

• 中华医学会生殖医学分会专家共识 •

DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2023.03.003

自身精子冷冻保存的中国专家共识

张洲, 杨杰, 孙莹璞, 孙海翔, 邓成艳, 刘平, 周灿权, 冯云, 郝桂敏, 卢文红, 全松, 沈浣, 师娟子, 滕晓明, 王晓红, 王秀霞, 伍琼芳, 曾勇, 张松英, 钟影, 黄学锋*, 黄国宁*

(中华医学会生殖医学分会第五届委员会)

【摘要】 随着辅助生殖技术的发展、生育观念的改变以及育龄男性肿瘤等疾病治疗后长期生存率的明显提高,人们对自身精子保存的需求不断增加。为规范自身精子保存技术的临床应用,中华医学会生殖医学分会生殖男科和精子库管理学组参考新近的国内外指南、共识及文献,并结合专家实践经验,共同讨论和制定了本共识,对自身精子保存的适用范围、冷冻保存方法及管理等方面提出了推荐建议。

【关键词】 自身精子保存; 辅助生殖技术; 人类精子库; 专家共识

【中图分类号】 R318.52

【文献标识码】 A

CSRM expert consensus on autologous sperm preservation

ZHANG Zhou, YANG Jie, SUN Ying-pu, SUN Hai-xiang, DENG Cheng-yan, LIU Ping, ZHOU Can-quan, FENG Yun, HAO Gui-min, LU Wen-hong, QUAN Song, SHEN Huan, SHI Juan-zi, TENG Xiao-ming, WANG Xiao-hong, WANG Xiu-xia, WU Qiong-fang, ZENG Yong, ZHANG Song-ying, ZHONG Ying, HUANG Xue-feng*, HUANG Guo-ning*

The Fifth Committee of Chinese Society of Reproductive Medicine, Chinese Medical Association

【Abstract】 There is an increasing demand for autologous sperm preservation with the development of Assisted Reproductive Technology, the change in fertility concepts, and the improvement of survival rate for various cancer types in male reproductive age. Based on recent Chinese and international relevant guidelines, consensus and literature, and combined with practical experience from experts, Reproductive Andrology and Sperm Bank Management Group, Chinese Society of Reproductive Medicine (CSRM) develop the expert consensus, aiming to standardize the clinical application of autologous sperm preservation, and put forward recommendations on indications, Cryopreservation methods, and management for autologous sperm preservation.

【Key words】 Autologous sperm preservation; Assisted reproductive technology; Human sperm bank; Expert consensus

(J Reprod Med 2023, 32(03):316-322)

一、背景

自身精子冷冻保存(简称自精保存)是指采用超低温冷冻技术将自身的精子预先进行冷冻和保存,以备保存者将来有生育需求时解冻复苏使用^[1]。自精保存作为男性生育力保存的一种主要技术手段,发展最为成熟、应用也最为广泛。不仅适用于因疾病治疗或其他不育风险而需要进行生育力保存的男性群体,也可作为辅助生殖技术治疗时精子备份保

存的方法。近年来,随着我国辅助生殖技术的飞速发展和广泛应用,以及男性生育力保存意识的逐渐增强,需要进行自精保存的男性也越来越多。据调查显示,我国人类精子库在 2010 至 2020 年这十年

【收稿日期】 2023-01-13

【作者简介】 张洲,西北妇女儿童医院。(* 通讯作者:黄学锋 xuefhuang@wmu.edu.cn;黄国宁 gnhuang217@sina.com)

间,自精保存人数整体呈明显上升趋势,年平均增长率超过 10%^[2]。随着自精保存人数的高速增长,开展自精保存的医疗机构也不断增加,相继出现了一些困惑和不同的认识。为促进自精保存技术的规范开展,中华医学会生殖医学分会生殖男科和精子库管理学组制定了本共识,对各医疗机构更好的开展自精保存工作提供一定的指导和建议。

二、方法

本共识广泛征集了我国人类精子库和辅助生殖技术实施机构关心的有关自身精子冷冻保存的实际问题,系统检索了 CNKI、万方、PubMed 以及 Cochrane library 数据库(检索时间为建库至 2022 年 12 月 31 日)中的实验性研究、前瞻性队列研究、随机对照研究、系统评价和 Meta 分析等,结合我国目前自精保存的发展现状,参考了中华人民共和国原卫生部的《人类精子库基本标准和技术规范》,提出相关的推荐建议。

1. 共识发起和支持单位:本共识由中华医学会生殖医学分会发起,生殖男科和精子库管理学组组织和撰写。

2. 指南注册与计划书撰写:本共识已在国际实践指南注册平台(International Practice Guideline Registry Platform, IPGRP)国内版进行了注册(注册号 IPGRP-2019CN080)。读者可联系该注册平台索要指南的计划书。

3. 共识使用者与目标人群:本共识适用于人类精子库和实施辅助生殖技术的机构,共识的使用人群为参与实施自精保存技术的相关人员,共识的目标人群为需要进行自精保存的男性。

三、共识建议

本共识共包含 11 条建议,主要涵盖自精保存的适用范围、冷冻保存的技术方法及管理等。

共识建议 1:适用人群

自精保存主要适用于出于“生殖保险”目的的男性生育力保存,也适用于实施辅助生殖技术时的精子备份保存。出于“生殖保险”目的的自精保存应在人类精子库进行,实施辅助生殖技术的精子备份保存也可以在实施辅助生殖技术的医疗机构进行。

出于“生殖保险”目的的男性生育力保存^[3-6]:

►患有可能会损害生育力的疾病和接受可能损害生育力的医学治疗前的男性,如绝育手术前、肿瘤放化疗前以及其他可能影响射精功能的疾病和手

术前;

►暴露于可能影响生育力的环境的男性,如消防员、油漆工,以及长期接触除草剂、杀虫剂、放射线的人员等;

►精液质量持续下降可能导致严重不育的男性;

►暂时没有生育计划,保存精子以备将来生育者。

实施辅助生殖技术时,有合理的医疗需求^[3-6]:

►在辅助生殖治疗时,取卵日不能提供新鲜精液者,如可能发生取精困难,或因特殊原因男方无法到场;

►严重精液异常者,取卵日可能无法获取足够用精子,如严重少、弱精子症、隐匿精子症患者;

►通过手术获取的附睾或睾丸精子,如生殖管道梗阻的复通手术治疗和睾丸、附睾穿刺术等;

►采用辅助取精方法采集的精子,如脊髓受损者辅助电刺激取精和逆行射精者尿液中回收精子等;

►准备接受赠卵治疗女性的配偶。

共识建议 2:知情同意

在进行自精保存前,实施自精保存的机构必须与自精保存者签署《自精保存知情同意书》,可同时签署《自精保存协议》以约定知情同意书中未尽事宜。

《自精保存知情同意书》内容应包括但不限于以下内容:

►告知自精保存的适用范围;

►告知自精保存的流程及相关注意事项;

►告知自精保存需进行的前期检查项目;

►告知自精保存的储存时间和相关费用,以及冷冻精液使用对象、使用方式等相关问题;

►告知自精保存可能存在的风险,如精子冷冻、保存和复苏过程中会对精子造成一定的损伤,其损伤有个体差异,有可能导致精子复苏后活动率降低甚至无活动精子;使用冷冻保存精液后妇女妊娠也同样存在流产、早产、畸胎、死胎、生育畸形儿等不良结局的风险;

►与自精保存者约定冻存精子保存到期后的处理方式;

►告知自精保存者,超过一定的期限(不少于 6 个月)未交保存费用,且通过预留的联系方式无法联

系到保存者时,自精保存机构有权销毁所冻存的精子;

►告知自精保存者,如果自精保存者死亡,所冻存的精子就不能用于生育子代,自精保存机构将销毁所保存的自精标本;

►如遇到不可抗力事件,如地震、火灾、战争等情况,导致自精标本的损毁,自精保存机构可免除责任。

为了弥补《自精保存知情同意书》的局限性,自精保存机构还可以与自精保存者签署《自精保存协议》。协议可对上述知情同意书中双方的责任、权利、义务以及其他相关情况予以更详尽的说明和补充。

共识建议 3: 前期检查

自精保存的前期检查,包括但不限于体格检查,精液检验,乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病、淋病奈瑟菌和沙眼衣原体等传染性疾病的检查。

自精保存前应详细询问生活史和病史,进行体格检查。相关实验室检查包括但不限于以下项目:精液检查,如精液体积、精子浓度、精子活力、精子形态等;传染性疾病的检查,如乙肝、丙肝、梅毒螺旋体、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、淋病奈瑟菌和沙眼衣原体等检查^[7-8]。建议使用精液标本检测淋病奈瑟菌和沙眼衣原体。

淋病、梅毒、生殖器疱疹、软下疳、非淋病性尿道炎、性病性淋巴肉芽肿和尖锐湿疣等患者建议治愈后 6 个月再行冷冻。处于急性感染期的性传播疾病、泌尿生殖道炎症者和 HIV 阳性者,不宜进行精子冷冻^[5]。不建议为植物人或濒临死亡的男性实施精子冻存。

在紧急情况下,如肿瘤患者急需手术或放化疗,或其他特殊原因无法按照正常流程保存精子,可在部分检查不全的情况下进行精子冷冻保存;建议所冷冻的精子采用封闭载体进行密封保存,或采用单独的液氮罐储存。实施机构应要求此类自精保存者及时完善相应检查,根据检查结果决定进一步处理方式,如转入普通液氮罐保存、单独保存或销毁等。

共识建议 4: 精子获取方式

自精保存的精子获取方式通常有手淫取精、手术取精和辅助取精等。手淫取精应在指定的取精室取精。实施机构应采取相应防范措施,避免精液污

染和取精者身份确认错误等风险。在一些特殊情况,如取精困难、行动不便或手术取精等不能在指定取精室取精,应特别注意防范以上风险。

手淫取精一般要求禁欲 2~7 d,精液采集应尽量完整^[4]。对于少弱精子症患者,可以缩短禁欲时间,如禁欲 1 d 取精可以获得活力和形态更好的精子^[9]。一项综述在回顾分析了 1979 年至 2016 年的 30 篇相关文献后发现,随着禁欲时间的减少,精液体积和精子浓度呈下降趋势,而精子活力和运动能力显著改善^[10]。但目前仍不明确禁欲时间缩短是否会改善冷冻精子将来行辅助生殖技术的治疗结局^[11-14]。

手淫留取精液前必须对自精保存者的身份进行严格确认,并在实施机构指定的取精室留取精液。实施机构应采取相应防范措施,避免精液污染和取精者身份确认错误等风险,特别是一些特殊情况,如取精困难或行动不便不能在指定的取精室完成取精者更应谨慎。如果精子需要运输后冷冻保存,运输过程中应采取安全措施,防止标本的损毁、丢失、污染和高温损伤等意外情况发生,同时应做好标本交接手续和登记。

建议实施机构对自精保存者提供的精液标本进行精液留样,而不能在指定取精室留取精液者,建议同时保留其血液样本。留样的生物标本宜永久性保存,防止污染和霉变,避免潜在法律纠纷。

共识建议 5: 冷冻方法

常规精液冷冻,推荐采用程序降温仪冷冻法和手工液氮熏蒸法;严重的少弱精子症和通过外科手术获取的附睾、睾丸精子,建议采用微量精子或单精子冷冻的方法。

精子冷冻一般采用液氮蒸汽作为制冷剂,对于精液指标正常或轻中度异常的精液,大部分精液可以采用常规冷冻方法保存^[15]。常规冷冻方法可以简单分为程序降温仪冷冻法和手工液氮熏蒸法。程序降温仪冷冻法降温步骤和降温速度可根据需要灵活设置,使精子细胞逐步适应低温环境,减少冷休克的发生。其优点是冷冻复苏效果相对稳定,减少人为因素影响,同时可以大批量冷冻。手工液氮熏蒸法根据降温步骤可以分为一步法、两步法和多步法。该方法操作简单快捷,不需要昂贵的仪器,但是降温速率不易控制,冷冻复苏效果不稳定^[16]。在液氮熏蒸法冷冻前,精液在 4℃ 下平衡 10 min 可提高精子

复苏率^[17]。程序冷冻法和液氮熏蒸法对精子的活力、形态、存活率和复苏率等参数的影响无显著性差异^[18-19],但是液氮熏蒸法可能对精子染色质的损伤较大,精液质量异常时影响更为严重^[20-21]。

常规的冷冻保存方法可采用塑料冻存管、麦管、注射器、安瓿和冷冻颗粒等载体。冻存管因其便于分装操作和标记,同时冻存的精液量也较大,所以临床应用最多。

对于重度少、弱精子症以及外科手术获取的附睾和睾丸精子等严重异常的精液标本,常规冷冻方法的冷冻复苏率和回收率往往很低^[22],为了获得较好的冷冻效果,可采用微量精子或单精子冷冻的方法^[23-25]。近年来,国内外关于微量精子冷冻的载体和方法研究很多^[26-29],并已有健康子代出生的报道^[30-31]。但其临床应用价值及不同储存载体的安全性和有效性仍需要更进一步的研究和证实^[32]。

冷冻过程中精子发生的一系列变化,也逆序表现在复苏的过程中。研究表明若慢速复温,可能在精液溶解前再次形成冰晶损伤精子,而快速复温则可避免这种损伤^[33]。关于精子冷冻复苏的方法有多种,多采用 37℃ 孵育,一般不超过 10 min^[5]。

共识建议 6: 自精保存冻存量

精液的冻存量与自精保存者的精液质量和预采取的助孕方式有关。对于可能会出现生育力丧失的自精保存者,在条件许可的情况下,尽量冷冻足够多的精子。

精液质量和将来的助孕方式决定了需要的冻存量(如冻存的份数及每份中精子的数量)^[8]。宫腔内人工授精(intrauterine insemination, IUI)妊娠率较低,可能需要较多的冻存量。而对于采取体外受精(in vitro fertilization, IVF)和卵胞浆内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)助孕的自精保存者,因周期妊娠率较高,可酌情减少精液保存量。《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)^[4]建议应储存可进行 10 次以上 IUI 的足量正常标本以确保妊娠。也有美国学者提出建议,对于患有肿瘤的自精保存者想要实现配偶最终怀孕的目的,至少应储存可进行 6 次 IUI,并同时保存 1~2 次以备后期进行 IVF 或 ICSI 治疗所需的标本^[8]。

对于可能会出现生育力丧失的自精保存者,在条件许可的情况下,尽量冷冻足够多的精子。对于

不能多次冻存精液者,每次冷冻时,建议至少分装 2 份以上。可以适当减少每份分装的体积、增加分装的份数,以提高后期辅助生殖治疗的成功率。

共识建议 7: 储存方法

使用气相液氮罐和全封闭冷冻载体密封储存自精标本,可能降低交叉污染的风险。根据病原学检查结果,冻存精子应分区分罐进行保存。同一自精保存者的多份冻存精子宜分罐保存,以降低全部意外损毁的风险。

冷冻精液标本的储存可采用液相液氮储存法或气相液氮储存法。两种方法复苏后精子的浓度、活力、形态、DNA 完整性、顶体酶和线粒体活性等参数均无显著差异^[34-36]。液相液氮储存法应用广泛,具有温度低、波动范围小等优点。但大多数病原微生物可以在液氮中存活,且已有证据表明采用开放式冷冻载体存在标本间交叉污染的可能^[37-38]。采取对液氮储存罐和程序降温仪进行定期消毒、对可能有病原微生物的精液进行分区分罐保存、选用封闭的冻存载体和气相液氮储存系统等措施,可有效降低交叉污染的风险^[39-41]。为了减少交叉污染,推荐有条件的机构使用气相液氮罐和全封闭冷冻载体密封储存自精保存的标本^[42]。同时根据病原学检查结果,对冻存精子分区分罐保存。如乙肝、丙肝、梅毒等,可以根据病原体类型进行分类储存。

如果自精保存者有 2 支及以上的冻存标本时,需要至少分两批放入不同的自精保存液氮罐中储存,以降低全部意外损毁的风险^[42]。

推荐有条件的机构在储藏室加装监控系统和液氮报警系统以保证液氮储存的安全性^[42-43]。

共识建议 8: 保存期限

保存时间可能不会影响精子质量。但从伦理角度考虑,自精保存期限不宜超过自精保存者的适宜生育年龄。

采用合适的方法冷冻储存,精子质量不会随保存时间延长而显著下降。国外一项回顾性研究分析了 72 家人类精子库液氮冻存 0.5~14.4 年的 2 525 份供精标本,发现不同冻存时间的精液标本在前向运动精子浓度(progressive motility concentration, PMC)上无显著性差异^[44]。有研究显示冷冻保存了 28 年的精液,复苏后精子仍保持良好的运动能力和透明带穿透能力^[45]。目前已有使用冻存了 28 年和 40 年的冷冻精液行 IUI 和 IVF/ICSI 助孕治疗,并

成功妊娠分娩的报道^[45-46]。但是,也有研究表明,随着冻存时间的延长,精子的膜蛋白和微管结构蛋白的损伤会加剧,进而影响精子存活率^[47]。国内最新的研究显示,使用冷冻精子的临床妊娠率、流产率和活产率并不受冻存时间的影响。但是冻存超过 5 年的精液标本,精子的活力和复苏率呈下降趋势,这可能与长期储存时冷冻精液反复暴露于室温有关^[48]。

因此,只要储存方法合适,保存时间并不会影响精子的质量和后期辅助生殖治疗的结局^[49],具体冻存时间可根据个人具体情况予以约定。但是从伦理角度考虑,自精保存者的精子冻存期限不宜超过其适宜的生育年龄。

共识建议 9: 标本使用和信息反馈

自精保存精子只能提供给具有实施辅助生殖技术相应资质的国内医疗机构,用于自精保存者妻子的辅助生殖技术治疗。实施辅助生殖技术的医疗机构冷冻保存的精子,原则上仅限于在本医疗机构使用。

自精保存精子只能提供给具有实施辅助生殖技术相应资质的国内医疗机构,用于自精保存者妻子的辅助生殖技术治疗。实施辅助生殖技术的医疗机构冷冻保存的精子,原则上限于在本医疗机构使用。

使用自精保存精子前实施机构必须确认使用者的身份,推荐采用身份证识别系统、指纹识别或面部识别等技术手段进行确认。

用精机构应及时向实施自精保存的机构反馈精液的使用情况和相关信息,如精液复苏结果、受精方式、妊娠结局、子代出生情况及健康随访等,并做详细记录和保存。

共识建议 10: 标本的销毁

自精保存者本人有权要求销毁自精保存标本。在保存到期后,保存机构可以按照《自精保存知情同意书》和《自精保存协议书》中约定的方式处理所冻存的标本。

自精保存者本人有权要求销毁保存的自精标本,销毁前应获得本人或其委托人的书面同意。

前期明确约定保存到期后处理方式为销毁的标本,保存机构可以直接销毁。对于前期约定保存到期后继续保存,但未续交保存费用者,应给予不少于 6 个月的宽限期。超过宽限期且通过预留的联系方

式无法联系到保存者时,自精保存机构可以按照《自精保存知情同意书》和《自精保存协议书》中约定,销毁所保存的标本。

对于下列特殊情况,冷冻机构应慎重销毁自精保存者的精液标本:

► 前期未明确约定到期后处理方式或处理方式存在争议的,应在取得保存者本人或其委托人的书面同意后再行处理;

► 对于自精保存者死亡的,保存机构在向保存者直系亲属说明所冻存的标本不能用于生育子代等相关规定后,可以按照《自精保存知情同意书》和《自精保存协议书》中约定,销毁所保存的标本;

► 对于涉及伦理问题的自精保存标本,应征得自精保存机构的生殖医学伦理委员会同意后方可销毁。

在销毁自精保存的精液标本时,应保留销毁的记录和证据,并长期妥善保存。

共识建议 11: 档案管理

实施自精保存技术的机构,应建立涵盖自精保存全部流程的档案管理制度,自精保存及其使用过程和结果应有确切全面的记录档案,档案保存期限应符合《医疗机构病历管理规定》。

实施自精保存技术的机构,应建立涵盖自精保存全部流程的档案管理制度,档案应包括但不限于以下资料:自精保存者身份信息、自精保存者前期检查结果、《自精保存知情同意书》、《自精保存协议》、精液冷冻复苏报告单、出入库登记表、交接单以及精液使用后的复苏结果、妊娠结局和子代随访情况等。档案的保存期限应符合《医疗机构病历管理规定》。建议逐步提高信息化和数字化管理能力,建立档案信息化管理系统或者自精保存信息化管理系统。

致谢:衷心感谢共识专家组成员唐文豪、岳焕勋、黄卫东以及中华医学会生殖医学分会第四届、第五届委员会生殖男科和精子库管理学组其他委员参与共识的讨论和修改。

【参 考 文 献】

- [1] 张军荣,姚康寿. 自精保存在生殖保险中的应用及研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2011,30:309-313.
- [2] 王奇玲,张洲,蒋祥龙,等. 我国人类精子库快速发展历程及成就[J]. 中国计划生育和妇产科,2021,13:3-5,9.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 人类精子库基本标准和技术规范

- [J]. 中国生育健康杂志, 2004, 15: 68-71.
- [4] 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等译. 人类精液检查与处理实验室手册[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [5] 陈振文 主编. 全国辅助生殖技术规范培训教材·辅助生殖男性技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [6] 中国男性生育力保存专家共识编写组. 中国男性生育力保存专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41: 191-198.
- [7] Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, et al. EAU guidelines on male infertility[J]. Eur Urol, 2005, 48: 703-711.
- [8] Nangia AK, Krieg SA, Kim SS. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients[J]. Fertil Steril, 2013, 100: 1203-1209.
- [9] Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9, 489 semen samples [J]. Fertil Steril, 2005, 83: 1680-1686.
- [10] Ayad BM, Van der Horst G, Du Plessis SS. Revisiting the relationship between the ejaculatory abstinence period and semen characteristics [J]. Int J Fertil Steril, 2018, 11: 238-246.
- [11] Lee J, Cha J, Shin S, et al. Influence of abstinence period on clinical outcomes in fresh embryo transfer after intracytoplasmic sperm injection [J]. Fertil Steril, 2015, 104: e292.
- [12] Lee JW, Cha JH, Shin SH, et al. Effect of the sexual abstinence period recommended by the World Health Organization on clinical outcomes of fresh embryo transfer cycles with normal ovarian response after intracytoplasmic sperm injection[J]. Andrologia, 2018, 50: e12964.
- [13] Marshburn PB, Alanis M, Matthews ML, et al. A short period of ejaculatory abstinence before intrauterine insemination is associated with higher pregnancy rates[J]. Fertil Steril, 2010, 93: 286-288.
- [14] Periyasamy AJ, Mahasampath G, Karthikeyan M, et al. Does duration of abstinence affect the live-birth rate after assisted reproductive technology? A retrospective analysis of 1,030 cycles[J]. Fertil Steril, 2017, 108: 988-992.
- [15] 中华医学会生殖医学分会. 生育力保存中国专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30: 1129-1134.
- [16] 李玉山, 王全先, 高学敏, 等. 程序冷冻法、液氮蒸汽法冷冻人类精子的效果比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18: 1814-1815.
- [17] 王亚楠, 邹沙沙, 肖倩, 等. 冷冻前平衡处理对人精子冻融后相关参数的影响[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19: 886-889.
- [18] Paras L, Freisinger J, Esterbauer B, et al. Cryopreservation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing [J]. Andrologia, 2008, 40: 18-22.
- [19] Shen S, Navarette M, Wong C, et al. A prospective study of programmable freezer vs. nitrogen vapor sperm cryopreservation techniques[J]. Fertil Steril, 2001, 76: S120.
- [20] Hammadeh ME, Dehn CH, Hippach M, et al. Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men[J]. Int J Androl, 2001, 24: 66-72.
- [21] Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T, et al. Andrology: evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques [J]. J Assist Reprod Genet, 2001, 18: 364-370.
- [22] Endo Y, Fujii Y, Shintani K, et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa [J/OL]. Reprod Biomed Online, 2012, 24: 301-307.
- [23] AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, et al. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15: 153-164.
- [24] Paffoni A, Palini S. There is another new method for cryopreserving small numbers of human sperm cells[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(Suppl 1): S17.
- [25] Huang C, Gan RX, Hu JL, et al. Clinical benefit for cryopreservation of single human spermatozoa for ICSI: A systematic review and meta-analysis[J]. Andrology, 2022, 10: 82-91.
- [26] Huang C, Gan RX, Zhang H, et al. Novel micro-straw for freezing small quantities of human spermatozoa[J]. Fertil Steril, 2020, 114: 301-310.
- [27] Berkovitz A, Miller N, Silberman M, et al. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device[J]. Hum Reprod, 2018, 33: 1975-1983.
- [28] Luo XF, Huang C, Ji XR, et al. Micro-straw: An efficient cryopreservation carrier for rare human spermatozoa [J]. Andrology, 2022, 10: 710-719.
- [29] Belenky M, Itzhakov D, Freger V, et al. Optimizing the protocol for vitrification of individual spermatozoa by adjusting equilibration time[J]. Syst Biol Reprod Med, 2020, 66: 223-228.
- [30] Sun J, Chen W, Zhou L, et al. Successful delivery derived from cryopreserved rare human spermatozoa with novel cryopiece[J]. Andrology, 2017, 5: 832-837.
- [31] Herbeumont C, Mnallah S, Bennani-Smires B, et al. Cryopreservation of small numbers of human spermatozoa in a Stripper tip: Report of the first live-birth worldwide [J]. Cryobiology, 2021, 99: 103-105.
- [32] Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2020, 18: 1-12.
- [33] Huang C, Tang YL, Hu JL, et al. Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa[J]. Asian J Androl, 2022, 24: 563-569.

- [34] Hu J, Zhao S, Xu C, et al. Liquid nitrogen vapor is comparable to liquid nitrogen for storage of cryopreserved human sperm; evidence from the characteristics of post-thaw human sperm[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104: 1253-1257. e2.
- [35] Lim JJ, Shin TE, Song SH, et al. Effect of liquid nitrogen vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen-thawed human spermatozoa[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94: 2736-2741.
- [36] Punyatanasakchai P, Sophonsritsuk A, Weerakiet S, et al. Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen; effect on motility parameters, morphology, and sperm function[J]. *Fertil Steril*, 2008, 90: 1978-1982.
- [37] Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices[J]. *Theriogenology*, 2012, 77: 467-482.
- [38] Clarke GN. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14: 2941-2943.
- [39] Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24: 2457-2467.
- [40] Joaquim DC, Borges ED, Viana IGR, et al. Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1840417.
- [41] 吴颖, 姚康寿. 人类精子冷冻保存中交叉污染的风险及防范[J]. *中华男科学杂志*, 2010, 16: 55-59.
- [42] 中国妇幼保健协会辅助生殖技术监测与评估专业委员会精子库与生殖男科学组专家共识工作组. 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: 6-11, 19.
- [43] Tomlinson M. Managing risk associated with cryopreservation[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20: 1751-1756.
- [44] Yogev L, Kleiman SE, Shabtai E, et al. Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25: 1097-1103.
- [45] Clarke GN, Baker HWG. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86: 721-722.
- [46] Szell AZ, Bierbaum RC, Hazelrigg WB, et al. Live births from frozen human semen stored for 40 years[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30: 743-744.
- [47] Feldschuh J, Brassel J, Durso N, et al. Successful sperm storage for 28 years[J]. *Fertil Steril*, 2005, 84: 1017. e3-e4.
- [48] Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, et al. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85: 1744-1752.
- [49] Huang C, Lei L, Wu HL, et al. Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes[J]. *Fertil Steril*, 2019, 112: 663-669. e1.

[编辑: 罗宏志]