octubre 2022
Correcció i maquetació: Àrea de comunicació



Els continguts d'aquesta obra estan subjectes a una llicència de Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional. La llicència es pot consultar a: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>

Avaluació del kit de congelació de semen a casa “«HOME SPERM FREEZING KIT”»

Autoria

Maria-Dolors Estrada. Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS). CIBER en Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Spain.

Rosa M Vivanco-Hidalgo. Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS).

Roland Pastells. Documentalista. Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS).

Índice

Introducció	5
Ús de l'esperma de donant en medicina reproductiva	5
Preservació de la fertilitat	6
Tractament de la infertilitat	6
Breu descripció de la tècnica a avaluar	7
Objectiu	9
Metodologia	10
Resultats.....	11
Objectiu 1	11
Objectiu 2.....	11
Conclusions	14
Recomanacions per ajudar a la presa de decisions	15
Annex 1. Examen i processament del semen humà segons el manual de laboratori de l'OMS, 6à edició, 2021 (6).....	16
1. Procediments previs a l'examen de semen	16
1.1. Informació del pacient	16
1.2. Recollida de mostres	17
1.3. Manipulació inicial de mostres	18
2. Avaluació del risc de criopreservació i emmagatzematge de semen humà	18
2.1. Recursos	18
2.2. Seguretat i protecció del personal	19
2.3. Risc de contaminació creuada.....	19
2.4. Seguretat de les mostres congelades.....	20
3. Protocols de criopreservació de semen.....	20
3.1. Procediment estàndard.....	21
3.2. Etiquetatge de palletes/criovials i registres	24
3.3. Vitrificació	24
Annex 2: Estratègia de cerca i registres identificats segons font consultada	27
2.1. Cerca definitiva a diferents bases de dades bibliogràfiques (N=28).....	27
Bibliografia	31

Introducció

La criopreservació (congelació) d'espermatozoides és actualment una part important del treball de molts laboratoris d'anàlisi de semen, especialment aquells associats a clíniques d'infertilitat, que disposen de criobancs de semen.

La raó que justifica la creació d'un criobanc de semen humà és l'ús futur dels espermatozoides. Aquest ús futur es podrà fer a través de tècniques de reproducció humana assistida (RHA) autòlogues i com a part de banc de donants, les tècniques de RHA homòlogues.

La història de la criobiologia de l'esperma humana data de finals de la dècada de 1940. El descobriment que el glicerol protegia els espermatozoides contra els danys de la congelació va provocar l'emmagatzematge d'espermatozoides humans en gel sec a -79°C . Posteriorment es va utilitzar nitrogen líquid. La criopreservació del semen es va desenvolupar ràpidament en molts països amb l'establiment de bancs d'esperma.

Ara s'utilitzen diversos protocols de criopreservació amb diferents crioprotectors i procediments de congelació. La supervivència cel·lular després de la congelació i descongelació depèn en gran manera de la minimització de la formació intracel·lular de cristalls de gel. Això es fa mitjançant l'ús adequat de crioprotectors i aplicant velocitats de refredament i escalfament que minimitzin la quantitat d'aigua intracel·lular subjecta a formació de gel. Si els espermatozoides passen períodes de temps significatius per sobre de -130°C (la temperatura de transició vítria), especialment durant el procés de descongelació, es pot produir la recristal·lització, amb el creixement de cristalls de gel intracel·lulars potencialment danyosos. Hi ha dues categories de crioprotectors: permeables, com el dimetilsulfòxid i el glicerol, i impermeables, com les albúmines, els dextrans i el citrat de rovell d'ou.

Els espermatozoides humans toleren una sèrie de velocitats de refredament i escalfament. Els espermatozoides no són molt sensibles als danys causats per un ràpid refredament inicial (xoc fred), possiblement a causa de l'alta fluïdesa de la membrana dels àcids grassos insaturats de la bicapa lipídica. També poden ser més resistents que altres cèl·lules als danys de la criopreservació a causa del seu baix contingut d'aigua (al voltant del 50 %). Tanmateix, la criopreservació té un efecte advers sobre la funció de l'esperma humana, especialment sobre la motilitat. Després de la criopreservació el percentatge d'espermatozoides mòbils pot disminuir del 50,6 % fins al 30,3 %, segons els estudis (1). L'optimització del procés de criopreservació probablement minimitzarà aquest dany.

Entre les raons per a la criopreservació d'espermatozoides, trobem:

Ús de l'esperma de donant en medicina reproductiva

El semen de donants sans coneguts o presumptament fèrtils pot ser emmagatzemat per a un ús futur. A molts països s'ha de posar en quarantena l'esperma de donant durant sis mesos per permetre realitzar les proves d'infeccions de transmissió sexual per comprovar que no contenen microorganismes, com el virus de la immunodeficiència humana (VIH).

Els donants poden ser reclutats per una clínica o un banc d'esperma i els seus espermatozoides utilitzats de manera anònima o no segons la legislació i directrius nacionals.

Els espermatozoides del donant es poden utilitzar per a la inseminació artificial, la inseminació intrauterina (IUI), la fecundació in vitro (FIV) o la microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozous (ICSI) en determinades situacions, per exemple:

- per a la parella d'un home infèril sense espermatozoides vius ni espermàtides allargades adequades per a ICSI, o on el tractament ha fallat o és massa costós;
- prevenir la transmissió d'un trastorn hereditari;
- després d'avortament involuntari recurrent, on es pot inseminar amb espermatozoides de donant i donar lloc a un embaràs;
- per a dones que volen concebre, però no tenen parella masculina, en aquells països on està permès.

Preservació de la fertilitat

El semen es pot obtenir i emmagatzemar abans que un home se sotmeti a un procediment o exposició que podria afectar la seva fertilitat, com ara:

- vasectomia (en cas d'un futur canvi en la situació de la parella o el desig de tenir més fills);
- tractament amb agents citotòxics o radioteràpia, que puguin perjudicar l'espermatogènesi permanentment;
- servei actiu a les forces armades i d'altres ocupacions perilloses, per exemple, a les forces militars, als països on la procreació pòstuma és acceptable o es pot produir una lesió genital;
- adults i adolescents transgènere d'home a dona;
- trauma testicular (en algunes circumstàncies després de l'extracció d'esperma testicular, TESE).

Tractament de la infertilitat

Els espermatozoides es poden emmagatzemar per al tractament de la infertilitat utilitzant l'esperma de l'individu en IUI, FIV o ICSI, per exemple en els casos de:

- oligozoospermia severa o presència intermitent d'espermatozoides mòbils al semen (com a suport per a ICSI), o persones amb síndrome de Klinefelter (a la pubertat) quan pot ser recollida la mostra de semen;

- tractament de la infertilitat que pot no persistir, com la cirurgia pel tractament de l'obstrucció del tracte genital o el tractament amb gonadotrofina per a l'hipogonadisme hipotalàmic-hipofisiari;
- la necessitat de recollida especial, com l'ejaculació assistida per a pacients amb lesió medul·lar, espermatozoides per ejaculació retrògrada a l'orina o recollida quirúrgica via tracte genital;
- pacients que no poden proporcionar semen fresc el dia de realització d'una tècnica de RHA tal com:
 - homes que no poden estar presents al laboratori de tècniques de RHA el dia de la inseminació o que tenen dificultats per recollir semen per motius psicològics;
 - homes amb azoospermia no obstructiva que requereixen extracció d'esperma testicular;
 - homes amb lesió medul·lar que requereixen extracció d'esperma testicular;
 - homes sotmesos a vasovasostomia o vasoepididimostomia per azoospermia obstructiva amb aspiració microquirúrgica de l'epidídim o d'espermatozoides testiculars
 - extracció per a la preservació de la fertilitat.

Les taxes d'embaràs després de la inseminació artificial amb semen de donant criopreservat sovint estan relacionades amb la qualitat de l'esperma després de la descongelació, el moment de la inseminació i, en particular, els factors receptors, com l'edat, l'embaràs previ amb inseminació de la donant i els trastorns ovulatoris i tubàrics uterins (2). Si el semen s'emmagatzema en condicions adequades no hi ha un deteriorament evident de la qualitat de l'esperma amb el temps. S'han donat casos d'infants que han nascut després de la fecundació amb semen emmagatzemat durant més de 28 anys (3, 4). En casos seleccionats (per exemple, quan hi ha nivells elevats de leucòcits al semen), s'aconsella la selecció de fraccions molt mòbils d'espermatozoides, ja que pot donar una millor recuperació (5).

En l'**Annex 1** s'han descrit els procediments relatius al semen humà segons el manual de l'OMS 2021, 6a edició, que és una font essencial de la darrera informació basada en evidències en aquest camp i un referent reconegut i utilitzat àmpliament per laboratoris clínics i de recerca a tot el món (6). En particular, s'han inclòs els procediments previs a l'examen de semen, l'avaluació del risc de la criopreservació i emmagatzematge de semen humà així com els protocols de criopreservació de semen (convencional i ràpida o vitrificació).

Breu descripció de la tècnica a avaluar

L'Institut Marquès ha desenvolupat i patentat un nou sistema que permet que els donants d'esperma, els homes implicats en tècniques de RHA o aquells que vulguin preservar la seva fertilitat puguin recollir la mostra de semen i criopreservar-la immediatament després, introduint-la en un tanc de nitrogen líquid allà on es trobin, essent ells els qui executen la criopreservació de la seva mostra de semen.

El fet que la recollida de la mostra de semen es pugui realitzar en la privacitat de casa seva i si és el cas, compartint aquesta part del procés de RHA amb la seva parella, és un dels avantatges que expliciten els seus desenvolupadors, ja que permet minimitzar la situació estressant que molts homes experimenten en aquesta etapa del procés així com la necessitat de viatjar si es troben lluny de la clínica.

Els desenvolupadors d'aquest kit indiquen en el seu fulletó informatiu (7) que l'home interessat pot tenir una primera consulta amb el metge mitjançant videoconferència i si hi està d'acord, utilitzar-lo per recollir, criopreservar i enviar la mostra. Això implica un significatiu estalvi de temps, ja que no cal viatjar.

L'enviament s'adapta a l'agenda del pacient, perquè pugui escollir quan enviar la mostra.

L'entrega del tanc i la seva recollida amb la mostra de semen criopreservada s'estableix entre l'home i l'empresa de lliurament de la clínica. Una vegada realitzada la recollida i criopreservació de la mostra de semen, l'empresa va a buscar el tanc dins de les 48 hores posteriors i el porta a la clínica (o banc de semen).

La informació sobre el kit està composta pel fulletó informatiu facilitat pel peticionari (7), les instruccions per a la congelació de semen a casa (8) i un vídeo de Youtube identificat a Internet¹.

L'evidència actual no descriu cap diferència important entre l'ús d'espermatozoides crioconservats o espermatozoides frescos durant la RHA, malgrat que hi ha estudis que reporten augment de la fragmentació de l'ADN després de la criopreservació (9).

Per tal de donar suport a la presa de decisions per part de la Direcció General d'Ordenació i Regulació Sanitària (DGORS) del Departament de Salut, es realitza el present informe breu amb l'objectiu de revisar l'evidència científica al respecte.

¹ <https://www.youtube.com/watch?v=iFvinXbklLk>

Objectiu

Sintetitzar l'evidència respecte al sistema de criopreservació de semen HOME SPERM FREEKING KIT desenvolupat per l'Institut Marquès en el marc de les tècniques de RHA.

Com a objectius específics:

1. Comparar l'eficàcia entre la recollida de semen i posterior criopreservació ràpida (vitricació) realitzada al domicili pel mateix donant o pacient/home interessat i la realitzada en el laboratori de RHA quant a motilitat total, motilitat progressiva, morfologia i índex de fragmentació del DNA dels espermatozoides, entre altres mesures de resultat relacionades amb la fertilitat (gestació i naixement).
2. Comparar el sistema «Home sperm freezing kit» amb els estàndards descrits en el manual de laboratori de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), 6a edició, 2021, sobre l'examen i el processament del semen humà descrits en l'Annex 1 (6).

Metodologia

S'ha realitzat un informe de resposta ràpida basat en la revisió de la literatura científica.

En relació amb l'objectiu 1, es va realitzar una cerca inicial exploratòria a Medline/PubMed per identificar assaigs clínics aleatoritzats (ACA) i revisions sistemàtiques o metaanàlisi d'ACA sobre la recollida de semen humà i criopreservació posterior (mètode ràpid o vitrificació) al domicili en comparació amb la realitzada en el laboratori del centre clínic de RHA o banc de semen. Aquesta cerca, sense límits temporals ni d'idioma, es va executar el 21 de juny de 2022 per part del documentalista d'AQuAS després d'analitzar quina seria l'estratègia més adequada amb les autores de l'informe. A partir dels resultats d'aquesta cerca inicial, es va dissenyar la cerca definitiva executada per part del mateix documentalista el 20 de juliol de 2022. Les bases de dades consultades van ser: Medline (OVID), EMBASE, Cochrane, Scopus, WoS i Epistemonikos. En l'Annex 2 es presenta l'estratègia realitzada.

Per completar les cerques bibliogràfiques anteriors, les autores van dur a terme una cerca de literatura gris a Internet el mes de juny de 2022 i una revisió manual de la bibliografia dels documents inclosos en les cerques prèvies per tal d'identificar estudis pertinents publicats però no identificats en les cerques.

Per assolir l'objectiu específic 2 es van revisar els materials informatius facilitats per part del peticionari sobre el «Home sperm freezing kit», sistema patentat per l'Institut Marquès (8,9) i comparar el seu procediment amb les especificacions recollides en el Manual de l'OMS de recent publicació considerat com el document de referència internacional en el camp de l'examen i processament del semen humà (6) identificat en la cerca a Internet. En particular, la comparació s'ha centrat en els procediments previs a l'examen de semen humà, l'avaluació del risc de criopreservació i emmagatzematge de semen humà i els protocols de criopreservació de semen humà (procediment estàndard, etiquetatge i vitrificació). A més, es va revisar el marc normatiu d'aplicació a la recollida de semen humà i procediment de criopreservació posterior vigent a Espanya (Llei 14/2007, de 3 de juliol, d'investigació biomèdica i la Llei 14/2006, de 26 de maig, sobre tècniques de reproducció humana assistida).

Pel que fa a Catalunya, es va consultar a la DGORS del Departament de Salut per conèixer la situació legal.

La gestió bibliogràfica es va realitzar amb el programa EndNote.

Una de les autores de l'informe es va encarregar de fer la selecció dels resultats de les cerques, adreçada a incloure assaigs clínics aleatoritzats o revisions sistemàtiques amb metaanàlisi i que tinguessin com a intervenció a avaluar el sistema de criopreservació de semen «Home sperm freezing kit» en el marc de donants de semen, tècniques de RHA o preservació de la fertilitat i com a tècnica de comparació la recollida de semen i criopreservació posterior realitzada en el laboratori clínic.

Degut a la necessitat de resposta ràpida i amb l'objectiu de proveir la informació sobre l'evidència publicada fins al moment, s'ha fet una lectura crítica a text complet dels articles inclosos presentant-se els resultats de forma narrativa.

Resultats

Objectiu 1

De la cerca exploratòria a Medline/PubMed es van identificar 31 referències. Com a resultat de la revisió del títol o resum, cap va superar la fase de cribratge segons els criteris d'inclusió descrits. De la cerca definitiva realitzada a Medline (OVID), EMBASE, Cochrane, Scopus, WoS i Epistemonikos el 20 de juliol del 2022 es van identificar 28 registres que, després d'eliminar els duplicats, va resultar en 17 registres. En l'**Annex 2** s'informa dels registres identificats en cadascuna de les bases de dades bibliogràfiques consultades.

Després de cribrar pel títol o resum, cap va superar la fase de cribratge. És a dir, no es va identificar cap ACA o revisions sistemàtiques amb metaanàlisi d'ACA que comparessin la recollida de la mostra de semen i criopreservació posterior en el domicili i per part del donant o pacient implicat en una tècnica de RHA o de preservació de la fertilitat en comparació amb la recollida de semen en el centre clínic i criopreservació posterior feta per personal del laboratori o centre clínic.

Objectiu 2

Els procediments relacionats amb la recollida de semen, ja sigui per part de donants, homes implicats en les tècniques de RHA o de preservació de la fertilitat i criopreservació posterior s'emparen en la Llei 14/2007 d'investigació biomèdica i la Llei 14/2006 sobre tècniques de reproducció humana assistida. En cap cas s'indica que la recollida de semen pugui fer-se a casa com tampoc que la criopreservació de la mostra de semen pugui ser realitzada pel mateix individu i tampoc fora del laboratori clínic. Pel que fa a Catalunya, la DGORS ha informat que no s'autoritza específicament ni de forma expressa la recollida de semen a domicili del pacient, ni tampoc és autoritzable que es puguin efectuar determinats procediments en la mostra obtinguda.

S'han comparat les instruccions per a la congelació de semen a casa del sistema «Home sperm freezing kit» amb els estàndards de l'OMS 2021 (6), destacant el següent:

Pel que fa a les instruccions per a l'obtenció de la mostra de semen: el «Home sperm freezing kit» disposa d'instruccions escrites sobre la recollida de la mostra de semen i, pel que diu el fullat informatiu, hi ha accés a una videoconferència amb un metge prèvia a l'enviament del kit al domicili i, per tant, també oral. Les instruccions del kit recomanen que la mostra de semen s'obtingui per masturbació, després d'entre tres i cinc dies d'abstinència ejaculatòria i que l'ejaculació es reculli completament en un pot estèril (és un dels components del kit). També s'indica que cal netejar-se les mans i els genitals amb aigua i sabó i aclarir amb abundant aigua. Entre els components del kit hi ha un formulari que s'ha d'omplir. No hi ha informació sobre el contingut d'aquest formulari. Aquestes instruccions del kit s'ajusten força a les establertes en el Manual de l'OMS tot i que es considera que s'haurien d'explicitar aspectes importants com ara l'evitació de condons, el temps desitjable entre la recollida de la mostra de semen i la seva criopreservació en el domicili i les temperatures. I, fonamental, la identificació de les mostres i control d'agents infecciosos, aspectes

sota control quan la recollida de la mostra de semen i la seva manipulació inicial es fa en sales privades del laboratori i, posteriorment, per equip tècnic del laboratori.

En relació amb les instruccions per a la congelació de la mostra de semen i col·locació dels criotubs en el tanc: la criopreservació i el posterior emmagatzematge d'espermatozoides humans és un procés altament complex que suposa una responsabilitat especial que recau en el personal tècnic de laboratori. En el cas del «Home sperm freezing kit», la criopreservació recau en mans de l'home una vegada ha obtingut la mostra de semen sense cap mena d'entrenament previ.

Pel que fa a l'avaluació dels riscos associats a la criopreservació i emmagatzematge de semen, quant a recursos informa que entre els components del kit hi ha un contenidor amb líquid crioprotector, un tanc de transport de mostres biològiques a temperatura controlada amb una vareta interior que conté una brida de seguretat en l'embalatge. Encara que no s'especifica, s'assumeix que conté nitrogen líquid pel fet que es diu que en obrir el tanc pot sortir una mica de vapor (en el vídeo es veu). En les instruccions s'avisava que el crioprotector s'ha de guardar a la nevera de casa una vegada es rep el kit i treure'l de la nevera abans d'obtenir la mostra de semen. No hi ha especificacions sobre la idoneïtat dels equips per a l'ús proposat (ni tanc, ni criotubs, ni vareta) ni tampoc s'explicita l'existència d'alarmes sobre nivells de nitrogen líquid, ni temperatures ni precaucions relatives a reduir el risc de contaminació creuada, tot i que el fet que el mètode de congelació sigui amb nitrogen líquid i la mostra de semen amb el crioprotector vagin en criotubs tancats ja són precaucions que eviten el risc de contaminació creuada. No obstant això, s'hauria d'explicitar quines accions es fan amb el tanc per descontaminar periòdicament ja que s'entén que la resta de components del kit són d'un sol ús. Quant a la seguretat de les mostres congelades, s'indica que els quatre criotubs s'han d'identificar tots.

En relació amb el protocol per realitzar la criopreservació del semen, no hi ha informació sobre quin és crioprotector del kit i, per tant, si és permeable o no permeable o si disposa de la certificació corresponent, ja que és un producte ja preparat i s'entén que disponible comercialment. Pel que fa al protocol emprat en el kit, es redueix a les instruccions del mateix kit. I com dèiem abans, en el vídeo de presentació del producte disponible a Internet el procediment de criopreservació es fa a una taula del menjador del domicili de l'individu.

En les instruccions del kit s'indica com s'ha d'afegir el crioprotector a la mostra i es facilita una pipeta per barrejar bé la mostra de semen amb el crioprotector. Les instruccions també informen sobre com repartir la barreja en els quatre criotubs amb l'ajuda d'una altra pipeta i com rebutjar el material sobrant. Igualment s'informa del temps que cal esperar (deu minuts) abans d'obrir el tanc i com col·locar els criotubs a la vareta, tornar-la a ubicar a l'interior del tanc de nitrogen líquid, tancar-lo i embalar-lo. El tanc amb la mostra de semen al seu interior ha de ser recollit abans de 48 hores.

El sistema «Home sperm freezing kit» no informa sobre quin és el procediment de descongelació del semen congelat.

Tots els criotubs van identificats amb el nom, cognoms i data de l'obtenció de la mostra; també el tanc. Es desconeix més detall sobre aquest aspecte clau per la tipologia d'informació revisada per fer la present valoració.

Per les característiques del kit i les instruccions es considera que el mètode de criopreservació del semen del sistema «Home sperm freezing kit» és ràpid, també anomenat vitrificació, i del tipus asèptic, ja que utilitza sistemes tancats (criotubs) sense contacte directe amb el nitrogen líquid. Els resultats d'una revisió sistemàtica amb metaanàlisi d'assajos clínics aleatoritzats inclosos en el manual de l'OMS 2021 (6) indiquen que la vitrificació de l'esperma és superior a la congelació convencional basant-se en la comparació directa de la motilitat total i la motilitat progressiva. No obstant això, l'eficàcia de la vitrificació està influïda per l'ús de diferents protocols de vitrificació i la criopreservació d'espermatozoides de diferent qualitat. Aquestes variables haurien de ser considerades a l'hora d'avaluar la qualitat dels espermatozoides descongelats després de la vitrificació. A causa del nombre reduït d'estudis amb una heterogeneïtat clínica substancial inclosos en aquesta metaanàlisi, es requereixen estudis addicionals ben realitzats per confirmar l'eficàcia de la vitrificació en la criopreservació d'espermatozoides, a més, permetre l'examen dels dos mètodes de criopreservació en termes d'assoliment d'embaràs i la determinació del paper de les variables clíniques en l'eficàcia de la vitrificació (10).

Conclusions

No s'ha trobat evidència a la literatura que compari l'eficàcia entre el sistema «Home sperm freezing kit» patentat per l'Institut Marquès amb el procediment habitual realitzat totalment en el laboratori clínic.

La legislació vigent espanyola i catalana no donen suport a la recollida de mostres de semen fora del laboratori clínic ni a que l'interessat s'encarregui del procediment de criopreservació, sigui per mètodes convencionals o ràpids, com la vitrificació utilitzant tancs de nitrogen líquid. Aquests procediments de criopreservació s'han de fer en condicions tècniques i centres acreditats seguint escrupolosament els requisits considerats en el marc legal vigent.

Gran part dels requisits especificats en el manual de referència internacional sobre l'examen i processament del semen humà vigent (OMS 2021) (6) no apareixen en el material publicitari del sistema «Home sperm freezing kit» que s'ha revisat. Es considera que seria d'interès completar aquests buits d'informació.

L'única revisió sistemàtica amb metaanàlisi identificada que compara la vitrificació amb la congelació convencional d'espermatozoides conclou que malgrat millors resultats intermedis en la motilitat amb la vitrificació, cal esperar a tenir més estudis que confirmin la viabilitat dels espermatozoides descongelats després d'una vitrificació amb resultats finals (gestacions, naixements d'infants).

Recomanacions per ajudar a la presa de decisions

Es considera important informar als potencials donants, parelles implicades en tècniques de RHA així com homes interessats en la preservació de la seva fertilitat del rigorós procés tècnic que hi ha darrere de la criopreservació d'una mostra de semen i el marc legal vigent, que indica que aquesta tècnica s'ha de realitzar en centres o laboratoris clínics degudament autoritzats.

Annex 1. Examen i processament del semen humà segons el manual de laboratori de l'OMS, 6a edició, 2021 (6)

1. Procediments previs a l'examen de semen

En contrast amb la majoria de les altres secrecions corporals examinades per al diagnòstic o seguiment del tractament, l'ejaculació és una barreja heterogènia de secrecions que no existeix dins del cos abans de ser expulsat. L'esperma es produeix a partir d'una suspensió concentrada d'espermatozoides emmagatzemats a l'epidídim aparellat, barrejats i diluïts per, principalment, el líquid prostàtic a la uretra, i pel buidatge de la secreció de les vesícules seminals. Per tant, les fraccions ejaculades seqüencials no estan igualment compostes.

A continuació, es descriuen tots els passos necessaris abans que les anàlisis de semen humà reals puguin començar:

1.1. Informació del pacient

L'home ha de rebre instruccions clares escrites i orals sobre la recollida de la mostra de semen. El clínic ha de donar la mateixa informació al pacient.

- La recomanació principal és l'ejaculació per masturbació:
 - El coit interromput no es recomana i només s'ha d'usar en casos excepcionals a causa del risc de col·lecció incompleta i de contaminació amb el líquid vaginal i les cèl·lules.
 - Els condons especials per a les investigacions de fertilitat poden ser una alternativa en circumstàncies excepcionals, però tota l'ejaculació no estarà disponible per a l'examen, i és probable que la mostra estigui contaminada pel contacte amb la pell del penis i, en certa manera, també pel líquid vaginal i les cèl·lules de la part exterior del condó. Els preservatius anticonceptius no es poden utilitzar a causa de la presència d'agents espermicides. Els condons de làtex ordinaris no s'han d'usar per a la recol·lecció de semen perquè contenen agents que interfereixen amb la motilitat dels espermatozoides.
 - Cal evitar els lubricants, ja que poden contaminar l'ejaculació i canviar-ne les propietats. Si fos absolutament necessari, cal fer servir lubricants no espermatotòxics validats.
- L'ejaculació ha de ser recollida completament i l'home ha d'informar de qualsevol pèrdua de fracció de la mostra.
- L'ejaculació s'ha de recollir després d'un mínim de dos dies i un màxim de set dies d'abstinència ejaculatòria.

- Per evitar l'exposició de l'esperma a les fluctuacions de temperatura i controlar el temps transcorregut entre la recollida i l'anàlisi, es recomana que la mostra es reculli a una sala privada del laboratori. Idealment, les investigacions han de començar dins els 30 minuts posteriors a la recollida, però almenys dins els 60 minuts.
 - Naturalment, poden ser necessàries excepcions individuals i cada persona ha de rebre assessorament adequat sobre les possibilitats i els riscos.
 - Si no es recull a les proximitats del laboratori, el transport no ha de permetre que la temperatura de la mostra sigui inferior a 20 °C o superior a 37 °C.
 - Si el pacient per qualsevol raó ha de recollir l'ejaculació en un altre lloc, el contenidor de mostres s'ha de mantenir a prop del cos sota la roba —per exemple, a l'aixella— durant el transport i s'ha de lliurar al laboratori preferiblement dins els 30 minuts posteriors a la recollida i no més de 50 minuts després de la recollida.

1.2. Recollida de mostres

- Abans de la recollida dels espermatozoides, el recipient de mostra s'ha de mantenir a temperatura ambient, entre 20 i 37 °C, per evitar grans canvis de temperatura que puguin afectar els espermatozoides.
- El recipient per a mostres ha de ser un recipient net i de boca ampla fet de plàstic, d'un lot que s'ha confirmat que no és tòxic per als espermatozous.
- El contenidor de mostres, així com els corresponents fulls de treball s'han d'etiquetar amb identificadors que, en combinació amb els procediments de recepció i manipulació de les mostres, eliminin el risc de confusió entre mostres i fulls de treball. Els requisits legals dels marcadors d'identitat de contenidors poden ser diferents. Podria ser el nom de l'home i el número d'identificació, la data i l'hora de la recollida, o els números d'identificació de mostres úniques.
- A la recepció de la mostra s'haurà de registrar la informació següent, que es presentarà en l'informe final:
 - identitat de l'home (p. ex., nom, data de naixement i número de codi personal) i idealment la confirmació que la mostra és seva;
 - el període d'abstinència ejaculatòria prèvia;
 - la data i hora de recollida;
 - la integritat de la mostra i qualsevol dificultat per produir-la (per exemple, si la recollida no es va realitzar al laboratori), i
 - volum de l'ejaculació.
- S'apliquen condicions especials per a algunes situacions específiques:

- recollida estèril per a RHA o criocirurgia
- recollida estèril per a anàlisis microbiològiques.

1.3. Manipulació inicial de mostres

- Cal permetre que l'esperma recollida es liquï sense demora innecessària, preferiblement en una incubadora a 37 °C i, si és possible, en una plataforma de mescla orbital, per facilitar la líquüefacció i la mescla de l'espècimen.
- El temps entre la recol·lecció i l'inici de l'examen d'ejaculació s'ha de registrar a l'inici de l'avaluació macroscòpica i s'ha de presentar a l'informe final. Preferiblement, l'avaluació ha de començar dins els 30 minuts posteriors a la recol·lecció i no més tard de 60 minuts després de la recol·lecció. L'exposició in vitro perllongada al líquid ejaculat líquuat afectarà la qualitat, la motilitat i la morfologia.
- Els ejaculats poden contenir agents infecciosos perillosos (per exemple, virus d'immunodeficiència humana (VIH), virus de l'hepatitis o virus de l'herpes simple) i, per tant, s'han de tractar com a risc biològic. S'han de seguir estrictament les bones pràctiques de laboratori per a la seguretat dels laboratoris.

2. Avaluació del risc de criopreservació i emmagatzematge de semen humà

La criopreservació i el posterior emmagatzematge d'espermatozoides humans és un procés altament complex, que suposa una responsabilitat especial que recau en el personal del laboratori.

En l'avaluació dels riscos associats a la criopreservació i emmagatzematge de semen s'han de tenir en compte les qüestions següents:

2.1. Recursos

- Seguretat física dels recipients, mostres i magatzem, per reduir el risc de pèrdua per robatori o incendi, fallada de palletes (*straws*), ampolles (*ampoules*) i recipients (*vessels*) de crioconservació, i subministrament de nitrogen líquid.
- Idoneïtat dels equips per a l'ús proposat.
- Sistema de contenció i eliminació de nitrogen.
- Els dipòsits (*tanks*) han de disposar d'alarmes per nivell de nitrogen per sota d'un determinat llindar o temperatura per sobre d'un determinat llindar. El nivell d'alarma s'ha de configurar de manera que proporcioni un avís abans que es produeixi una situació crítica i s'hauria de connectar amb un centre de trucades que després assessorarà al personal del banc d'esperma en cas d'incidència.

2.2. Seguretat i protecció del personal

- Els equips de protecció individual han d'estar sempre disponibles al banc. Si és possible, dues persones han d'estar presents simultàniament al banc; en cas contrari cal avisar al personal extern abans d'entrar.
- Sistemes d'alarma per a la detecció de baixos nivells d'oxigen atmosfèric (s'aconsellen accions correctores associades a aquests).

2.3. Risc de contaminació creuada

Per reduir el risc de contaminació creuada amb agents infecciosos entre mostres en emmagatzematge (per exemple, transmissió del VIH o del virus de l'hepatitis B [VHB] o C [VHC] a través d'un recipient de criopreservació), cal considerar:

- tipus de contenidor d'emmagatzematge: ampolles o palletes i mètode de tancament de les palletes (calor o polímer) i l'ús d'una funda secundària (*straw-in-straw*);
- naturalesa del recipient d'emmagatzematge: nitrogen líquid o vapor;
- protocol i mètode d'emmagatzematge de mostres d'alt risc (mostres que se sap que contenen o se sospita que contenen virus). En aquests casos, es recomana l'ús de tancs separats per a cada positivitat del virus i, en algunes zones, és obligatori;
- realitzar la crioconservació de cada pacient per separat i desinfectar tota la superfície al final de cada procediment.

Altres precaucions que es poden prendre per evitar o limitar la contaminació si no es poden garantir les precaucions anteriors:

- Esterilització de nitrogen líquid per evitar la contaminació —útil en cas de vitrificació on la mostra està submergida directament en nitrogen líquid;
- Ompliment periòdic de matrassos o dipòsits d'emmagatzematge amb nitrogen líquid estèril i descontaminació anual dels criotancs;
- Descontaminació d'exemplars congelats abans de l'escalfament;
- Realitzar les proves de virus i infeccions de transmissió sexual a tots els homes en el moment de l'emmagatzematge al banc de la següent manera (o segons la normativa nacional): VIH, tipus 1 i 2; VHB; VHC; *Treponema pallidum* (és a dir, sífilis); *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; virus limfotròfic de limfòcits T humans i citomegalovirus (CMV). Per als donants d'esperma, es poden requerir altres proves segons legislació nacional.

2.4. Seguretat de les mostres congelades

- Dividir les mostres i emmagatzemar-les en criovasos separats o en llocs diferents per reduir el risc de pèrdua total.
- Comprovar la identitat de les mostres a cada pas.
- Utilitzar un etiquetatge robust i codis d'identificació.
- Disposar de procediments per a l'auditoria periòdica de l'ús del material i les mostres emmagatzemades restants.
- Després d'un ús prolongat, els dipòsits de criomagatzematge es poden contaminar. Per tant, s'haurien de descontaminar periòdicament amb solucions que no reaccionin amb l'alumini o l'acer. Es recomana la descontaminació almenys una vegada a l'any.
- Tots els dipòsits han de contenir alarmes de sensor de baix nivell per controlar la temperatura i nivell de nitrogen líquid. Els sensors han d'estar connectats a una alarma per alertar el personal de laboratori d'eventuals problemes.
- L'emmagatzematge en fase de vapor més que en el nitrogen líquid pot reduir el risc de contaminació creuada. No obstant això, es poden produir grans gradients de temperatura en recipients d'emmagatzematge de vapor, depenent de la forma, la càrrega de mostres i el tipus de contenidors de mostres. Si s'utilitza l'emmagatzematge en fase de vapor cal assegurar que els recipients utilitzats estan dissenyats per a aquest propòsit i ratificats als estàndards internacionals de dispositius mèdics.
- Les palletes segures fetes de resina ionomèrica termosegellable són adequades per a l'emmagatzematge en nitrogen líquid (palletes d'alta seguretat). Aquestes són a prova de fuites, bacteris i virus, i mecànicament resistent a -196 °C.

3. Protocols de criopreservació de semen

Hi ha disponibles diversos protocols de congelació i gestió del banc d'esperma. També hi ha diversos crioprotectors disponibles comercialment. Els crioprotectors com es deia a la introducció es classifiquen en permeables (entre els quals el glicerol, que és el més utilitzat) i no permeables (com les molècules de sucre i el rovell d'ou).

A continuació, es detallen les característiques d'un crioprotector d'ús habitual (mescla de glicerol, rovell d'ou i citrat) el GEYC (de l'anglès, *glicerol-egg yolk-citrate*) i els procediments de congelació de vapor o controlats per màquina.

Tenint en compte que els espermatozoides criopreservats es poden utilitzar per generar embrions, tots els procediments s'han de realitzar, si és possible, sota una campana de classe A en una habitació classificada (almenys D) segons les bones pràctiques internacionals de fabricació. Els mètodes i l'entorn de congelació s'han de documentar si es troben per sota d'aquest estàndard, però si són legals, no són un motiu per rebutjar l'emmagatzematge.

3.1. Procediment estàndard

Tot i que els crioprotectors es poden preparar al laboratori, cal tenir en compte que el rendiment de la solució i la seva seguretat no es pot controlar amb precisió.

Normalment, s'espera que, quan estiguin disponibles, els crioprotectors que es fabriquen comercialment es certifiquin i s'utilitzin els homologats per a ús terapèutic.

Això és especialment un problema per als crioprotectors a base de rovell d'ou, ja que podrien estar presents contaminants del pinso de pollastre o del medi ambient. Els procediments que es descriuen a continuació són molt difícils d'estandarditzar a un nivell adequat per a l'ús terapèutic de TRHA als laboratoris locals.

Preparació del GEYC

1. A 65 ml d'aigua purificada estèril afegiu 1,5 g de glucosa i 1,3 g de citrat de sodi dihidrat tribàsic.
2. Afegiu 15 ml de glicerol i barregeu-ho bé.
3. Afegiu 1,3 g de glicina. Quan es dissol, filtreu la solució a través d'un filtre de 0,45 µm
4. Afegiu 20 ml de rovell d'ou fresc (preferiblement obtingut d'ous lliures de patògens específics), rentar l'ou i treure la closca. Perforeu la membrana que envolta el rovell i agafeu amb una xeringa (s'obtidran aproximadament 10 ml de rovell per ou).
5. Poseu tota la suspensió al bany maria a 56 °C durant 40 minuts i gireu de tant en tant.
6. Comproveu el pH de la solució. Si està fora del rang 6,8-7,2, descarteu la solució i prepareu-ne una de nova, per si s'han afegit ingredients o quantitats incorrectes.
7. En aquesta fase es pot realitzar un cultiu bacterià per a les proves d'esterilitat.
8. En aquesta fase es poden fer proves de toxicitat espermàtica.
9. Distribuïu la solució en alíquotes de 2 ml en una zona de treball estèril i emmagatzemeu-la a -70 °C.
10. Utilitzar en un termini de tres mesos.

Els crioprotectors similars a GEYC estan disponibles comercialment.

Addició de crioprotector al semen

1. Descongelar el crioprotector, escalfar-lo a temperatura ambient i barrejar. Un escalfament inicial a 37 °C pot ser beneficiós.
2. Les altes concentracions de glicerol són perjudicials per als espermatozoides. Per tant, és vital tenir especial cura a l'hora d'afegir i barrejar el crioprotector amb el semen.

3. Afegiu un volum de crioprotector GEYC a dos volums de semen, o gota a gota amb remolí, o pipetejant suaument amunt i avall, o progressivament en cinc incorporacions amb una barreja suau durant uns deu minuts a temperatura ambient.
4. Després d'haver afegit tot el crioprotector GEYC, incubeu la mescla a 30-35 °C durant cinc minuts.

Ompliment de palletes (straws) de semen

1. Les palletes de plàstic de 0,5 ml són populars per les seves propietats de transferència de calor i la facilitat d'emmagatzematge. Els vials de plàstic es poden utilitzar per emmagatzemar volums més grans.
2. Aspireu la barreja de semen i crioprotector GEYC en palletes de plàstic de 0,5 ml de semen o poseu-les en criovials. Algunes palletes comercials estan proveïdes d'una «punta d'ompliment» d'un sol ús que evita que l'extrem de la palleta es contaminei directament per semen. Les palletes es poden omplir amb un col·lector en un dispositiu de buit o amb un adaptador per adaptar-se a l'extrem de la palleta. S'omplen fins que el líquid toca el tap de cotó, la qual cosa evitarà que la palleta es buidi quan s'elimini la succió.

Segellar les palletes de semen

1. Deixeu un espai d'aire d'un centímetre a l'extrem inferior tocant la palleta al costat del contenidor. Si utilitzeu una punta d'ompliment, aquest serà automàticament el cas.
2. Segelleu amb calor les palletes per tots dos extrems utilitzant un termosegellador.
3. Netegeu l'exterior del recipient i, a continuació, esterilitzeu-lo amb alcohol al 70 % (v/v) o un altre descontaminant microbià.
4. Assegureu-vos que les palletes estiguin etiquetades amb els detalls correctes del pacient/donant i que estiguin correctament segellats els dos extrems en aquesta etapa o abans.

Refrigeració i congelació del semen en congeladors programables

Hi ha congeladors programables disponibles que controlen la injecció de vapor de nitrogen líquid a la cambra de congelació.

1. Col·loqueu les palletes o criovials en un congelador programable i seguiu les instruccions del fabricant per activar el programa.
2. Un programa habitual és refredar les palletes a 1,5 °C per minut de 20 °C a -6 °C i després a 6 °C per minut fins a -100 °C. Això triga uns 40 minuts. Aleshores, la màquina mantindrà la cambra a -100 °C durant 30 minuts per permetre retards abans de transferir les palletes al nitrogen líquid.
3. Es poden utilitzar altres procediments més complicats, segons l'experiència en laboratoris individuals

Refredament i congelació manual del semen

Els mètodes manuals són menys controlables i estandarditzats que els congeladors programables però poden donar resultats adequats. Hi ha moltes alternatives a aquest procediment.

1. Col·loqueu les palletes a la nevera-congelador (-20 °C) durant 30 minuts i després sobre gel sec (-79 °C) durant 30 minuts abans de posar-les en nitrogen líquid (-196 °C).
2. Les palletes es poden traslladar del congelador de -20 °C a un altre congelador a -70 °C, o en una cistella o copa amb una barreja de vapor de nitrogen líquid i aire al coll d'un recipient petit de nitrogen líquid entre -80 °C i -100 °C durant 10-15 minuts, abans de ser dipositat en nitrogen líquid. També es poden col·locar en un bastidor 10-20 cm per sobre del nitrogen líquid en un recipient gran i deixar-los durant una hora per desenvolupar un gradient de temperatura per sobre del nitrogen líquid.

Congelació ràpida de vapor

La congelació manual ràpida de vapor també pot donar resultats adequats.

1. Col·loqueu les palletes en vapors de nitrogen líquid a uns 10 cm per sobre del nivell de N₂ (-80 °C) durant 8-10 minuts per permetre la congelació lenta inicial. Per estandarditzar el procés es poden utilitzar caixes comercials amb bastidors flotants per a palletes o per a criovials, que mantenen una distància fixa entre les palletes i el nitrogen.
2. Submergiu les palletes en nitrogen líquid immediatament després.

Emmagatzematge de semen congelat

1. Col·loqueu les palletes congelades en tubs d'emmagatzematge de plàstic (per exemple, minigoblets, tubs en varetes o cassets de palleta) i introduïu-los en gots d'emmagatzematge més grans.
2. Emmagatzemeu els goblets amb les palletes en matrassos de buit de nitrogen líquid (Dewar) o tancs.

Transport de semen congelat

Assegureu-vos que es compleixen les normatives locals, nacionals i internacionals sobre l'enviament de nitrogen líquid i mostres biològiques humanes.

Els espermatozoides congelats es poden transportar en tancs de transport sec disponibles comercialment refredats amb nitrogen líquid. Depenent de la mida del tanc, es poden mantenir temperatures adequadament baixes de diversos dies a diverses setmanes, ja que el nitrogen líquid s'evapora.

Descongelació de semen congelat

1. Abans d'utilitzar-les, traieu tantes palletes o criovials com sigui necessari del nitrogen líquid o tanc de vapor i poseu-los immediatament a 37 °C (en una incubadora, o encara millor un bloc de calor sec per calefacció de contacte, que es pot descontaminar fàcilment entre usos).
2. Després de la descongelació completa, talleu l'extrem de la palleta amb unes tisores estèrils i carregueu el dispositiu d'inseminació (d'ús terapèutic) o expulseu el contingut per determinar motilitat postdescongelació (per comprovar el procés de congelació).
3. Eliminar el crioprotector afegint el medi de cultiu abans de la centrifugació durant deu minuts a 500 g. Traieu el sobrenedant i diluiu el sediment d'esperma en un medi de cultiu al volum adequat.

En el cas que els pacients decideixin descartar el seu semen criopreservat, les palletes o criovials s'han de retirar i descartar en presència d'un testimoni per confirmar que el material és el correcte.

3.2. *Etiquetatge de palletes/criovials i registres*

Tots els procediments que impliquen la identitat de les mostres del donant o del pacient, inclosa la recepció de mostres, la preparació i l'etiquetatge de les palletes, la col·locació en dipòsits i la descongelació de les palletes per al seu ús o descart, han de ser de doble verificació per més d'una persona i deixar constància d'haver realitzat aquesta comprovació en els registres del laboratori. Idealment, un tècnic no hauria de processar més d'una mostra de semen alhora.

S'ha d'utilitzar un codi a totes les fitxes de dades del laboratori i bases de dades informàtiques per mantenir l'anonimat dels donants. S'ha de guardar la clau del codi amb la identitat del donant per separat i de forma segura.

Hi ha molts sistemes de codificació potencials; el requisit important és tenir un codi únic per a cada donant o client del qual s'emmagatzema esperma. En el cas de clients/pacients, és important identificar cada palleta/criovial amb el nom, data de naixement, número d'hospital i la data d'emmagatzematge i qualsevol altre requisit segons la legislació nacional.

Totes les mostres han de tenir un codi que permeti la seva identificació durant l'emmagatzematge i la transferència des del banc de semen fins al centre receptor.

3.3. *Vitrificació*

Les proves emergents indiquen que la vitrificació pot ser un mètode valuós per criopreservar espermatozoides ejaculats. El principi del mètode és la congelació ultraràpida d'un petit volum de mostra mitjançant contacte directe amb nitrogen líquid lliure de contaminants, que hauria d'evitar la formació de gel i reduir els danys osmòtics.

La vitrificació en palleta (vitrificació asèptica), que fa servir un sistema tancat i no requereix nitrogen líquid estèril, també és possible.

Es pot realitzar la vitrificació de tot el semen o d'espermatozoides seleccionats utilitzant tant crioprotectors permeables com no permeables i es poden utilitzar per criopreservar un únic espermatozou o un nombre reduït d'espermatozoides. En l'actualitat, l'evidència de millors paràmetres després de la descongelació de vitrificats respecte als mètodes de congelació convencionals és limitada i, per tant, la vitrificació dels espermatozoides s'ha de considerar un procediment experimental (10).

Protocol de vitrificació directa

La vitrificació, juntament amb els anomenats dispositius «oberts», requereix una exposició directa de la mostra al nitrogen líquid, i aquesta exposició suposa un risc de contaminació addicional. Sempre es recomana l'ús de nitrogen líquid estèril. El procediment pot també ser perillós per a l'operador, que ha d'utilitzar sempre equipament de protecció adequat.

Materials

- Crioprotectors
- Nitrogen líquid estèril
- Una caixa per nitrogen líquid
- Un petit colador per recollir esferes vitrificades
- Criotubs.

Mètode (11)

1. Després de la dilució amb un volum igual d'extensor, el semen se submergeix en nitrogen líquid lliure de contaminants mitjançant un recipient d'un sol ús.
2. A continuació, les esferes obtingudes s'envasen en criovials, que són immediatament submergits i emmagatzemats en nitrogen líquid.

Protocol de vitrificació en palleta

Els mètodes de vitrificació en palleta (vitrificació asèptica) fan servir un sistema tancat, en palles dobles (unes dins de les altres) completament tancades. Són asèptics, sense contacte directe amb el nitrogen líquid i vitrifiquen un volum de mostra més gran (100 µl) amb un nombre elevat d'espermatozoides. Aquest procediment és menys perillós per a l'operador.

Materials

- Palletes de 0,5 ml i 0,25 ml
- Medi de vitrificació
- Una caixa per nitrogen líquid

- Tubs cònics de 10 ml
- Medi d'escalfament.

Mètode

1. Prepareu 1 ml de medi per a la vitrificació:
 - medi de rentat d'esperma o HTF: 0,495 ml
 - sacarosa 0,5 M dissolta en aigua (p. ex. MP Biomedicals, Cat. 152584): 0,495 ml
 - suplement de sèrum de dextran (p. ex. IrvineScientific, Cat. 9301): 0,010 ml
2. Utilitzeu espermatozoides seleccionats (lliures de plasma seminal) per natació o centrifugació per gradient de densitat segons els paràmetres espermàtics i els protocols del laboratori local.
3. Després de recuperar els espermatozoides seleccionats, feu un recompte d'espermatozoides, concentreu-los per centrifugació (8-10 minuts a 300 g), elimineu completament el sobrenedant i afegiu la quantitat adequada de medi de vitrificació per resuspendre el sediment (calculat com segueix):
 - Volum de suspensió a vitrificar per palleta (0,25 ml): 100 µl
 - Concentració d'esperma per palleta: 0,1–3,0 x10⁶ espermatozoides
4. El tipus d'extensor, la temperatura del crioprotector i el temps en què les cèl·lules estan exposades als crioprotectors són crítics i poden influir en l'eficàcia del procés.
5. Barrejar el sediment d'esperma amb el medi de vitrificació just abans de la vitrificació (temperatura ambient). No és aconsellable exposar les cèl·lules al medi de vitrificació durant llargs períodes de temps.
6. Una palleta de 0,25 ml s'ha de tallar a dos terços de la seva longitud original. Després es col·loca horitzontalment i es dispensa una alíquota de 100 µl, amb l'ajuda d'una pipeta, a l'extrem obert. Durant de les següents etapes és imprescindible que la posició horitzontal es mantingui perquè l'alíquota no es perdi.
7. Després s'introdueix la palleta en una altra palleta de 0,5 ml, que se segella tèrmicament pels dos extrems. La palleta s'ha de submergir immediatament en nitrogen líquid durant cinc segons en posició horitzontal amb l'ajuda de pinces i emmagatzemar-la en nitrogen líquid.

Escalfament després del procediment de vitrificació

1. Prepareu el medi d'escalfament.
2. Descongela el contingut de les palletes/crivials en un medi preescalfat a 42–43 °C.

Annex 2: Estratègia de cerca i registres identificats segons font consultada

2.1. Cerca definitiva a diferents bases de dades bibliogràfiques (N=28)

Bdd	Resultats
Ovid (Medline)	3
EMBASE	12
Cochrane	1
Scopus	6
WoS	5
Epistemonikos	1

Registres recuperats: 28

Registres únics: 17

Medline (OVID)

Ovid MEDLINE(R) and Epub Ahead of Print, In-Process, In-Data-Review & Other Non-Indexed Citations and Daily 1946 to June 22, 2022

Resultats: 3

Núm	Cerca	Resultats
1	Vitrification/	2211
2	"vitrification*".ab,ti.	4769
3	1 or 2	5199
4	exp Spermatozoa/	71954
5	Semen Preservation/	6270

Núm	Cerca	Resultats
6	Sperm Banks/	512
7	(semen* or sperm*).ab,ti.	160550
8	or/4-7	170734
9	(Home or "home-made" or "home made" or offsite).ab,ti.	259559
10	("Sperm Freeze(K)it" or "sperm freezing kit" or "sperm freeze kit").tw.	0
11	9 or 10	259559
12	3 and 8 and 11	3

Embase

Resultats: 12

Núm	Cerca	Resultats
#1	'vitrification'/exp	7477
#2	vitrification*:ab,ti	7820
#3	#1 OR #2	9176
#4	'spermatozoon'/exp OR 'sperm preservation'/exp OR 'sperm bank'/de	56182
#5	semen*:ab,ti OR sperm*:ab,ti	192339
#6	#4 OR #5	199983
#7	home:ab,ti OR 'home-made':ab,ti OR 'home made':ab,ti OR offsite:ab,ti	373203
#8	'sperm freeze(k)it' OR 'sperm freezing kit' OR 'sperm freeze kit'	1
#9	#7 OR #8	373203
#10	#3 AND #6 AND #9	12

Cochrane

Resultats: 1

Núm	Cerca	Resultats
#1	MeSH descriptor: [Vitrification] explode all trees	48
#2	(vitrification*):ti,ab,kw	453
#3	#1 or #2	453
#4	MeSH descriptor: [Spermatozoa] explode all trees	479
#5	MeSH descriptor: [Semen Preservation] this term only	30
#6	MeSH descriptor: [Sperm Banks] this term only	3
#7	(semen* or sperm*):ti,ab,kw	7855
#8	(12-#7)	7855
#9	(Home or "home-made" or "home made" or offsite or "Sperm Freeze(K)it" or "sperm freezing kit" or "sperm freeze kit"):ti,ab,kw	50530
#10	#3 and #8 and #9	1

Scopus

Resultats: 6

TITLE-ABS-KEY((Vitrification*) AND (Semen* OR Sperm*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit"))

Web of Science

Resultats: 5

Núm	Cerca	Resultats
#1	TS=(vitrification*)	13884
#2	TS=(semen* OR sperm*)	220549
#3	TS=(Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite)	509759
#4	ALL=("Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")	1

Núm	Cerca	Resultats
#5	#4 OR #3	509759
#6	#5 AND #2 AND #1	5

Epistemonikos

Resultats: 1

(title:(title:(Vitrification*) AND (Semen* OR Sperm*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")) OR abstract:(Vitrification*) AND (Semen* OR Sperm*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")))) OR abstract:(title:(Vitrification*) AND (Semen* OR Sperm*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")) OR abstract:(Vitrification*) AND (Semen* OR Sperm*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit"))))

Bibliografia

1. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):202-6.
2. Guan HT, Zheng Y, Wang JJ, Meng TQ, Xia W, Hu SH, et al. Relationship between donor sperm parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination: analysis of 2821 cycles in 1355 couples. *Andrologia*. 2016;48(1):29-36.
3. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006;86(3):721-2.
4. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005;84(4):1017.
5. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(1):1-12.
6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, . Geneva: World Health Organization; 2021 [cited 2022 17-10]. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1358672/retrieve>.
7. Institut Marquès. Sperm freeze(K)it. Home sperm freezing kit. <https://institutomarquescom>. Barcelona: Institut Marquès; 2020.
8. Institut Marquès. Kit de congelación de semen en casa. Instrucciones para la congelación de semen en casa. Barcelona: Institut Marquès,.
9. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-39.
10. Li YX, Zhou L, Lv MQ, Ge P, Liu YC, Zhou DX. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84-92.
11. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*. 2017;5(6):1055-63.

Salut/  Agència de Qualitat i Avaluació
Sanitàries de Catalunya