	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES		Código	
			PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

1. OBJETIVO

Lograr preservar espermatozoides por tiempo indefinido para ser usados posteriormente en técnicas de reproducción asistida de baja o alta complejidad.

2. ALCANCE

Desde la obtención de la muestra hasta la disposición definitiva en el tanque de almacenaje

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo va orientado para el personal que labora en el laboratorio de Andrología

4. RESPONSABLE

Embriología

5. DEFINICIONES:

Donante: La congelación de semen donado tiene como objetivo viabilizar procedimientos de inseminación o reproducción asistida (FIV o ICSI), en parejas o pacientes.

Preservación de fertilidad: Este procedimiento está dado para pacientes que de forma preventiva deseen guardar su semen, por temor a perder la capacidad reproductiva por alguno de los siguientes motivos:


- Paciente previo a vasectomía
- Paciente previo a una cirugía que pueda comprometer su función reproductiva
- Paciente previo a tratamiento oncológico
- Paciente con alto grado de riesgo profesional
- Paciente expuesto a medio ambiente tóxico o carcinógeno

Depósito por tratamiento: Servirá para aquellos pacientes que necesitan guardar muestras de semen, biopsia testicular o punción de epidídimo para ser usadas posteriormente en tratamientos de fertilidad en su pareja:

- Pacientes que no pueden asistir el día del procedimiento para dejar la muestra para el tratamiento
- Pacientes con disfunciones sexuales o problemas anatómicos que impiden una adecuada función reproductiva
- Pacientes con azoospermia obstructiva y en cuyo caso se han practicado biopsia testicular como fuente de los gametos masculinos para el procedimiento de microinyección ICSI

6. MATERIALES

- Microscopio de luz
- Balanza analítica

	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES		Código	
			PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9


- Ollas para realizar el procedimiento de congelación (ver procedimiento)
- Tanque de reserva de nitrógeno líquido
- Tanque de alta capacidad para almacenaje de muestras congeladas
- Escalerillas
- Visotubos
- Sellador a calor
- Pajillas de 0.5 y 0.25
- Pinzas para agarrar productos congelados
- Guantes criogénicos
- Tubos cónicos de centrifuga estériles
- Marcador para ultra fríos
- Cubetas de acetato para mezcla de semen
- Medio para congelar semen (ver preparación)
- Nitrógeno líquido
- Incubadora a 37°C
- Nevera vertical con congelador para almacenar el medio crioprotector
- Pipetas estériles de 1, 5, 10 ml
- Centrifuga con velocidad y tiempo variable
- Cámara de Makler
- Laminas
- Laminillas
- Pipetas pasteur
- Puntas amarillas estériles
- Pipetas automáticas variables de 10,100 microlitros
- Adaptador para pipetas pasteur
- Cronómetro
- Frasco para toma de muestra
- Kit Hygene (Si es necesario)
- Medio G-MOPS plus si se realiza biopsia testicular o punción de epidídimo
- Sperm CryoProtec (NIDACOM)
- Jeringas de insulina para disecar la biopsia
- Caja de Petri 30 x 15 para recoger biopsia
- Cámara de Flujo laminar
- Microscopio Estereoscopio
- Microscopio invertido

7. TIPO DE MUESTRA:

- Muestra de semen de donante o pacientes que requieran autoconservar
- Biopsias testiculares

8. PROCEDIMIENTO:

Si la muestra a congelar es de semen se deben tener en cuenta todas las indicaciones para la obtención de la muestra. Solamente se debe realizar morfología espermática en la primera muestra de autoconservación y en el examen de espermograma inicial para

	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES		Código	
			PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

selección de donante, para el resto de las muestras se analizará: Volumen, Cantidad, Movilidad y Vitalidad.

Teniendo la muestra en el laboratorio, es analizada y su resultado se ingresa en la hoja de Informe Congelación de Semen, si la muestra va con espermograma incluido se diligencia el reporte de espermograma.

Una vez analizada la muestra, con la ayuda de una pipeta graduada estéril se toma la totalidad del eyaculado y se deposita en la cubeta de acetato. Sacar el medio de congelación de la nevera y adicionar en proporción 1:2 Sperm Cryoprotec con la muestra de semen, gota a gota mezclando suavemente. Esta mezcla se dejará actuar por 30 minutos a temperatura de 2 a 8 °C, durante los cuales cada 3 minutos se homogeneizará muy bien muestra y medio. Mientras tanto las pajillas de 0.5 (en caso de semen) o 0.25 (en caso de biopsia testicular) se etiquetan con Cryolabel que han sido marcados con marcadores para ultrafríos; **que en el caso de donante** se marcará: código alfa numérico que consiste en primer nombre y dos apellidos, seguido de número consecutivo y las letras DS, ej: S.H.J. 001-DS, fecha de congelado, grupo sanguíneo y nombre de la institución; para pacientes (autoconservación o biopsias testiculares), la pajilla será marcada con un código alfa-numérico que consiste en el primer nombre y dos apellidos, seguido del número consecutivo y las letras PS, ej: S.H.J. 001-PS, fecha de la congelación y nombre de la institución (Fig. 1 y 2)




Fig. 1 Cubeta con mezcla de muestra y crioprotector



Fig. 2 Pajilla etiquetada con cryolabel

Faltando 5 minutos, se debe empezar a enfriar el sistema de ollas de congelación con el nitrógeno líquido, añadiendo hasta que el nivel llegue al orificio lateral de la olla menor (figs.4,5,6).

	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES	Código PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia 11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

Olla mediana, en ella va contenida la menor

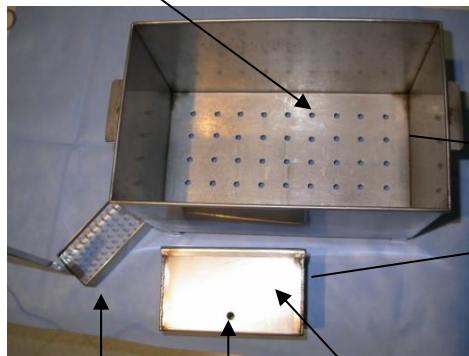


Fig. 4

Plataforma

Olla menor

Orificio lateral
(nivel max. de
Nitrógeno)

Ambas ollas se colocan dentro de la mayor

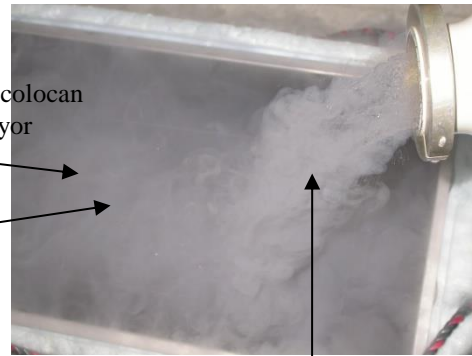


Fig. 5

Enfriamiento del sistema con
Nitrógeno líquido

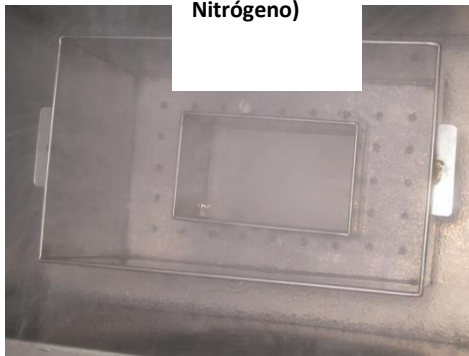


Fig. 6 Sistema de ollas enfriado

Cinta para marcar escalerilla

Marcador para ultrafrío

Cubeta para mezclar
muestra y medio
Ackerman

Peine

Cryolabel para etiquetar
pajillas

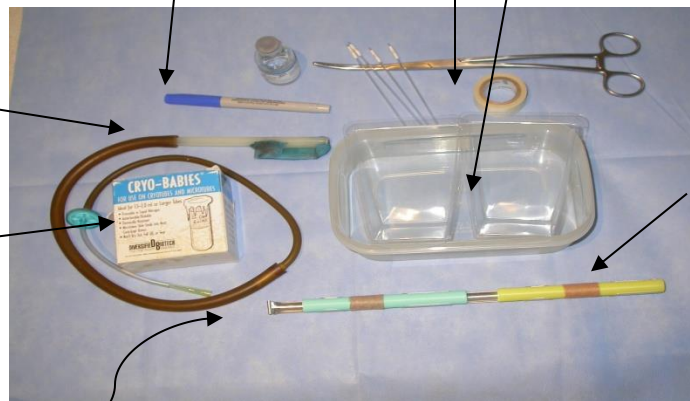



Fig. 7 Distintos materiales usados en la

congelación

Escalerilla

	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES	Código PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia 11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

Antes de terminar el tiempo, se colocan las pajillas en el peine (Fig. 7) y se inicia el llenado de las mismas dejando un pequeño espacio sin muestra, luego del cual retira la pajilla de la mezcla y termina de aspirar para que este vacío quede al otro extremo de la pajilla y sirva para poder sellarlas a calor (figs. 8,9).

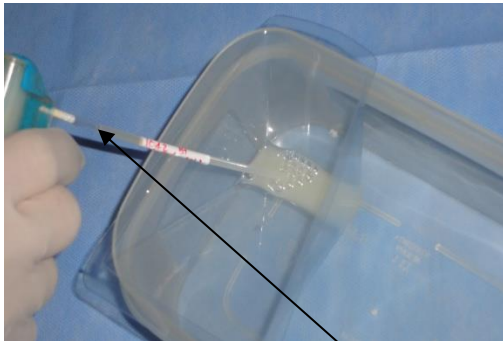


Fig 8 Cargado de pajilla

Espacio sin muestra



Fig. 9 Sellado de la pajilla

Una vez cargadas y selladas todas las pajillas, se colocan de forma vertical en la plataforma, introduciendo el extremo con el tapón de fábrica en el orificio (fig.10), ésta se dejará en la olla menor, y al entrar en contacto con el nitrógeno se producirá un jet de vapores que hará una curva de congelación rápida hasta -150°C durante 30 minutos, dejando cerrada la olla mayor durante este tiempo (fig.11).




Fig. 10 Colocación de pajillas llenadas en plataforma
plataforma en olla menor



Fig. 11 Colocación de

Entretanto se marcarán las escalerillas, colocando una cinta para ultrafríos (fig. 7) en el extremo superior, marcando el código y la fecha de la congelación (fig.12). Una vez culminado el tiempo de congelación, se sacan las pajillas de la plataforma con una pinza y se colocan en contacto directo con el nitrógeno líquido lo más rápido posible evitando cambios de temperatura, asimismo la escalerilla se coloca en contacto con el nitrógeno (fig.13). A continuación cada pajilla se coloca en el globet (fig. 7) iniciando por la parte inferior de la escalerilla (esta acción debe ser muy rápida para evitar cambios bruscos de temperatura), ésta se deja nuevamente en contacto con el nitrógeno líquido (fig.14), para

	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES	Código PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia 11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

que en seguida sea colocada en el tanque de alta capacidad, en el nivel, cuadrante y SUC, que se haya determinado previamente para cada muestra, luego de haber registrado la información según el Proceso para control de ingreso y egreso de muestras criopreservadas del tanque de almacenamiento

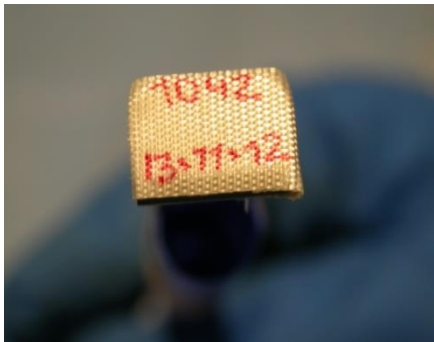


Fig. 12 Marcación de escalerilla

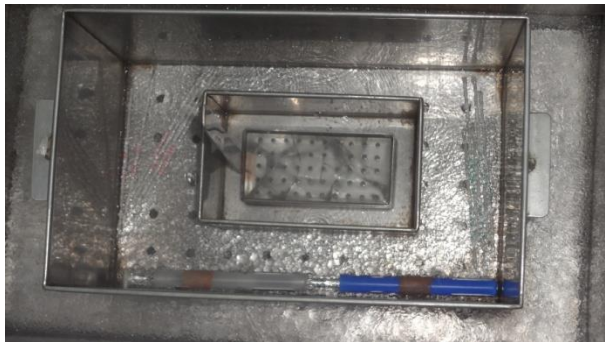


Fig. 13. Contacto directo de pajillas con nitrógeno

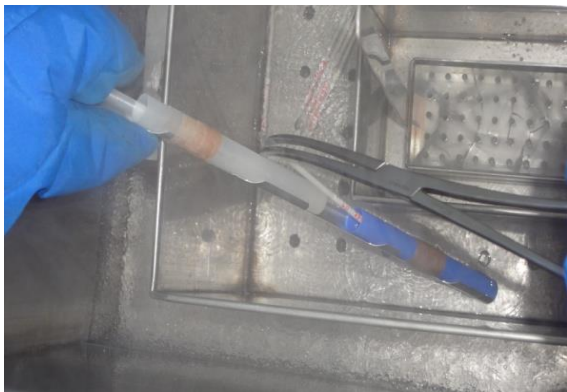
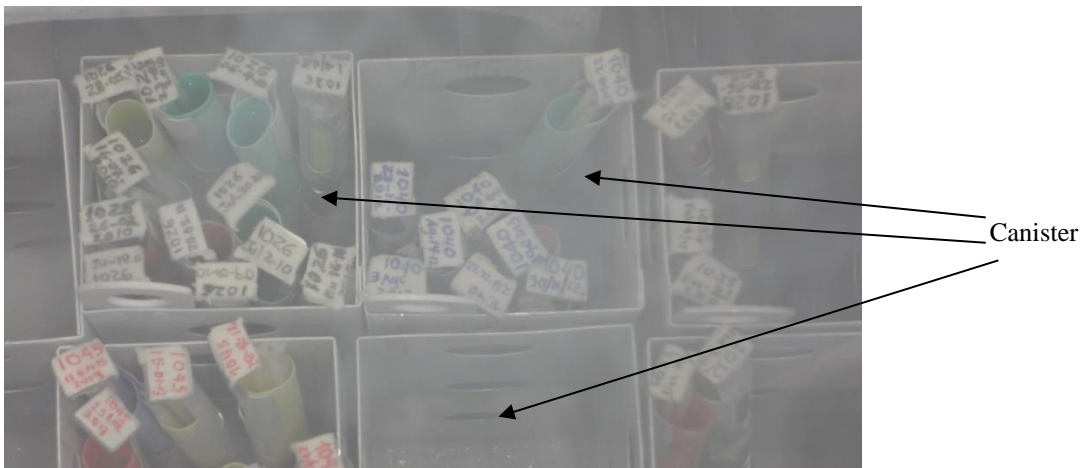



Fig. 14 Colocación de pajillas en escalerilla

Fig. 15 Tanque del almacenamiento



	CRIOPRESERVACION DE SEMEN Y BIOPSIAS TESTICULARES		Código	
			PS-DC-006	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 9

9. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL:

- Vestido cirugía
- Gorros
- Polainas
- Guantes de protección para ultrafríos
- Gafas de protección

10. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES:

- No iniciar proceso de estabilización de la muestra con el Crioprotector si no se tienen todos los elementos necesarios para el procedimiento
- No cargar ninguna pajilla con la mezcla de semen y Crioprotector si existe tachaduras, enmendaduras, o ilegibilidad en la demarcación de la misma
- No almacenar ninguna pajilla, si por accidente estuvo previamente en contacto con el nitrógeno líquido
- No almacenar ninguna pajilla si no ha sellada de manera adecuada
- Descartar la muestra si existe alguna duda sobre la identidad de la misma

11. CONTROL DE CALIDAD:

- Todo el manejo de cargada de las pajillas se deberá realizar bajo la cabina de flujo laminar del Laboratorio de Andrología
- Siempre tener la cantidad suficiente de nitrógeno en reserva para el proceso de la congelación
- Trabajar de manera aséptica y guardando el proceso de seguridad frente al manejo de nitrógeno líquido