



人类精子库库存管理面临的问题及对策

林法喜¹, 王家雄², 孙红勇¹, 王增军¹

1. 南京医科大学第一附属医院人类精子库, 江苏 南京 210029;

2. 苏州市立医院生殖中心, 江苏 苏州 215002

摘要:随着辅助生殖技术的迅猛发展,精子冷冻技术在支持生育治疗和保存男性生育能力方面扮演了关键角色。然而,精子库管理中仍存在隐患,包括交叉污染、储存设备故障以及人员操作不当等。文章重点探讨并提出了对应的优化策略,为精子库的管理提供科学依据和实践指导,为患者的生育治疗提供支持。

关键词:精子库; 精子冷冻; 交叉污染; 标本管理

中图分类号:R197.1

文献标志码:A

文章编号:1671-0479(2024)06-641-005

doi:10.7655/NYDXBSS240304

如今,不孕不育影响着许多育龄家庭,生殖健康问题已经逐渐变成一个不容忽视的临床问题。近年来,精子冻存技术的不断发展给男性的生育力保存与供精治疗提供了技术支持,也给临床解决男性不育问题提供了更多的选择。我国自20世纪80年代初开始,在各个省份开展了人类精子冷冻技术的研究并逐渐用于临床。进入21世纪,随着《人类精子库管理办法》的颁布,我国人类精子库陆续规范开展。人类精子库分为精液采集部、精液冷冻部、精液档案部、精液外供部,其中精液冷冻部包含了精子标本库,保障精子标本库的安全运行是精子库最重要的工作之一^[1]。虽然相较北欧我国起步较晚,但是国内的精子库运行至今20余年,已经给很多家庭带去孕育的幸福,与生殖中心的配合也日渐规范与稳定^[2]。随着国家对精子库日益重视,患者需求的不断增高,精子库库存管理压力不断增大。本研究通过总结已有的问题与教训,结合日常工作给出相应的对策。

一、人类精子库库存管理面临的问题

(一)样本交叉污染的现状

为了保证精子长期储存期间的质量维持,低温储存通常在-196℃液氮或低于-150℃的气相氮气中进行,这两种方法各有优劣。液氮储存的罐体较

小,温度恒定,标本存取方便,发生意外时标本损失小,但需定期手动添加液氮,需额外安装温度监控装置,取样时易造成标本交叉污染,存放标本量较少。气相储存装置具有温度监控和报警装置,可自动添加液氮;罐体较大,存放标本量大;标本存放在气体中,交叉污染的概率降低。但随着液氮挥发,罐体内液面的高度变化会导致温度不恒定,不利于标本保存。并且罐体较大,标本存取不便,发生意外时标本损失大。为避免冷冻过程中冰晶的形成和渗透压的影响,需经过程序化冷冻或玻璃化冷冻。这些冷冻方法不仅可以冷冻精子,对微生物也同样有效,这就导致在精子冷冻保存时存在潜在的微生物污染风险^[3]。意大利一精子库在解冻了98例肿瘤患者精液样本后,与60例健康新鲜的精液样本对比发现,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)精液感染的比例在解冻的患者中为6.1%,高于对照组的3.3%,虽然HPV污染是否会将病毒传染给伴侣并影响辅助生殖技术结果等临床问题仍有待商榷,但是其污染还是使后续精子的使用存在安全隐患^[4]。艾滋病病毒(human immune deficiency virus, HIV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)也可在液氮中存活,并通过液氮作为传播媒介,感染其他标本,造成冷冻精液标本间的交叉污染^[5]。此外,来源各异的微生物可以通过样本本身、商品化的液氮、

基金项目:江苏省科教能力提升工程项目“江苏省医学重点学科/实验室”(ZDXK202219)

收稿日期:2024-07-15

作者简介:林法喜(1989—),男,江苏海安人,本科,助理研究员,研究方向为精子库管理;王增军(1966—),男,江苏丰县人,主任医师,教授,研究方向为泌尿外科学和男科学、精子库管理等,通信作者,zengjunwang2002@sina.com。

操作人员、容器、环境等多个场景侵入(图1)。

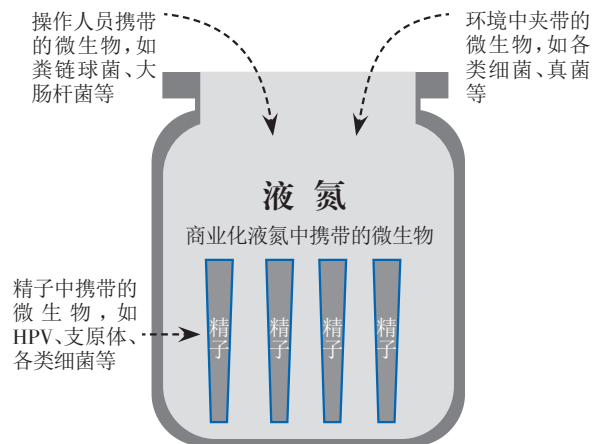


图1 储存精子的液氮罐中微生物潜在来源概览

(二) 样本交叉污染的可能环节

1. 捐精者带来的污染

如上文所述,液氮不仅可以储存生殖细胞,对于各种微生物也都有很好的储存作用,因此一旦捐精者自身即为感染者,其精液中已有相应的微生物,入库后还可能污染其他样本。即使捐精者并没有感染微生物,但是取精过程中对微生物处理的不规范,导致带入精液之中,也可能因此污染储存体系。重庆精子库曾对3 112例精液样本分别进行冻前和冻后的细菌培养,冻后菌落数大于冻前的有391例,占12.56%,不容小觑^[6]。

2. 样本运输过程中的交叉污染

样本运输过程中,由于精子需要从存储罐转换为运输罐,过程中如果有纰漏就可能存在污染,而且运输罐通常也是灌注了商业化液氮的小容积液氮罐,样本直接与液氮接触,可能会有接触污染。

3. 样本处理过程中的交叉污染

在实验室人员操作过程中,如果存在管理不规范,会对样本产生污染。处理患者样本时如果存在耗材的重复使用,也有交叉污染的风险。

4. 样本存储中的交叉污染

样本存储过程中使用到试剂、耗材、设备都是潜在的污染点,如冷冻液、液氮、罐体被污染,冷冻管不密闭等。其中由于液氮的长期使用,以及对微生物有效冷冻的特质,是交叉污染的重灾区。

(三) 精液存储设施安全

不同的储存设备有着不同的结构和相应的操作,也就决定了各自的优缺点。如果细分,在运输与存储过程中常用的罐子有四种,一种是用于运输的运输罐,其余三种是储存罐,即小容量液氮罐、大容量液氮罐和大容量氮蒸汽罐。液氮罐的结构基本是2~3层碳钢、不锈钢或铝,各层之间通过焊接密封,形成一个“环形空间”,该空间通过减压,形成高

真空环境。环形空间内还填充有绝热材料,设计的初衷就是为了隔绝外界向罐内的热传导。因此,真空层的数量、隔热层的类型和数量、焊接质量、有无缺陷(裂缝、穿孔等)都会影响储气罐的隔热能力,最直观的就是会影响液氮的挥发速度^[7]。气罐有着配套的机械装置(即电磁阀、热交换器或风扇),但缺点是这些装置必须保持稳定,才能安全地储存样本,一旦出现电气故障,损失不言而喻。

影响储存罐安全的不仅有结构,还有容积。虽然目前的储存设备可以很好地保存精子的活力,但如果储存罐中不能保持足够的液氮,就会导致储存的样本解冻,最终精子完全失活,这种损失对受影响的患者、他们的伴侣和生殖中心来说可能是灾难性的^[7]。运输罐容积较小,如果出现缺陷,液氮会挥发得很快,而且在运输过程中无法像在实验室里那样做到实时监控、报警以及补救,样本很容易损失。对于最常用的液氮罐,如果是小容量的,要小心液氮罐颈部与内罐之间的焊缝出现问题。这些颈部的故障会导致真空度下降,罐体隔热效率大打折扣。大容量液氮罐没有小容量液氮罐颈部焊缝失效的致命弱点,但是补充液氮麻烦,有实验室依靠机械/电气电磁阀自动补充液氮,这使得电气故障同样会影响该类液氮罐。不过只要规避这一功能,手动给这些罐子充气,这类大容量液氮罐就是最安全的储存罐^[8]。

二、相应的对策

(一) 多个环节避免污染

面对精液的微生物污染,需要从多个环节控制,包括供精者筛选、取精时风险管控、样本运输、样本处理和储存在内的各个处理过程^[9]。

目前,我国的志愿者在捐精之前接受了严格的传染病筛查,包括乙肝两对半、丙肝、梅毒、HIV、巨细胞病毒、风疹病毒、单细胞病毒、弓形虫、支原体、衣原体等,其中HIV需要等捐精结束6个月后再次进行复查。针对样本本身可能存在的病原体污染,现有的病原体筛查覆盖面还不够广泛。欧美的精子库主要筛查HIV、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、HCV、人类嗜T细胞病毒、巨细胞病毒梅毒、淋病奈瑟球菌、沙眼衣原体等^[10],对机会致病菌、支原体、HPV等并没有足够重视。因此,扩大筛查范围,降低供精者精液中的病原体微生物可以很好地从源头上减少样本库的污染风险。供精者在精液采集过程中,有效清洁双手及外生殖器可降低精液微生物污染的风险,可以减少杂菌感染及携带污染,同时建议供精者使用一次性的取精用品,加强有效消毒的宣教^[1]。

样本运输过程中可能会有接触污染,但由于暴

露环境基本是无菌实验室,运输中与液氮接触时间也较短,只要精子存放的储存管密封性没有问题,此类污染就会减少。

对于样本处理中精液的优化处理,精子洗涤等通常被认为是除去精液中微生物的方法。一项回顾性分析发现在3 994名女性的11 585个周期的辅助生殖中,通过精子洗涤避免了HIV传播,56.3%的夫妇通过使用洗涤后的精子实现了临床妊娠^[11]。但是洗涤并非万能,有研究报道采用三种精子洗涤方法均无法很好地去除HPV,并建议在入库前就对供精者进行HPV感染的筛查^[12]。

对于存储,目前精子多采用程式化冷冻或玻璃化冷冻方法,而近年来无冷冻保护剂的玻璃化冷冻

逐渐被开发,它通过直接浸入冷却剂来快速冷却精子,防止致命的细胞内冰结晶和高盐浓度的有害影响,但随之而来的问题是,无法对可能被不同病原体污染的商业生产的液氮进行完全灭菌^[13]。

商业化液氮可能存在微生物污染的情况,使得近年来不直接与液氮接触的气相存储备受推崇。液相存储和气相存储各有优劣,在此笔者建议根据不同的操作环节与使用场景进行选择(表1)。近年来,气相存储被研究者不断开发,他们使用台式设备生产与液氮温度相同的无菌液态空气,而不是低温氮蒸汽,用于对人类精子进行无冷冻保护剂的玻璃化冷冻^[14],从根本上解决了存储介质带入的微生物污染。

表1 精子库不同阶段精液标本存放策略的选择

类别	第一阶段	第二阶段	第三阶段
存放区域	捐献区	待供区	外供区
定义	正处于志愿者捐献过程中的标本	志愿者捐献完成,等待6个月潜伏期后复查HIV的标本	志愿者完成6个月潜伏期后复查HIV合格,可以外供用于临床治疗的标本
存放时间	存放时间短,为2~3个月,最长不超过6个月	存放时间为6个月,少数超过6个月	长期存放
存取频率	频繁,3~5天/次	一般存取各一次	需不定期存取
存放策略	小型液相罐	气相罐	中型或者大型液相罐
策略优势	标本存取频繁,采用小型罐便于日常操作,降低安全事故发生率,且液相罐保存有利于减少存取过程中的温度波动,有利于标本保存,标本存放周期短,采用密封管保存交叉污染可能性低	标本存取频次最低,但其中存贮标本未经过HIV复查,采用密封管和大型气相罐保存可以有效防止标本交叉污染	标本存取频次中等,所存贮标本经过HIV复查为合格标本,不存在交叉污染问题,采用中型或者大型液相罐保存,可以提高标本库的空间利用,维持标本储存温度的恒定,有利于标本的长期保存

对于精子样本的包装,主要通过密封型载体和非密封型载体进行保存。目前精子库使用的主要是旋盖冻存管和加热封口冻存管。当冻存管不能完全密闭,液氮和精子标本接触,液氮就成为微生物互相污染的媒介。加热封口冻存管通过加热使冻存管完全密封,液氮不会与精子接触,从而杜绝通过液氮造成微生物污染的可能。

用于保存的储存容器,如液氮罐需要定期消毒,以降低交叉污染的风险。尽管用于常规消毒的消毒试剂很多,如过氧化氢、酒精、洗涤剂等,但是目前还没有关于消毒剂或清洁剂对液氮罐消毒效果的详细研究报道。因此有研究者建议,将洗涤后不立即使用的液氮罐干燥储存,同时严格密封,以防止环境微生物的滋生。当罐子再次使用前最好在重新注入新鲜液氮前进行额外的清洗^[15]。建议对于不含吸附层的液氮罐定期进行清洗消毒后再使用,可以先使用中性洗涤剂 and 温水把液氮罐冲洗干净,罐内用75%的酒精消毒或紫外线照射,注意定期更换陈旧液氮,避免液氮中的病毒细菌不断富集浓缩。

为了最大限度地降低污染风险,实验室工作人

员应接受培训,并根据相应的材料安全数据、实验室标准操作程序(standard operating procedure, SOP)遵守处理液氮的安全规则。标准操作程序应包括在建筑物和实验室内安全运输,以及容器中注入液氮的规则和程序等,遵守这些规则可防止因冷冻解冻标本发生的飞溅与污染风险^[16]。

(二)标本库的设备检测与更新

必须意识到,再好的存储设施都有可能发生故障,早发现早处理,防患于未然,在精子受损之前及早发现故障才是避免损失的最佳方法。这就需要预计到故障的发生并随时准备好采取措施,做好定期监控巡查与检修。应对精子库整体设施进行每周一次的全面巡查,同时为了避免设备故障或人员疏忽导致的标本存放危险,需要对液氮罐进行实时温度监控,给液氮罐安装温度或者液面监控装置,并提供远程报警,有利于及时处理突发情况。有研究者开发了一种基于重量监测的低温储罐故障报警系统,他们将液氮罐放置在定制设计的秤上,并设置了液氮的慢速、中速和快速三种损失速度,连续监测重量和温度数据,以模拟储罐故障的三种情况,然后发现重量的变化快于温度的变化,可以作

为温度监测的补充与早期警报^[17]。监控措施应扩大到整个实验室,而并非仅仅是储存区域与操作区域,以避免人员失误导致的存储失败。

除了警报与巡查,液氮罐也需要定期检测,以防止真空层损坏,造成标本损失。每年请专业机构对液氮罐的真空层进行检测维护保养,及时淘汰更换风险较高的液氮罐。使用集成软件提高操作中的自动化可防止人工流程的弊端。自动化可减少生殖材料的错误识别、错位或丢失等事件。在自动化样本库存系统中,样本将被安全地保存在受控温度下,并对其位置进行持续控制^[18]。但是也需认识到,大量引入自动化设备,电气故障带来的麻烦可能更多,并且可能与老设备不兼容而导致大量的浪费。因此,必须权衡新老系统的兼容性。无论采用何种新技术,都应制定明确可靠的方案,考虑到可能发生的各种故障,进而通过引入有效的纠正措施提高安全性^[19]。建议实验室对设备每月检测一次。

除了定期巡查监控与定期检修,实验室规划以及制度的标准化也至关重要,比如,液氮罐安装的锁具必须有两人才能打开,存放样本也需要三人核对。同时建议标本尽量分开存放,将同一个志愿者或者自精保存患者的标本分不同的储存罐存放,降低标本全部灭失的风险。低温储藏室应该是一个宽敞的区域,工作人员可以观察和进出,这样做的目的是方便储罐的日常使用和检查,同时又不会带来安全风险。

综上所述,精子冷冻保存是辅助生殖技术中一项重要的生育管理技术,必须对其有清楚的认知并不断保持敬畏。新技术的开发,如气罐的应用很好地规避了罐内介质带来的污染,而新的冻干技术更是有望在常温下就可以保存运输精子^[20],一旦在精子库应用,那上述的很多问题都可以很好地解决。因此,作为精子库的工作者,一方面需要脚踏实地守护精子库库存的安全,另一方面也要积极投身于新技术的研发与探讨之中。

参考文献

- [1] 张欣宗,鲜泮,李福平. 人类冷冻精液质量安全专家共识[J]. 中国计划生育和妇产科,2021,13(7):6-11,19
- [2] 杨信尊,潘荣华. 北欧各国配子捐赠制度及其对我国的启示[J]. 南京医科大学学报(社会科学版),2015,15(2):98-103
- [3] SMITH D, RYAN M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms[J]. *Sci World J*, 2012, 2012: 805659
- [4] FORESTA C, FERLIN A, BERTOLDO A, et al. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem?[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(3):242-246
- [5] GILLING-SMITH C, EMILIANI S, ALMEIDA P, et al. Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(6):1433-1438
- [6] 万凌,陈玲,黄静,等. 捐精志愿者精液冷冻保存前后细菌培养的初步研究[J]. 中华男科学杂志,2021,27(5):416-420
- [7] SCHIEWE M C, FREEMAN M, WHITNEY J B, et al. Comprehensive assessment of cryogenic storage risk and quality management concerns: best practice guidelines for ART labs[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(1):5-14
- [8] POMEROY K O, REED M L, LOMANTO B, et al. Cryostorage tank failures: temperature and volume loss over time after induced failure by removal of insulative vacuum[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(11):2271-2278
- [9] MALSAGOVA K, KOPYLOV A, STEPANOV A, et al. Biobanks - a platform for scientific and biomedical research[J]. *Diagnostics*, 2020, 10(7):485
- [10] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technology. Guidance regarding gamete and embryo donation[J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(6):1395-1410
- [11] ZAFER M, HORVATH H, MMEJE O, et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis[J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(3):645-655
- [12] FORESTA C, PIZZOL D, BERTOLDO A, et al. Semen washing procedures do not eliminate human papilloma virus sperm infection in infertile patients[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(5):1077-1082
- [13] ISACHENKO V, ISACHENKO E, KATKOV I I, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(4):1167-1173
- [14] WANG M Y, ISACHENKO E, RAHIMI G, et al. Aseptic cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa by direct dropping into a cooling agent[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2180:427-436
- [15] BIELANSKI A, VAJTA G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(10):2457-2467
- [16] TOMLINSON M. Risk management in cryopreservation associated with assisted reproduction[J]. *Cryo Letters*, 2008, 29(2):165-174

- [17] MICHAELSON Z P, BONDALAPATI S T, AMRANE S, et al. Early detection of cryostorage tank failure using a weight-based monitoring system [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(4): 655-660
- [18] ABDULLAH K A L, ATAZHANOVA T, CHAVEZ-BADIOLA A, et al. Automation in ART: paving the way for the future of infertility treatment [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(4): 1006-1016
- [19] RIENZI L, BARIANI F, DALLA ZORZA M, et al. Comprehensive protocol of traceability during IVF: the result of a multicentre failure mode and effect analysis [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(8): 1612-1620
- [20] KESKINTEPE L, EROGLU A. Preservation of mammalian sperm by freeze-drying [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2180: 721-730

(本文编辑:姜 鑫)

Human sperm bank management challenges and strategies

LIN Faxi¹, WANG Jiaxiong², SUN Hongyong¹, WANG Zengjun¹

1. Human Sperm Bank, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; 2. Center for Reproduction and Genetics, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215002, China

Abstract: With the rapid development of assisted reproductive technology, sperm cryopreservation has played a crucial role in supporting fertility treatment and preserving male fertility. However, there are still hidden risks in sperm bank management. These risks include cross-contamination, storage equipment failures, and improper personnel operation. This paper focuses on these challenges and proposes corresponding optimization strategies. This paper aims to provide scientific evidence and practical guidance for sperm bank management to support the fertility treatment of patients.

Key words: sperm cryobank; sperm freezing; cross-contamination; specimen management