

Université Pierre et Marie Curie

Paris 6

MEMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICAL »

FORMATION ET HABILITATION DU PERSONNEL EN SPERMIOLOGIE :

EXEMPLE DE LA MOBILITE SPERMATIQUE

Note au lecteur

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.

FINET Astrid

Fonction : Interne 8^{ème} semestre en Biologie Médicale, spécialité biologie de la reproduction, puis à partir de mai 2013, Biologiste médicale.

Lieu d'exercice pendant le DU : Hôpital Cochin, puis dans un laboratoire privé de biologie de la reproduction du centre d'Assistance Médicale à la Procréation de la Clinique Mathilde à Rouen.

Remerciements :

Merci au Professeur Jean-Philippe Wolf pour m'avoir accueilli dans son stage et permis de réaliser ce projet au sein de son service.

Merci à Virginie Barraud-Lange pour m'avoir accompagnée dans ce mémoire avec intelligence, disponibilité et enthousiasme. Merci pour ton soutien, ton professionnalisme, et ton humilité (un exemple pour tous) lors de ce dernier semestre d'internat ainsi que pendant la rédaction du mémoire.

Merci à Jacques Auger pour m'avoir encouragé et aidé à acquérir de belles images de mobilité spermatique. Merci pour votre aide et disponibilité pour les statistiques ainsi que pour votre enthousiasme pour ce projet.

Merci à Brigitte et à Martine pour leur soutien qui m'a permis d'appliquer et d'intégrer les idées du projet au sein du personnel du service.

Merci à Céline Chalas et Véronique Drouinaud, Khaled Pocate, et Emmanuel Dulioust, pour avoir libéré leurs techniciens pour réaliser les mobilités spermatiques, et pour les avoir réalisées aussi !

Merci à tous les techniciens et biologistes du service de BDR de Cochin qui ont réalisé les épreuves de mobilité spermatique. Merci à Laetitia pour avoir réalisé ses 30 mobilités initiales, et merci à Colette, Caroline, Véronique, Jacques, et Françoise pour l'avoir encadrée.

Merci à Ahmed Ziyat pour son aide et sa disponibilité pour réaliser les vidéos au sein de son laboratoire.

Merci au service du Professeur Catherine Patrat à l'Hôpital Bichat pour avoir participé à la lecture des films de mobilité spermatique avec autant de professionnalisme, d'enthousiasme et de rapidité.

A mes hommes, François-Edouard, Henry et Edward, pour votre soutien et votre affection.

Table des matières

Liste des Abréviations.....	5
Introduction.....	6
Contexte Actuel.....	6
Le Spermogramme.....	6
L'Accréditation d'une méthode manuelle en portée A.....	7
Le Laboratoire d'Histologie-Embryologie Biologie de la Reproduction du Groupe Hospitalier Cochin.....	7
Objectif.....	10
Matériels et Méthodes.....	10
Maîtrise de la formation Initiale en spermiologie.....	10
Maintien des compétences.....	12
Application du plan de formation-habilitation à la lecture de la mobilité spermatique.....	13
<i>Formation initiale théorique à l'évaluation de la mobilité spermatique :</i>	13
<i>Formation initiale pratique à l'évaluation de la mobilité spermatique:</i>	13
<i>Epreuve Technique de la Formation Initiale à l'évaluation de la mobilité spermatique</i>	13
<i>Maintien des compétences à l'évaluation de la mobilité spermatique</i>	14
Statistiques.....	14
Résultats.....	16
Epreuve Technique d'habilitation Initiale en mobilité spermatique.....	16
Epreuve de CQI.....	17
Analyse du CQI par un laboratoire de spermiologie dit de référence.....	21
Discussion.....	23
Conclusion.....	25
Annexes.....	27
Références.....	35

Liste des Abréviations

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

CASA: Computer assisted sperm analyzer (analyseur informatique de spermatozoïdes)

CECOS : Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humain

FIV: fécondation in vitro

ICSI : Injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde

IU: insemination intra-utérine

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

TMS : test de migration-survie

Introduction

Contexte Actuel

L'OMS estime que l'infertilité toucherait entre 8 et 12% des couples en âge de procréer, soit entre 50 et 80 millions de personnes dans le monde (WHO, 1991). En France, la prévalence de l'infertilité se situe aux alentours de 14% puisqu'on estime qu'un couple sur sept consulte pour un problème de fertilité durant sa vie (Thonneau et al, 1991). Les causes d'infertilité peuvent être féminines, masculines, ou mixtes.

La prise en charge de couples en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) débute par une recherche de l'origine de l'infertilité. La détermination de la cause d'une infertilité chez un homme revêt un triple intérêt diagnostique, thérapeutique et pronostique. Le diagnostic, outre l'avantage psychologique pour le patient de connaître les raisons de son infertilité, évite l'errance médicale que beaucoup d'entre eux connaissent en allant d'un laboratoire à un autre et diminue la prescription d'examens complémentaires inutiles. Un diagnostic correct permet également le choix d'une thérapeutique appropriée (insémination intra-utérine, fécondation in vitro (FIV) avec ou sans micro-injection (ICSI), pertinence d'une biopsie testiculaire, don de sperme, recours à l'adoption) et permet de mesurer un risque éventuel pour la descendance.

L'examen des paramètres spermatiques constitue l'élément de base du bilan chez un homme infertile. Il comprend classiquement le spermogramme-spermocytogramme mais il doit être complété par un test de migration-survie et une spermoculture, avant mise en route d'une éventuelle AMP.

Le Spermogramme

Le spermogramme-spermocytogramme, examen prescrit en première intention dans le bilan d'infertilité, comprend une analyse qualitative et quantitative des paramètres spermatiques à l'état frais (spermogramme) et l'analyse morphologique (spermocytogramme) à partir d'un frotti coloré. L'analyse des paramètres du spermogramme-spermocytogramme tel le volume, le pH, la viscosité, la mobilité, la concentration, la vitalité et la morphologie, est encore réalisée dans de nombreux laboratoires, par des méthodes manuelles, de type qualitatives ou quantitatives. Pour ces techniques manuelles, l'analyse est dépendante de l'observateur.

La formation initiale et continue du personnel en spermologie est donc un élément essentiel de la qualité d'évaluation des paramètres spermatiques et de la justesse du rendu des résultats.

L'Accréditation d'une méthode manuelle en portée A

Dans le SH GTA 04 il est décrit que les laboratoires de biologie Médicale (LBM) engagés dans une démarche d'accréditation COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189, et voulant *adopter une* méthode reconnue (*portée A*) sont soumis à une *vérification des performances de la méthode adoptée*. « Cette vérification confirme au laboratoire la validité des résultats obtenus ("aptitude à l'emploi"), par rapport à ses propres besoins... Dans le cadre des normes NF EN ISO 15189 & 22870, le LBM doit, pour ses méthodes, vérifier qu'elles sont utilisées dans leur domaine d'application, qu'elles correspondent aux besoins de ses clients (patients/prescripteurs) et qu'elles sont maîtrisées au sein du laboratoire (« vérification de méthodes – portée A »). Beaucoup de facteurs peuvent affecter les performances d'une méthode comme par exemple..., la compétence (« habileté, dextérité ») de l'utilisateur (par ex méthodes manuelles). »

La vérification des performances d'une méthode qualitative en portée A sur site est très réduite et « s'appuie fortement sur l'étude des performances des Evaluations Externes de la Qualité, sur des études de risques (méthode des 5M), ou encore sur la qualification des opérateurs. »

Le Laboratoire d'Histologie-Embryologie Biologie de la Reproduction du Groupe Hospitalier Cochin

Le Service d'Histologie-Embryologie Biologie de la Reproduction de l'AP-HP Groupe Hospitalier Cochin se situe au sein du Pôle de Biologie, Pharmacie, Pathologie. Le Pôle est entrée dans une démarche d'accréditation ISO 15189 depuis plusieurs années et d'ici 2016 devra être accrédité sur 50% des analyses de biologie et 100% des analyses d'ici 2018. Le service d'Histologie-Embryologie Biologie de la Reproduction est donc concerné par cette démarche d'accréditation ISO 15189.

Le service d'Histologie-Embryologie Biologie de la Reproduction comprend trois domaines d'activité. Le CECOS, Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humain, sur le versant masculin de son activité, prend en charge tous les patients nécessitant une autoconservation de leurs spermatozoïdes avant un traitement stérilisant, ou lors d'une dégradation des paramètres spermatiques, ainsi que les patients ayant recours à une biopsie testiculaire. De plus, le service prend

en charge les patients donneurs et donneuses de gamètes, ainsi que les couples demandeurs de don de gamètes. Le laboratoire du CECOS procède à la congélation de spermatozoïdes obtenus par un recueil simple, où après biopsie testiculaire. Il est également responsable de la conservation des échantillons congelés.

Le deuxième domaine d'activité concerne le secteur d'andrologie qui accueille les patients venant pour analyses de sperme. Le laboratoire d'andrologie réalise l'analyse de différents examens de sperme, tel le spermogramme-spermocytogramme, le TMS, la recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes, la recherche de spermatozoïdes dans les urines, et la mesure de la fragmentation d'ADN spermatique.

Enfin, le troisième domaine comprend le secteur d'AMP qui permet une prise en charge thérapeutique de l'infertilité des couples. Le laboratoire effectue toutes les techniques d'AMP, telles que les inséminations intra-utérines (IIU), les fécondations in vitro avec (ICSI) et sans (FIV) micro-injection de spermatozoïdes. La plupart des techniques d'AMP comprennent une étape de préparation de sperme ou de paillettes de spermatozoïdes congelés, notamment pour les IIU, les FIV et les ICSI.

Tous les trois domaines d'activité du service exécutent dans leurs laboratoires respectifs l'analyse des paramètres spermatiques à but diagnostique et/ou thérapeutique. La formation et l'habilitation du personnel aux techniques manuelles utilisées par les trois secteurs sont donc essentielles afin de rendre non seulement des résultats harmonieux entre les différents secteurs, mais aussi des résultats justes. Une formation idéale du personnel serait une où chaque technicien ou biologiste lecteur des paramètres spermatiques rendrait les mêmes résultats pour un même échantillon donné à tous les lecteurs.

La formation initiale des nouveaux techniciens novices du service de Cochin débutait par un entretien avec le Biologiste référent de leur secteur pour expliquer l'intérêt et l'importance de la bonne lecture des paramètres spermatiques. Les ressources documentaires étaient consultables au laboratoire d'andrologie. Enfin, une formation auprès des différents techniciens « experts » occupant leurs postes depuis plusieurs années était faite par observation simple des différentes techniques d'analyse des paramètres spermatiques. Puis le technicien « novice » faisait en double les analyses réalisés par un technicien « expert », avec utilisation des mêmes échantillons et en même temps, en comparant ses résultats au technicien expert, jusqu'à obtention de résultats semblables à répétition (sans précision de combien d'échantillons avaient été lus, ni de l'écart tolérable entre les deux lecteurs). Aucune habilitation n'était en place pour la formation initiale.

Pour le maintien des compétences, un contrôle de qualité interne été réalisé une fois par an. Il consistait à réunir tous les techniciens des 2 secteurs (15 personnes au total), en même temps. Les techniciens analysaient en même temps, et chacun sur un microscope, les mêmes échantillons de sperme qui avaient été fractionnés. Les différents paramètres obtenus par les techniques manuelles du spermogramme (concentration, mobilité, vitalité) étaient rassemblés sur un fichier excel pour ensuite en déduire la moyenne et l'écart type des différents paramètres spermatiques des échantillons. Des écarts trop importantes de la moyenne pour chaque technicien et chaque secteur étaient recherchés puis suivis d'une correction des erreurs analytiques et/ou pré-analytiques, par des moyens non-systématisés et dépendants des paramètres concernés.

La façon dont été réalisé le maintien des compétences avait comme avantage d'être réalisé en même temps par tous les lecteurs les paramètres spermatiques. En théorie ceci fait que tous les lecteurs analysaient les mêmes spermatozoïdes qui n'avaient pas eu le temps de perdre leur mobilité ni de leur vitalité dans le temps. En revanche, cette technique dissociait deux étapes fondamentales aux analyses : l'étape pré-analytique et l'étape analytique.

En spermiologie, l'étape pré-analytique est critique. Les étapes d'homogénéisation et de pipettage des échantillons de sperme permettent une bonne lecture des paramètres du spermogramme car le sperme, après liquéfaction, n'est pas homogène et une viscosité importante peut rendre le pipettage difficile. Il est donc important de vérifier l'exécution des étapes pré-analytiques du spermogramme. Mais même en cas d'exécution correcte des étapes pré-analytiques, les paramètres spermatiques peuvent ne pas être homogènes d'un champ microscopique à un autre. Le fractionnement des échantillons n'assure donc pas une homogénéité des différents champs lus au microscope par les lecteurs lors du contrôle de qualité interne. De plus, il est difficile de déduire par ce contrôle de qualité si les lecteurs ont bien réalisés les étapes préanalytiques, et les étapes analytiques. Ce contrôle de qualité nécessitait aussi une disponibilité de tout le personnel technique en même temps, ce qui demandait une réorganisation compliquée de l'activité de routine et des plannings du personnel.

C'est pour ces différentes raisons qu'il a été décidé d'instaurer un nouveau plan de formation-habilitation du personnel pour les analyses spermatiques réalisées dans les trois secteurs d'activité dans le service d'histologie-embryologie biologie de la reproduction à l'hôpital Cochin.

Objectif

L'objectif de ce projet était de maîtriser la formation initiale et le maintien des compétences du personnel du laboratoire, ainsi que de mettre en place une procédure d'habilitation commune aux trois secteurs du service concernant les analyses spermatiques communes. Le choix du paramètre sur lequel porterait le travail du projet s'est fait sur l'analyse de la mobilité spermatique.

Matériels et Méthodes

Maitrise de la formation Initiale en spermiologie

Pour le plan de formation initial des nouveaux techniciens, internes, ou biologistes du service, une réunion de deux des trois responsables (dont le responsable du secteur andrologie) de leur secteur a eu lieu afin de définir les points importants de la formation initiale. Une formation dite « théorique » ainsi qu'une formation « pratique » a été précisée avec création d'une grille d'habilitation commune pour la formation initiale.

La formation initiale suivante a été créée :

1. Formation théorique : Entretien personnalisé de spermiologie avec le biologiste référent (Dr E. Dulioust). Explications suivantes plus ou moins en détail en fonction de l'expérience du technicien:
 - a. Le service et les différents secteurs.
 - b. Les différents examens pratiqués au laboratoire d'andrologie, au CECOS, et en AMP.
 - c. Utilité, indication, de l'examen de spermiologie.
 - d. Le sperme et les spermatozoïdes : brève introduction.
 - e. Intérêt et précautions préanalytiques.
 - f. Références bibliographiques à connaître : document BIOFORMA en ligne.
2. Formation pratique : Dans le laboratoire d'andrologie
 - a. OBSERVER: Le nouveau technicien observe un technicien habilité qui lui explique chacune des étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques en temps réel : 10 spermogramme-spermocytogrammes minimum sont requis.

Concernant l'étape analytique, la formation pratique de lecture de la mobilité, la vitalité, la concentration, et la morphologie s'opère grâce à l'utilisation d'un microscope multi-tête et d'une caméra installée sur le microscope permettant une observation simultanée des échantillons de sperme du jour.

b. APPRENDRE A FAIRE: Le technicien novice réalise au moins 10 spermogrammes/spermocytogrammes en parallèle d'un technicien expert dans une unité de lieu et de temps. Les résultats sont comparés en temps réel. Cette étape est l'occasion pour le novice de poser des questions, de tester son niveau de compréhension et sa capacité de réalisation.

c. Le passage à l'étape suivante, l'épreuve d'habilitation technique initiale, se fait une fois que le technicien expert estime que les critères suivants chez le technicien novice sont acquis:

Savoir homogénéiser un prélèvement de sperme.

Savoir pipetter et calculer le volume spermatique.

Savoir réaliser un frottis.

Savoir préparer une lame pour lecture de la mobilité.

Savoir reconnaître et estimer les différents types de mobilités (a,b,c,d).

Savoir reconnaître des agglutinats et amas.

Savoir calculer et réaliser une dilution.

Savoir compter les spermatozoïdes et cellules sur une cellule de thomas.

Savoir préparer une vitalité avec le kit éosine-nigrosine.

Savoir reconnaître un spermatozoïde vivant et un spermatozoïde mort.

Savoir reconnaître un spermatozoïde typique et atypique.

Reconnaître les anomalies morphologiques spermatiques.

3. Epreuve d'habilitation technique initiale : FAIRE

a. Technique en aveugle de 30 spermatozoïdes avec évaluation de tous les paramètres spermatiques compris dans le spermogramme-spermocytogramme. Il est également possible d'analyser un paramètre à la fois : exemple, faire une mobilité spermatique sur 30 échantillons, puis faire la concentration sur 30 autres échantillons...

b. Comparaison avec technicien habilité ayant réalisé les mêmes paramètres des mêmes spermatozoïdes au même moment.

c. Calcul de l'écart entre les deux techniciens. Réalisation d'un test de Wilcoxon apparié selon les recommandations du manuel de référence Bioforma. Si $p > 0,05$, il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les lecteurs et l'épreuve ainsi que la formation sont validées.

- d. Si $p < 0,05$, il existe une différence entre les lecteurs ce qui est non-acceptable. Dans ce cas, le technicien novice doit refaire une formation pratique, suivi d'une épreuve d'habilitation technique jusqu'à validation de l'épreuve.

La grille d'habilitation se trouve en annexe 1. L'habilitation initiale est validée par le responsable biologique du secteur quand tous les critères de la grille d'habilitation ont été validés. Une validation complète de tous ces critères valide le technicien novice pour techniquer et rendre seul les résultats des spermogrammes/spermocytogrammes.

Il a été décidé qu'une absence de plus de 6 mois consécutifs ou l'arrivée d'une personne déjà habilitée (exemple : technicien venant d'un autre centre, internes spécialisés en BDR) nécessiteraient une formation raccourcie. Celle-ci consiste en l'observation de 5 spermogrammes/spermocytogrammes, la réalisation en parallèle de 5 spermogrammes sous contrôle d'un technicien déjà habilité, suivies de la réalisation du dernier CQI (voir paragraphe maintien des compétences). Leur grille d'habilitation se trouve en annexe 1. En cas de valeurs de CQI en dehors des limites d'acceptabilité, une formation et habilitation initiale sont obligatoires.

Maintien des compétences

La grille d'habilitation du personnel déjà en poste à la création du projet ou après obtention de l'habilitation initiale se trouve en annexe II.

Les critères d'habilitation continue sont les suivants :

1. la réalisation de CQI une fois par an, avec ou sans mesures correctrices (épreuve de remise à niveau) en fonction des résultats (conditions de validation et mesures correctrices spécifiques à chaque paramètre spermatique concerné)
2. l'analyse d'au moins 10 échantillons de sperme par mois,
3. l'absence de congé de plus de 6 mois, ou une formation raccourcie effectuée à défaut.

Seuls les paramètres spermatiques qui sont utilisés dans le secteur où travaille la personne sont pris en compte. Par exemple, au laboratoire FIV, seuls la concentration et la mobilité spermatique sont critiques aux techniques d'AMP employées. Donc le personnel du laboratoire FIV est habilité s'il analyse plus de 10 concentrations et mobilités spermatiques par mois ainsi que s'il valide les CQI concernant ces deux paramètres seulement.

Application du plan de formation-habilitation à la lecture de la mobilité spermatique

Nous avons choisi d'appliquer les nouvelles formations initiales et le maintien des compétences à la lecture de la mobilité spermatique. L'arrivée d'une nouvelle technicienne au sein du laboratoire du CECOS, au moment de la construction de ce projet nous a permis d'appliquer le projet de formation-habilitation initiale.

Formation initiale théorique à l'évaluation de la mobilité spermatique :

La technique de lecture de la mobilité spermatique utilisée dans le laboratoire de Cochin est une technique manuelle qualitative qui se réalise par la lecture sur platine chauffante entre lame et lamelle, de 10 µL de sperme liquéfié ou de spermatozoïdes contenus dans un milieu de culture, au grossissement 200, ou 400 d'un microscope optique. Ceci est fait deux fois pour chaque échantillon, selon la méthode reconnue décrite dans le Cahier Bioforma 42. Le lecteur évalue les 4 types de mobilités des spermatozoïdes : a (rapides et progressifs), b (progressifs lents), c (mobiles, non-progressifs), et d (immobiles) et fait une estimation sur 100 spermatozoïdes par lame pour deux lames par échantillon. Le résultat final est rendu sous forme de pourcentage de mobilité.

Après lecture des pages concernant la lecture de la mobilité spermatique dans le document de référence Bioforma cahier 42, la technicienne novice a reçu plus d'explications sur les différents types de mobilités a, b, c, et d au laboratoire d'andrologie. Les techniciens experts ont pu montrer par l'intermédiaire du microscope double tête, et la caméra reliée à un écran d'ordinateur, les différents types de mobilité. De plus, les techniciens experts ont expliqué et montré les étapes préanalytiques critiques pour la bonne lecture de la mobilité (homogénéisation, montage d'une lame de mobilité, lecture rapide au microscope, voir annexe 6).

Formation initiale pratique à l'évaluation de la mobilité spermatique:

La technicienne novice a observé puis techniqué en parallèle 10 mobilités spermatiques. Quand le technicien expert a validé les critères de lecture de mobilité (savoir préparer une lame de mobilité, savoir reconnaître et estimer en % les différents types de mobilité), la technicienne novice a pu passer à l'étape finale d'épreuve technique.

Epreuve Technique de la Formation Initiale à l'évaluation de la mobilité spermatique

La technicienne novice a réalisé l'épreuve technique initiale en spermiologie par lecture des mobilités provenant de 30 échantillons spermatiques. Les mobilités des mêmes échantillons ont été analysées en même temps par un technicien habilité. Au total, 5 techniciens déjà habilités ont participé à la lecture de 6 échantillons en double chacun. Les échantillons choisis étaient représentatifs des

échantillons que la nouvelle technicienne pouvait recevoir au laboratoire CECOS, allant d'échantillons très pauvres à des échantillons très riches en spermatozoïdes.

Maintien des compétences à l'évaluation de la mobilité spermatique

Pour le maintien des compétences en mobilité spermatique, un contrôle de qualité interne a été créé au laboratoire sous forme de vidéos. Des lames de sperme frais et après migration sur gradient de densité ont été préparées sur des lames calibrées à usage unique d'une profondeur de 20µm, ("Standard Count analysis chambers Leja, Nieuw-Venep, Hollande") où le prélèvement rentre par capillarité dans une chambre en verre fixe. Classiquement les mobilités spermatiques sont visualisées à partir de l'échantillon déposé entre une lame et une lamelle, mais parfois des mouvements liquidiens entraînent les spermatozoïdes et rendent la lecture de la mobilité difficile. Pour éviter ce possible effet, les lames calibrées ont été utilisées. Les échantillons spermatiques, une fois déposés sur les lames, ont été filmés sur un microscope optique (Nikon Eclipse E600; France) équipé d'une caméra numérique (DsFi1, Nikon). Six échantillons de sperme frais et migrés ont été sélectionnés à partir de prélèvements de patients consultant pour infertilité au laboratoire de spermologie. Des échantillons de qualité variée allant de très faibles concentrations et mobilités (oligoasthénospermiques) à des échantillons riches et ayant de mobilités normales (normozoospermiques) ont été choisis afin de tester toutes les variétés de mobilités rencontrées en pratique dans les 3 secteurs du laboratoire. Les vidéos ont été enregistrées en haute résolution afin de permettre une visualisation adéquate sur un écran d'ordinateur et de se rapprocher au plus près de l'observation au microscope. Pour ceci, deux vidéos ont été réalisées pour chaque échantillon : une au grossissement 200x, et une au 400x, les deux grossissements classiques de lecture de la mobilité. De plus, les séquences ont été réalisées sur 30 secondes à 3 champs différents en changeant de champ toutes les 10 secondes pendant la capture de chaque film.

Les vidéos ont été gravées sur des DVDs et distribuées au personnel concerné (17 personnes : techniciens, biologistes, et interne) avec une fiche d'instructions et un tableau pour remplir les mobilités (annexe III).

Statistiques

Pour l'épreuve d'habilitation initiale, les recommandations du cahier 42 Bioforma ont été suivies. Pour ceci, une évaluation de la moyenne des différences novice/expert a été réalisée par un test de Wilcoxon sur série appariée, par l'utilisation du logiciel BMDP Statistical Software, Inc pour chaque type de mobilité.

Pour le CQI, les recommandations d'assurance qualité en spermologie du Manuel de spermologie de l'OMS ont été appliquées par une analyse de variance afin de rechercher l'existence d'une éventuelle différence significative entre opérateurs. Les différences entre les mobilités des techniciens devraient être zéro. La moyenne globale pour chaque type de mobilité et de chaque échantillon a été calculée à partir des résultats correspondants de tous les lecteurs. L'écart (d) par rapport à cette moyenne globale a été calculé pour chaque mobilité correspondante de chaque lecteur. La moyenne (m) des écarts par rapport à la moyenne de tous les lecteurs, $m_j = \sum_i d_{ij}/n$, ainsi que l'écart type, $s_j = \sqrt{(\sum_i d_{ij}^2)/(n - 1)}$ où n = le nombre d'échantillons spermatiques, pour chaque type de mobilité a été calculée pour chaque lecteur. L'erreur standard (standard error, se) a été calculée et on considère qu'un biais existe lorsque la valeur absolue de la moyenne des écarts par rapport à la moyenne (m_j) dépasse 3 erreurs standards. L'erreur standard de la moyenne des différences entre techniciens ($se(m_j)$) a été calculée à partir de l'équation suivante :

$se(m_j) = \sigma \sqrt{(1-1/t)/n}$ avec $\sigma = \sqrt{(\sum_i s_j^2)/(t - 1)}$ t = nombre de techniciens et n = nombre d'échantillons.

Afin de vérifier la justesse de la lecture de la mobilité dans notre centre, nous avons demandé à un autre laboratoire de spermologie de référence, le laboratoire d'Histologie Embryologie, Biologie de la Reproduction de L'Hôpital Bichat Claude-Bernard, d'analyser les mobilités à partir du DVD contenant notre CQI. Nos résultats ont été comparés avec les leurs afin d'évaluer si un biais existait dans notre lecture de la mobilité spermatique. Pour ceci, le biais a été calculé selon la formule suivante :

Biais (%) = ((Moyenne globale de mobilité Cochin – Valeur cible) / Valeur Cible) x 100

Avec comme valeur cible = la moyenne des mobilités estimés par les lecteurs du service de l'hôpital Bichat.

Les limites RICOS ont été appliquées pour déterminer si un biais entre les deux centres existait (annexe 7).

Résultats

Epreuve Technique d'habilitation Initiale en mobilité spermatique

Les données des différents types de mobilité spermatique des 30 échantillons analysés par la technicienne novice et les techniciens experts se trouvent en annexe IV ainsi que sur les graphiques représentés dans les figures 1 à 4.

Figure 1: Mobilité type "a"

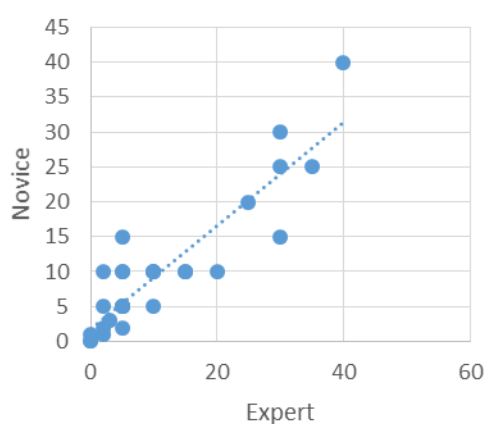


Figure 2: Mobilité type "b"

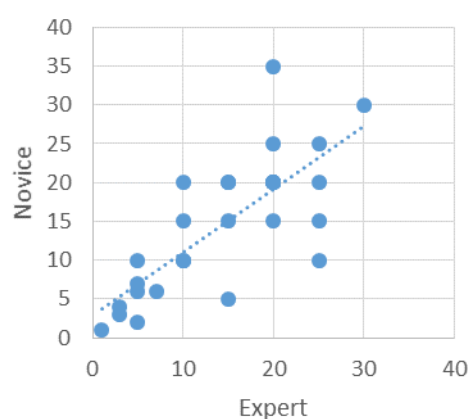


Figure 3: Mobilité type "c"

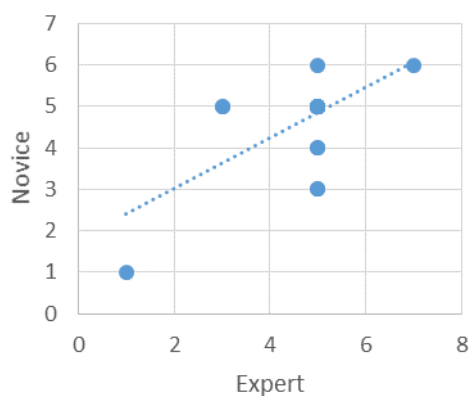
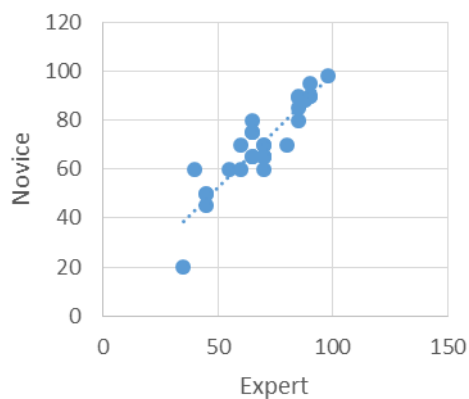


Figure 4: Mobilité type "d"



L'écart entre les résultats de mobilités entre la technicienne novice et l'expert a été calculé. La moyenne de ces écarts ainsi que l'écart type de ces écarts se trouvent dans le tableau 1. Après le test de Wilcoxon sur série appariée, aucune différence statistiquement significative entre les résultats de mobilités n'a été mise en évidence entre la technicienne novice et les techniciens experts ($p > 0,05$, tableau 1). La technicienne novice a donc validé l'épreuve d'habilitation de la mobilité spermatique

et a été désigné apte à rendre des résultats de mobilité spermatique dans tous les secteurs du service.

Tableau 1 : Ecart entre la technicienne novice et l'expert concernant la lecture des mobilités de 30 échantillons spermatisques.

	Mobilité a	Mobilité b	Mobilité c	Mobilité d
Moyenne de N-E	1.1	-0.17	0.07	-1.34
Ecart type de N-E	5.2	5.8	0.84	7.41
Wilcoxon p =	0.27	0.74	0.82	0.4
Conclusion	Validé	Validé	Validé	Validé

N = Novice ; E = Expert

Epreuve de CQI

Les données de lecture de mobilité spermatique des 6 échantillons filmés se trouvent en annexe V et sont représentées sous forme de graphique dans les figures 5 à 10.

Figure 5: Données des mobilités du CQI spn1

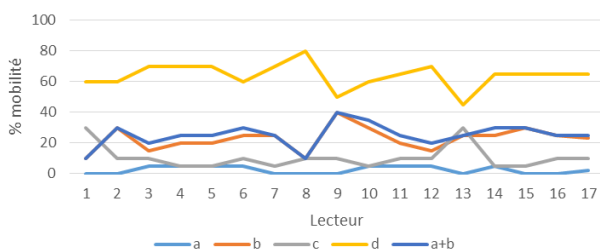


Figure 6: Données des Mobilités du CQI spn2

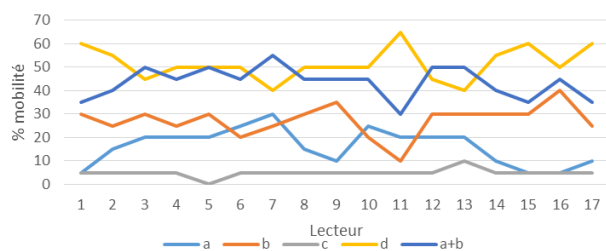


Figure 7: Données des Mobilités du CQI spn6

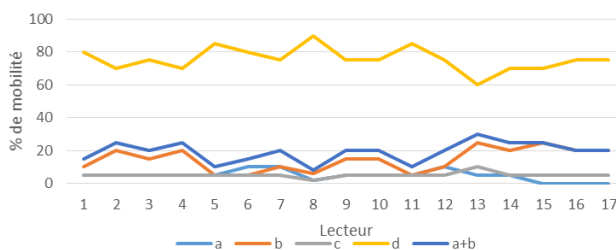


Figure 8: Données des Mobilités du CQI tms1

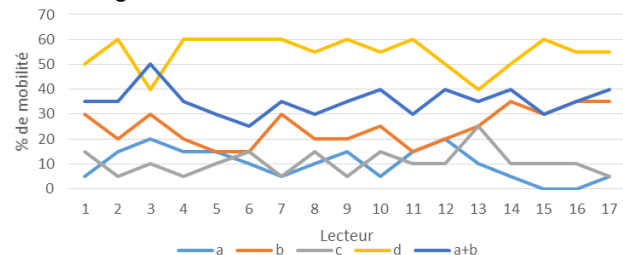


Figure 9: Données des Mobilités du CQI tms2

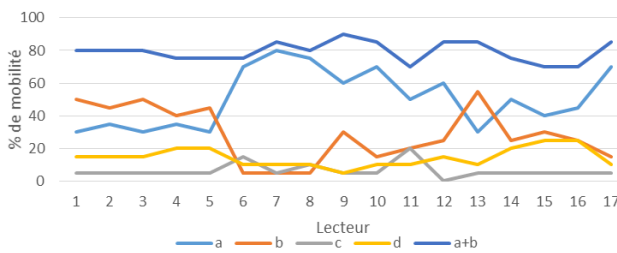
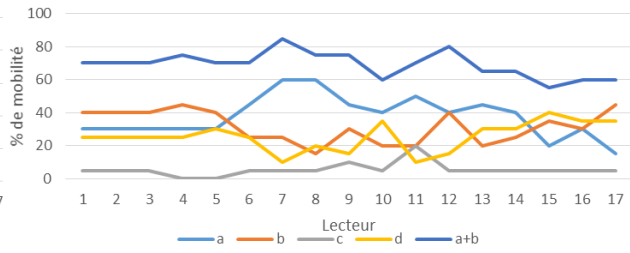


Figure 10: Données des Mobilités du CQI tms5



Les écarts des mobilités estimées des lecteurs par rapport à la moyenne globale (la moyenne global pour chaque échantillon et chaque mobilité se trouve en annexe V dans la dernière colonne de chaque tableau) pour chaque mobilité sont représentés dans les tableaux 2 à 6 ainsi que tous les calculs nécessaires pour établir les limites d'acceptabilité représentés par trois fois l'erreur standard en valeur absolue (3 x se(m)).

		Tableau 2: Ecart par rapport à la moyenne des mobilités type "a"																
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Echantillon	spn1	2,47	2,47	-2,53	-2,53	-2,53	-2,53	2,47	2,47	2,47	-2,53	-2,53	-2,53	2,47	-2,53	2,47	2,47	0,47
	spn2	11,18	1,18	-3,82	-3,82	-3,82	-8,82	-13,82	1,18	6,18	-8,82	-3,82	-3,82	-3,82	6,18	11,18	11,18	6,18
	spn6	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-5,18	-5,18	2,82	-0,18	-0,18	-0,18	-5,18	-0,18	-0,18	4,82	4,82	4,82
	tms1	5,00	-5,00	-10,00	-5,00	-5,00	0,00	5,00	0,00	-5,00	5,00	-5,00	-10,00	0,00	5,00	10,00	10,00	5,00
	tms2	20,59	15,59	20,59	15,59	20,59	-19,41	-29,41	-24,41	-9,41	-19,41	0,59	-9,41	20,59	0,59	10,59	5,59	-19,41
	tms5	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65	-7,35	-22,35	-22,35	-7,35	-2,35	-12,35	-2,35	-7,35	-2,35	17,65	7,65	22,65
moyenne		7,78	3,62	1,95	1,95	2,78	-7,22	-10,55	-6,72	-2,22	-4,72	-3,88	-5,55	1,95	1,12	9,45	6,95	3,28
ecart type		7,41	7,15	10,78	8,06	9,82	6,78	13,76	12,96	6,04	8,46	4,66	3,38	9,76	3,69	5,33	3,29	13,50
s^2		54,97	51,09	116,11	64,94	96,38	45,91	189,20	168,09	36,50	71,64	21,71	11,44	95,17	13,59	28,38	10,82	182,32
somme s^2		1258,25																
σ =		8,87																
se(m) =		3,51																
3xse(m) =		10,5																

		Tableau 3: Ecart par rapport à la moyenne des mobilités type "b"																
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Echantillon	spn1	12,82	-7,18	7,82	2,82	2,82	-2,18	-2,18	12,82	-17,18	-7,18	2,82	7,82	-2,18	-2,18	-7,18	-2,18	-0,18
	spn2	-2,65	2,35	-2,65	2,35	-2,65	7,35	2,35	-2,65	-7,65	7,35	17,35	-2,65	-2,65	-2,65	-2,65	-12,65	2,35
	spn6	4,47	-5,53	-0,53	-5,53	9,47	9,47	4,47	8,47	-0,53	-0,53	9,47	4,47	-10,53	-5,53	-10,53	-5,53	-5,53
	tms1	-5,29	4,71	-5,29	4,71	9,71	9,71	-5,29	4,71	4,71	-0,29	9,71	4,71	-0,29	-10,29	-5,29	-10,29	-10,29
	tms2	-21,47	-16,47	-21,47	-11,47	-16,47	23,53	23,53	23,53	-1,47	13,53	8,53	3,53	-26,47	3,53	-1,47	3,53	13,53
	tms5	-8,53	-8,53	-8,53	-13,53	-8,53	6,47	6,47	16,47	1,47	11,47	11,47	-8,53	11,47	6,47	-3,53	1,47	-13,53
moyenne		-3,44	-5,11	-5,11	-3,44	-0,94	9,06	4,89	10,56	-3,44	4,06	9,89	1,56	-5,11	-1,77	-5,11	-4,27	-2,27
ecart type		11,68	7,71	9,73	7,87	10,37	8,32	10,10	9,18	7,86	8,02	4,69	6,02	12,64	6,06	3,33	6,42	9,77
s^2		136,43	59,45	94,74	61,96	107,52	69,17	102,04	84,27	61,84	64,34	22,04	36,19	159,69	36,74	11,10	41,24	95,43
somme s^2		1244,19																
σ =		8,82																
se(m) =		3,49																
3xse(m) =		10,48																

		Tableau 4: Ecart par rapport à la moyenne des mobilités type "c"																
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Echantillon	spn1	-19,41	0,59	0,59	5,59	5,59	0,59	5,59	0,59	0,59	5,59	0,59	0,59	-19,41	5,59	5,59	0,59	0,59
	spn2	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	spn6	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	3,12	0,12	0,12	0,12	0,12	-4,88	0,12	0,12	0,12	0,12
	tms1	-4,41	5,59	0,59	5,59	0,59	-4,41	5,59	-4,41	5,59	-4,41	0,59	0,59	-14,41	0,59	0,59	0,59	5,59
	tms2	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	-8,53	1,47	-3,53	1,47	1,47	-13,53	6,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
	tms5	0,59	0,59	0,59	5,59	5,59	0,59	0,59	0,59	-4,41	0,59	-14,41	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59
moyenne		-3,61	1,39	0,56	3,06	3,06	-1,94	2,23	-0,61	0,56	0,56	-4,44	1,39	-6,94	1,39	1,39	0,56	1,39
ecart type		8,01	2,12	0,52	2,82	2,60	3,75	2,66	2,83	3,20	3,20	7,39	2,50	8,33	2,12	2,12	0,52	2,12
s^2		64,14	4,49	0,27	7,94	6,77	14,06	7,05	8,02	10,27	10,27	54,62	6,26	69,36	4,49	4,49	0,27	4,49
somme s^2		277,27																
σ =		4,16																
se(m) =		1,65																
3xse(m) =		4,94																

		Tableau 5: Ecart par rapport à la moyenne des mobilités type "d"																
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Echantillon	spn1	4,12	4,12	-5,88	-5,88	-5,88	4,12	-5,88	-15,88	14,12	4,12	-0,88	-5,88	19,12	-0,88	-0,88	-0,88	-0,88
	spn2	-8,53	-3,53	6,47	1,47	1,47	1,47	11,47	1,47	1,47	1,47	-13,53	6,47	11,47	-3,53	-8,53	1,47	-8,53
	spn6	-4,41	5,59	0,59	5,59	-9,41	-4,41	0,59	-14,41	0,59	0,59	-9,41	0,59	15,59	5,59	5,59	0,59	0,59
	tms1	4,71	-5,29	14,71	-5,29	-5,29	-5,29	-5,29	-0,29	-5,29	-0,29	-5,29	4,71	14,71	4,71	-5,29	-0,29	-0,29
	tms2	-0,59	-0,59	-0,59	-5,59	-5,59	4,41	4,41	4,41	9,41	4,41	4,41	-0,59	4,41	-5,59	-10,59	-10,59	4,41
	tms5	0,29	0,29	0,29	0,29	-4,71	0,29	15,29	5,29	10,29	-9,71	15,29	10,29	-4,71	-4,71	-14,71	-9,71	-9,71
moyenne		-0,74	0,10	2,60	-1,57	-4,90	0,10	3,43	-3,24	5,10	0,10	-1,57	2,60	10,10	-0,74	-5,74	-3,24	-2,40
ecart type		5,07	4,22	7,11	4,74	3,54	4,15	8,69	9,45	7,33	5,16	10,38	5,74	8,79	4,83	7,26	5,42	5,53
s^2		25,70	17,81	50,60	22,51	12,51	17,22	75,46	89,38	53,69	26,63	107,81	32,96	77,22	23,35	52,76	29,38	30,60
somme s^2		745,59																
σ =		6,83																
se(m) =		2,70																
3xse(m) =		8,11																

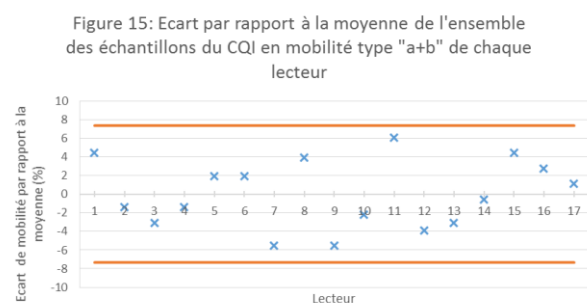
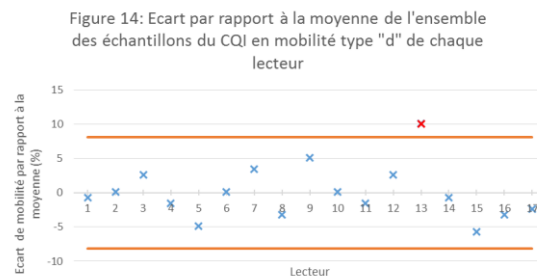
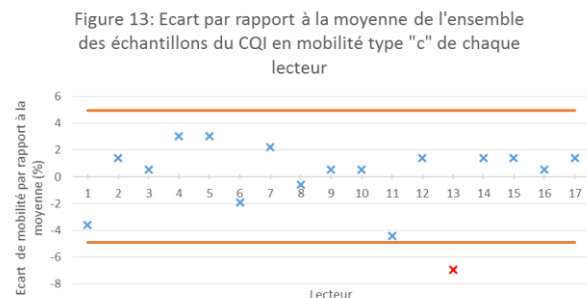
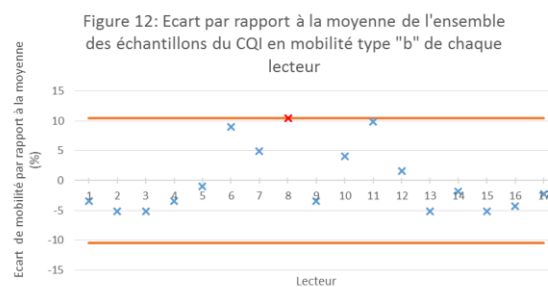
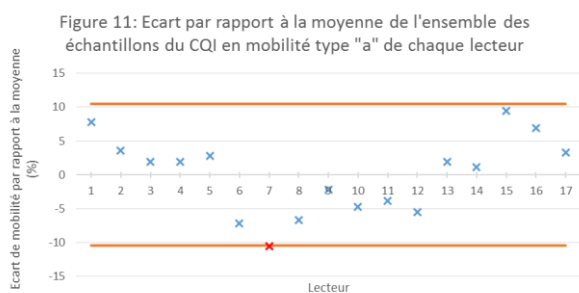
		Tableau 6: Ecart par rapport à la moyenne des mobilités type "a+b"																
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Echantillon	spn1	15,29	-4,71	5,29	0,29	0,29	-4,71	0,29	15,29	-14,71	-9,71	0,29	5,29	0,29	-4,71	-4,71	0,29	0,29
	spn2	8,53	3,53	-6,47	-1,47	-6,47	-1,47	-11,47	-1,47	-1,47	-1,47	13,53	-6,47	-6,47	3,53	8,53	-1,47	8,53
	spn6	4,29	-5,71	-0,71	-5,71	9,29	4,29	-0,71	11,29	-0,71	-0,71	9,29	-0,71	-10,71	-5,71	-5,71	-0,71	-0,71
	tms1	0,29	0,29	-14,71	0,29	5,29	10,29	0,29	5,29	0,29	-4,71	5,29	-4,71	0,29	-4,71	5,29	0,29	-4,71
	tms2	-0,88	-0,88	-0,88	4,12	4,12	4,12	-5,88	-0,88	-10,88	-5,88	9,12	-5,88	-5,88	4,12	9,12	9,12	-5,88
	tms5	-0,88	-0,88	-0,88	-5,88	-0,88	-0,88	-15,88	-5,88	-5,88	9,12	-0,88	-10,88	4,12	4,12	14,12	9,12	9,12
moyenne		4,44	-1,39	-3,06	-1,39	1,94	1,94	-5,56	3,94	-5,56	-2,23	6,11	-3,89	-3,06	-0,56	4,44	2,77	1,11
ecart type		6,46	3,38	6,81	3,87	5,50	5,36	6,84	8,17	6,11	6,43	5,61	5,56	5,51	4,93	7,99	4,96	6,42
s^2		41,68	11,43	46,42	14,96	30,30	28,77	46,74	66,77	37,33	41,41	31,52	30,93	30,42	24,27	63,92	24,58	41,17
somme s^2		612,61																
σ =		6,19																
se(m) =		2,45																
3xse(m) =		7,35																

Le tableau 7 ainsi que les figures 11 à 15 sont un récapitulatif des moyennes des écarts par rapport à la moyenne de tous les lecteurs avec en rouge les moyennes qui sont en dehors des limites d'acceptabilité.

Tableau 7 : Moyenne des écarts par rapport à la moyenne des lecteurs de mobilité spermatique.

		Lecteurs																Limite Acceptable (valeur absolue)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		17
Moyenne des écarts des mobilités par rapport à la moyenne en %	a	7,78	3,62	1,95	1,95	2,78	-7,22	-10,55	-6,72	-2,22	-4,72	-3,88	-5,55	1,95	1,12	9,45	6,95	3,28	10,5
	b	-3,44	-5,11	-5,11	-3,44	-0,94	9,06	4,89	10,56	-3,44	4,06	9,89	1,56	-5,11	-1,77	-5,11	-4,27	-2,27	10,48
	c	-3,61	1,39	0,56	3,06	3,06	-1,94	2,23	-0,61	0,56	0,56	-4,44	1,39	-6,94	1,39	1,39	0,56	1,39	4,942
	d	-0,74	0,10	2,60	-1,57	-4,90	0,10	3,43	-3,24	5,10	0,10	-1,57	2,60	10,10	-0,74	-5,74	-3,24	-2,40	8,11
	a+b	4,44	-1,39	-3,06	-1,39	1,94	1,94	-5,56	3,94	-5,56	-2,23	6,11	-3,89	-3,06	-0,56	4,44	2,77	1,11	7,35

En rouge: valeurs au dessus des limites d'acceptabilité.



Au total, seul 3 lecteurs, le 7, 8 et 13, avaient des estimations de mobilité spermatique en dehors des limites d'acceptabilité (en valeur absolue) pour les mobilités type a pour le lecteur 7, b pour le lecteur 8, et c et d pour le lecteur 13. En revanche, tous les lecteurs ont estimé des mobilités progressives a+b dans les limites d'acceptabilité de l'OMS. Il est intéressant de noter que les 3

lecteurs ayant en moyenne estimés des mobilités en dehors des limites acceptables provenaient du même secteur, le secteur AMP. Dans ce secteur, seule la mobilité progressive a+b est critique à la prise en charge des patients car c'est elle, en plus de la concentration spermatique, qui détermine la technique d'AMP qui sera proposée aux couples. Elle permet d'estimer le nombre de spermatozoïdes progressifs inséminés en IIU et en FIV quand la quantité est suffisante, ou à défaut en ICSI en cas de mobilité et/ou numération spermatique trop faible. Il a donc été décidé après analyse des résultats du CQI en mobilité spermatique que ces trois lecteurs avaient validé la lecture de la mobilité a+b nécessaire à exercer au laboratoire d'AMP, mais qu'ils ne pouvaient pas exercer dans les autres secteurs du CECOS ni d'andrologie où les autres types de mobilités sont critiques à la prise en charge des patients. Pour pouvoir exercer la lecture de la mobilité spermatique dans les autres secteurs, ces trois lecteurs devront réaliser une épreuve de remise à niveau. Cette épreuve de remise à niveau consistera en une épreuve de formation théorique et pratique et de validation technique équivalente à celle effectuée par un technicien novice. Tous les autres lecteurs, en revanche, ont été validés pour la lecture de la mobilité spermatique dans les trois secteurs du service.

Analyse du CQI par un laboratoire de spermiologie dit de référence

Le CQI a été envoyé au service d'Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction de l'hôpital Bichat. Le DVD des mobilités spermatiques a été lu par 3 techniciens en poste depuis plusieurs années. Leurs estimations se trouvent dans le tableau 8.

Tableau 8 : données des Mobilités spermatiques estimées par un laboratoire de référence.

spn1	lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	moyenne		spn2	lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	moyenne		spn6	lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	moyenne
a	5	5	0	3,33		a	35	25	10	23,33		a	5	25	5	11,67
b	25	10	10	15,00		b	15	30	20	21,67		b	10	30	10	16,67
c	15	5	20	13,33		c	5	5	15	8,33		c	10	5	10	8,33
d	55	80	70	68,33		d	45	40	55	46,67		d	75	40	75	63,33
a+b	30	15	10	18,33		a+b	50	55	30	45,00		a+b	15	55	15	28,33
a+b+c	45	20	30	31,67		a+b+c	55	60	45	53,33		a+b+c	25	60	25	36,67
tms1	lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	moyenne		tms2	lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	moyenne		tms5	lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	moyenne
a	30	15	20	21,67		a	45	45	40	43,33		a	40	45	40	41,67
b	15	15	10	13,33		b	45	45	40	43,33		b	35	30	40	35,00
c	10	10	15	11,67		c	5	5	10	6,67		c	5	5	10	6,67
d	45	60	55	53,33		d	5	5	10	6,67		d	20	20	10	16,67
a+b	45	30	30	35,00		a+b	90	90	80	86,67		a+b	75	75	80	76,67
a+b+c	55	40	45	46,67		a+b+c	95	95	90	93,33		a+b+c	80	80	90	83,33

Le calcul du biais entre les lectures de chaque type de mobilité et pour chaque échantillon a été calculé pour les mobilités a, a+b, et a+b+c, selon les mobilités étudiées dans les données RICOS. Les

résultats des calculs de biais pour les différentes mobilités des différents échantillons se trouvent dans le tableau 9.

Tableau 9 : Biais calculés entre les mobilités estimés par l'hôpital Bichat et l'hôpital Cochin.

Limites d'acceptabilité RICOS: mobilité a = 13,8; mobilité a+b = 9; mobilité a+b+c = 8,8												
spn1	Moyenne Bichat	Moyenne Cochin	Biais (%)	spn2	Moyenne Bichat	Moyenne Cochin	Biais (%)	spn6	Moyenne Bichat	Moyenne Cochin	Biais (%)	
a	3,33	2,47	-25,80	a	23,33	16,18	-30,60	a	11,67	4,82	-58,70	
a+b	18,33	25,29	37,97	a+b	45,00	43,53	-3,27	a+b	28,33	19,29	-31,91	
a+b+c	31,67	35,88	13,29	a+b+c	53,33	48,53	-9,00	a+b+c	36,67	24,41	-33,43	
tms1	Moyenne Bichat	Moyenne Cochin	Biais (%)	tms2	Moyenne Bichat	Moyenne Cochin	Biais (%)	tms5	Moyenne Bichat	Moyenne Cochin	Biais (%)	
a	21,67	10,00	-53,85	a	43,33	50,59	16,76	a	41,67	37,65	-9,65	
a+b	35,00	35,29	0,83	a+b	86,67	79,12	-8,72	a+b	76,67	69,12	-9,85	
a+b+c	46,67	45,30	-2,94	a+b+c	93,33	85,59	-0,09	a+b+c	83,33	74,71	-10,34	

Globalement ces résultats avec l'utilisation des critères RICOS sont décevants. Il existe un biais non-négligeable entre les deux laboratoires dans l'estimation de la mobilité spermatique avec en majorité une sous-estimation de la mobilité par les lecteurs de Cochin par rapport aux lecteurs de l'hôpital Bichat. Seule la mobilité a+b de 3 échantillons, la mobilité a+b+c de 2 échantillons, et la mobilité a d'un échantillon ont été concordantes avec la lecture du service de Bichat. En revanche, une analyse plus fine des données est rassurante car la lecture par les deux centres ne change pas la prise en charge des patients concernés par l'analyse. Les résultats de mobilité de l'échantillon spn1 sont interprétés comme pathologiques par les deux centres qui estiment les différentes mobilités en dessous des valeurs normales (OMS, 2010). Il en est de même pour l'échantillon spn6. Le spn2 est considéré comme normal par les deux centres. Les TMS sont également interprétés de la même façon avec des résultats très favorables pour les échantillons tms2 et 5 et moins favorables pour le tms1.

Discussion

La formation initiale et continue du personnel en spermiologie est primordiale surtout quand la lecture des paramètres spermatiques est manuelle comme dans notre centre. La difficulté est de rendre des résultats homogènes entre techniciens pour un échantillon donné, ainsi que des résultats justes par rapport à d'autres laboratoires de spermiologie ou d'AMP.

Notre formation initiale proposée dans ce mémoire et appliquée au technicien novice sur le plan théorique et pratique a assuré une lecture adéquate de la mobilité spermatique par le technicien novice considéré apte à rendre des résultats de mobilité spermatique. Ceci a été confirmé par la validation de l'épreuve technique initiale sans différence significative de lecture de la mobilité spermatique entre le technicien novice et les experts. Notre épreuve de validation a de nombreux avantages. La technique de lecture en parallèle et au même moment des échantillons par le technicien novice et l'expert permet de détecter d'éventuelles erreurs pré-analytiques comme une mauvaise homogénéisation du prélèvement, et permet la lecture de la mobilité au microscope, lecture classique des paramètres spermatiques. La lecture des 30 échantillons a été vérifiée par plusieurs techniciens experts (5) afin d'éviter des biais liés à un lecteur. De plus, des échantillons de concentration et de mobilité spermatiques très variables ont été choisis parmi les hommes consultant pour hypofertilité, tout à fait représentatifs des types d'échantillons que le laboratoire technique en routine.

Cette épreuve a seuls deux inconvénients à notre connaissance. Premièrement, elle nécessite de mobiliser un technicien déjà habilité pour réaliser l'épreuve. Il faut donc pouvoir combler cette perte du temps technicien ; ce qui ajoute un coût aux laboratoires d'analyse médicale. Deuxièmement, l'épreuve ne permet pas aux lecteurs de visualiser les mêmes champs en même temps car le novice et l'expert regardent chacun leur lame de mobilité spermatique provenant du même échantillon de sperme. Il peut donc exister des différences de mobilités entre les champs examinés par les lecteurs.

Malgré ces inconvénients, ce mode de validation est similaire à la lecture des échantillons en routine et reste un moyen simple et fiable d'habiliter le personnel en spermiologie. Nous considérons donc qu'une application de cette épreuve à l'ensemble des paramètres spermatiques étudiés dans le spermogramme et le spermocytogramme (concentration, vitalité, pH, morphologie) est maintenant envisageable.

Le CQI créé et lu par tous nos lecteurs n'a pas mis en évidence d'écart de lecture pour la mobilité progressive a+b. Ceci est plutôt rassurant car c'est le seul type de mobilité qui est critique dans

l'ensemble des trois secteurs du service. L'épreuve, en revanche, nous a permis de constater des écarts de lecture hors des limites d'acceptabilité des quatre mobilités a, b, c, et d chez trois lecteurs provenant du secteur d'AMP, ce qui nous a conduit à ne pas pouvoir valider leur lecture dans le secteur d'andrologie et du CECOS.

Le support du CQI sous forme de vidéo est, à notre avis, le moyen le plus efficace de tester la reproductibilité de la lecture de la mobilité spermatique parmi plusieurs lecteurs. Une vidéo garantit la lecture des mêmes champs et évite des erreurs liées à des prélèvements hétérogènes. Elle permet donc une analyse exclusivement analytique de la mobilité spermatique. De plus, elle est réalisable à tout moment, sans nécessité de rassembler tout le personnel en un même temps. En cas d'écart hors des limites d'acceptabilité, la vidéo permet aussi de revoir les images et d'expliquer aux lecteurs les erreurs analytiques faites et de les corriger. C'est un moyen simple et pratique pour passer un CQI à l'ensemble des lecteurs.

Ce CQI a plusieurs inconvénients non-négligeables. Premièrement la création des images nécessite d'être équipé d'un microscope optique avec contraste de phase relié à une caméra numérique de bonne qualité et d'un graveur de DVD. Ceci peut revenir à un investissement trop important pour certains laboratoires. Il faut acquérir des images de bonne qualité, sans amas ou agglutinats de spermatozoïdes qui peuvent biaiser la lecture. De plus, les vidéos sont pour beaucoup de techniciens déstabilisants et difficiles à lire à partir d'un écran d'ordinateur car ils ont l'habitude de lire les mobilités à partir d'un microscope, ce qui nécessite une phase d'adaptation. Comme mentionné plus haut, une vidéo permet la lecture purement analytique de la mobilité spermatique qui est à la fois un avantage, mais aussi un inconvénient car elle ne détecte pas les possibles erreurs pré-analytiques. Ces dernières sont nombreuses en spermiologie (citées en Annexe VI) et il est important de rester vigilant et de les éviter car elles ont un impact sur la lecture de la mobilité spermatique. Une formation idéale testerait donc à la fois l'aspect purement analytique comme notre CQI par une lecture de vidéos et aussi l'aspect pré-analytique par une analyse de la façon dont le technicien prépare son échantillon de sperme avant l'analyse de la mobilité par exemple.

Malgré l'efficacité à tester la reproductibilité entre techniciens, le CQI ne vérifie pas la justesse de lecture de la mobilité. Tous les lecteurs peuvent donner des résultats semblables pour un échantillon, mais comment savoir si tous les lecteurs rendent un résultat juste ou non ? Un moyen de tester la justesse serait de comparer les résultats des lecteurs avec une technique dite de référence et déjà vérifiée et validé aussi selon la norme ISO 15189, par l'utilisation d'un automate de lecture de mobilité spermatique (exemple : le CASA). Dans ce dernier cas, il faudrait que les échantillons soient, en même temps, analysés par un automate spécialisé et filmés au microscope

optique. Ceci est, en revanche, difficilement faisable en pratique car peu de laboratoires détiennent l'équipement et/ou la validation/vérification nécessaire pour procéder ainsi.

Un autre moyen de tester la justesse du rendu de résultat réside dans la réalisation de contrôle de qualité externes (CQE) disponibles en spermologie depuis un an maintenant. Cette stratégie est facilement réalisable car peu onéreuse (entre 100 et 200 euros par paramètre spermatique et par an) et la lecture se réalise sous le même format vidéo que notre CQI. En revanche, l'unique société qui réalise les CQE en France n'a pas fourni des séquences de vidéos suffisamment de bonne qualité l'année dernière pour séduire nos responsables du service (présence de séquences avec des agrégats par exemple). L'intérêt d'utilisation de ce genre de CQE d'une telle qualité est discutable. Avec la norme ISO15189 la participation au CQE est obligatoire, donc le laboratoire a décidé de participer l'année prochaine au CQE de spermologie, qui a, depuis, amélioré la qualité des séquences proposées suite aux conseils de certains médecins de notre service.

Pour terminer, nous avons choisi de tester notre justesse en comparant l'évaluation de la mobilité spermatique avec un autre laboratoire, de référence en spermologie : le service de l'Hôpital Bichat. Les résultats de lecture du service de Bichat de la mobilité des vidéos de notre CQI étaient globalement différents des nôtres. En revanche, le point le plus important dans cette comparaison inter-centre était qu'aucune lecture n'aurait changé la prise en charge des patients. Globalement les différences observées entre les deux centres n'étaient pas trop éloignées et ne changeaient pas les conclusions des mobilités spermatiques.

Ce genre de CQI-CQE n'est pas une bonne façon de procéder car il est impossible de savoir si un laboratoire est un laboratoire expert ou non. Il est bien plus juste de comparer ses résultats aux CQE réalisés entre plusieurs laboratoires et non un seul, même si la réputation de la qualité d'un laboratoire est bonne. Cette épreuve a convaincu encore plus notre service à participer au CQE l'année prochaine.


Conclusion

Avant ce projet, la formation du personnel technique du service pour la lecture des paramètres spermatiques existait mais reposait sur des appréciations subjectives et non précisées. Par ce projet, nous avons rendu la formation en mobilité spermatique plus précise et complète et avons créé un système d'évaluation de la formation qui assure un rendu des résultats homogènes entre différents

lecteurs. Les travaux à continuer dans cette démarche qualité sont la participation aux CQE ainsi que l'application de ce projet aux autres paramètres spermatozoïdiques étudiés dans les différents secteurs du service. Ainsi le service pourra assurer une qualité optimale dans le rendu des résultats et la prise en charge des patients, et continuer dans sa démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189.

Annexes

Annexe I : Grille d'Habilitation de la Formation Initiale

 <p>ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS</p> <p>Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction</p> <p>Hôpitaux Universitaires Paris Centre</p> <p>COCHIN BROCA HÔTEL-DIEU</p>	<i>Chapitre 5 : Formation du Personnel</i>		
	<i>Formation Initiale</i>		
	<i>Masque pour une Grille d'Habilitation Initiale</i>		
	Référence : à préciser	Date d'application : 15/04/2013	Page(s) 1/2
Version : à préciser			



Grille d'Habilitation Initiale

Personne concernée

NOM :

Prénom :

Préanalytique	Date de Validation	Signature du responsable
Sait homogénéiser un échantillon de sperme		
Volume		
Sait pipetter et calculer le volume spermatique.		
Mobilité		
Sait préparer une lame de mobilité		
Sait reconnaître et estimer les mobilités a, b, c, et d		
Estimation en parallèle de 10 mobilités avec tech expert		
Epreuve d'habilitation technique initiale		
Concentration		
Sait calculer et réaliser une dilution		
Sait compter les spermatozoïdes et cellules sur cellule de Thomas		
Sait réaliser et lire un Leucoscreen		
Estimation en parallèle de 10 concentrations avec tech expert		
Epreuve d'habilitation technique initiale		
Vitalité		
Une vitalité avec le kit éosine-nigrosine		
Sait reconnaître un spermatozoïde vivant et mort		
Estimation en parallèle de 10 vitalités avec tech expert		
Epreuve d'habilitation technique initiale		


 <p><i>Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction</i></p>  <p>COCHIN BROCA HÔTEL-DIEU</p>	<i>Chapitre 5 : Formation du Personnel</i>		
	<i>Formation Initiale</i>		
	<i>Masque pour une Grille d'Habilitation Initiale</i>		
	Référence : à préciser	Date d'application :	Page(s)
Version : à préciser	15/04/2013	2/2	

Morphologie	Date de Validation	Signature du Responsable
Sait faire un frottis		
Sait colorer un frottis		
Sait reconnaître un spermatozoïde typique et un atypique		
Sait reconnaître les anomalies morphologiques spermatiques		
Estimation en parallèle de 10 spermocytogrammes avec expert		
Epreuve d'habilitation technique initiale		
Autre		
A lu le document de référence BIOFORMA cahier 42		
Sait reconnaître des agglutinats et des amas		
Sait reconnaître un MAR test positif		
Sait estimer le % de spermatozoïdes + pour le MAR test		
Sait utiliser un microscope et utiliser le réticulé gradué		
Sait rentrer les résultats dans Médifirst		

Cas particulier des absences de >6 mois ou personnes habilitées dans un autres centre :

Mobilité	Date de Validation	Signature du responsable
Estimation en parallèle de 5 mobilités avec tech expert		
Dernier CQI de Mobilité		
Concentration		
Estimation en parallèle de 5 concentrations avec tech expert		
Dernier CQI de Concentration		
Vitalité		
Estimation en parallèle de 5 vitalités avec tech expert		
Dernier CQI de Vitalité		
Morphologie		
Estimation en parallèle de 5 spermocytogrammes avec expert		
Dernier CQI de spermocytogramme		

Annexe II : Grille d’Habilitation de la Formation Continue

 <p>Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction</p>	<i>Chapitre 5 : Formation du Personnel</i>		
	<i>Formation Continue</i>		
	<i>Masque pour une Grille d’Habilitation Continue</i>		
	Référence : à préciser	Date d’application :	Page(s)
Version : à préciser	15/04/2013	1/1	

Grille d’Habilitation Continue

Personne concernée

NOM :

Prénom :

Formation	Période/Date Effectuée	Période/Date Effectuée	Période/Date Effectuée	Signature du Responsable Qualité
Pas d'absence de > 6 mois				
Réalisation et validation de CQI une fois par an.				
Technique de > 10 spermogrammes/spermocytogrammes par mois.				

Instructions Pour la Réalisation du Contrôle de Qualité Interne de la Mobilité Spermatique

Dans le but de réaliser un contrôle de qualité interne de la détermination de la mobilité spermatique, des vidéos provenant de 6 échantillons de sperme frais et après migration sur gradient de densité ont été réalisées aux objectifs 20x et 40x.

La réalisation du contrôle se fait de la manière suivante : Lire toutes les informations suivantes avant de commencer.

1/ Visualiser sur un écran d'ordinateur les 12 vidéos correspondants aux 6 lames de mobilité spermatique. Ouvrir les vidéos un par un à partir du DVD « Mobilité 2013 » en utilisant le **Lecteur Windows Media**. Si la visualisation des images n'est pas bonne (trop lente par exemple), télécharger les images sur le bureau de votre ordinateur et visualiser les vidéos à partir des fichiers téléchargés.

2/ Noter vos mobilités « a », « b », « c », et « d » des échantillons correspondants sur le tableau Excel ci-dessous sans partager, d'aucune manière, vos résultats avec des pairs.

3/ Bien noter votre nom sur cette feuille et rendre vos résultats à A. FINET avant le 2 juin.

Pour rappel, la bibliographie sur la lecture de la mobilité spermatique se trouve dans le cahier 42 de Bioforma sur internet au lien suivant : www.quali-bio.com/CahiersCd1/cahier42.pdf

Date : _____

Nom : _____ Prénom _____

spn1	a+b	spn2	a+b	spn6	a+b
	C		c		C
	D		d		D
tms1	a+b	tms2	a+b	tms5	a+b
	C		c		C
	D		d		D

Annexe IV : Données de lecture de la mobilité de 30 échantillons durant l'épreuve de validation technique initiale chez la technicienne novice et les techniciens experts

Mobilité	Novice					Expert				
	a	b	c	d	a+b	a	b	c	d	a+b
1	0	3	7	90	3	1	3	6	90	4
2	3	7	5	85	10	3	6	6	85	9
3	0	5	5	90	5	0	2	3	95	2
4	2	3	5	90	5	2	4	4	90	6
5	30	20	5	45	50	30	20	5	45	50
6	5	5	5	85	10	5	10	5	80	15
7	5	5	5	85	10	2	6	3	89	8
8	2	5	5	88	7	1	7	4	88	8
9	10	15	5	70	25	10	20	5	65	30
10	5	20	5	70	25	5	20	5	70	25
11	10	20	5	65	30	10	20	5	65	30
12	35	15	5	45	50	25	20	5	50	45
13	30	25	5	40	55	15	20	5	60	35
14	5	30	5	60	35	5	30	5	60	35
15	20	10	5	65	30	10	20	5	65	30
16	30	10	5	55	40	25	10	5	60	35
17	5	20	5	70	25	5	25	5	65	30
18	15	10	5	70	25	10	15	5	70	25
19	10	20	5	65	30	5	15	5	75	20
20	15	15	5	65	30	10	5	5	80	15
21	25	25	5	45	50	20	25	5	50	45
22	0	1	1	98	1	0	1	1	98	1
23	2	10	3	85	12	5	10	5	90	15
24	10	25	5	60	35	10	15	5	70	25
25	5	25	5	65	30	10	10	5	75	20
26	40	20	5	35	60	40	35	5	20	75
28	5	20	5	70	25	15	20	5	60	35
29	2	15	3	80	17	10	15	5	70	25
30	5	20	5	70	25	10	20	5	65	30

Echantillon

ANNEXE V : Lecture des mobilités des 6 échantillons du CQI par les 17 lecteurs.

		Données de mobilités (%) estimées par chaque lecteur pour l'échantillon spn1																	
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	moyenne
Type de Mobilité	a	0	0	5	5	5	5	0	0	0	5	5	5	0	5	0	0	2	2,47
	b	10	30	15	20	20	25	25	10	40	30	20	15	25	25	30	25	23	22,82
	c	30	10	10	5	5	10	5	10	10	5	10	10	30	5	5	10	10	10,59
	d	60	60	70	70	70	60	70	80	50	60	65	70	45	65	65	65	65	64,12
	a+b	10	30	20	25	25	30	25	10	40	35	25	20	25	30	30	25	25	25,29

		Données de mobilités (%) estimées par chaque lecteur pour l'échantillon spn2																	
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	moyenne
Type de Mobilité	a	5	15	20	20	20	25	30	15	10	25	20	20	20	10	5	5	10	16,18
	b	30	25	30	25	30	20	25	30	35	20	10	30	30	30	40	25	27,35	27,35
	c	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5,00
	d	60	55	45	50	50	50	40	50	50	50	65	45	40	55	60	50	60	51,47
	a+b	35	40	50	45	50	45	55	45	45	45	30	50	50	40	35	45	35	43,53

		Données de mobilités (%) estimées par chaque lecteur pour l'échantillon spn6																	
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	moyenne
Type de Mobilité	a	5	5	5	5	5	10	10	2	5	5	5	10	5	5	0	0	0	4,82
	b	10	20	15	20	5	5	10	6	15	15	5	10	25	20	25	20	20	14,47
	c	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5,12
	d	80	70	75	70	85	80	75	90	75	75	85	75	60	70	70	75	75	75,59
	a+b	15	25	20	25	10	15	20	8	20	20	10	20	30	25	25	20	20	19,29

		Données de mobilités (%) estimées par chaque lecteur pour l'échantillon tms1																	
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	moyenne
Type de Mobilité	a	5	15	20	15	15	10	5	10	15	5	15	20	10	5	0	0	5	10,00
	b	30	20	30	20	15	15	30	20	20	25	15	20	25	35	30	35	35	24,71
	c	15	5	10	5	10	15	5	15	5	15	10	10	25	10	10	10	5	10,59
	d	50	60	40	60	60	60	60	55	60	55	60	50	40	50	60	55	55	54,71
	a+b	35	35	50	35	30	25	35	30	35	40	30	40	35	40	30	35	40	35,29

		Données de mobilités (%) estimées par chaque lecteur pour l'échantillon tms2																	
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	moyenne
Type de Mobilité	a	30	35	30	35	30	70	80	75	60	70	50	60	30	50	40	45	70	50,59
	b	50	45	50	40	45	5	5	5	30	15	20	25	55	25	30	25	15	28,53
	c	5	5	5	5	5	15	5	10	5	5	20	0	5	5	5	5	5	6,47
	d	15	15	15	20	20	10	10	10	5	10	10	15	10	20	25	25	10	14,41
	a+b	80	80	80	75	75	75	85	80	90	85	70	85	85	75	70	70	85	79,12

		Données de mobilités (%) estimées par chaque lecteur pour l'échantillon tms5																	
Lecteur		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	moyenne
Type de Mobilité	a	30	30	30	30	30	45	60	60	45	40	50	40	45	40	20	30	15	37,65
	b	40	40	40	45	40	25	25	15	30	20	20	40	20	25	35	30	45	31,47
	c	5	5	5	0	0	5	5	5	10	5	20	5	5	5	5	5	5	5,59
	d	25	25	25	25	30	25	10	20	15	35	10	15	30	30	40	35	35	25,29
	a+b	70	70	70	75	70	70	85	75	75	60	70	80	65	65	55	60	60	69,12

Annexe VI: Erreurs pré-analytiques à éviter lors d'une lecture de la mobilité spermatique (OMS 2010)

Improper mixing of specimen before aliquot is removed : mauvaise homogénéisation

Waiting too long after slide is prepared before analysis (spermatozoa quickly lose vigour): attente trop longue pour lire la lame

Improper temperature of stage warmer (e.g. too high temperature will kill spermatozoa): température de la platine chauffante hors limites

Microscope not properly cleaned or aligned. Improper magnification : microscope pas bien nettoyé, mauvais grossissement.

Analysing around the edges of the coverslip (the spermatozoa die or become sluggish around the outer 5 mm of the coverslip): analyse sur les bords de la lamelle où les spermatozoïdes sont moins rapides

Making the assessment too slowly (other spermatozoa swim into the defined area during the assessment period): lecture trop lente de la lame.

Malfunction of multikey counter : compteur défectueux.

Errors in calculating percentages if not counted in multiples of 100: erreurs dans le calcul sur 100.

Preparative procedures that reduce motility (e.g. temperature change, vigorous mixing, contamination with toxins): autres facteurs pré-analytiques pouvant affecter la mobilité (changement de température, agitation trop importante, contamination avec des toxiques.

Annexe VII: Limites RICOS pour les paramètres spermatisques.

	Analyte	Biological Variation		Desirable specification		
		CVw	CVg	I(%)	B(%)	TE(%)
Semen-	Semen, concentration	26.8	56.4	13.4	15.6	37.7
Semen-	Semen, morphology	19.6	44.0	9.8	12.0	28.2
Semen-	Semen, progressive motility	15.2	32.8	7.6	9.0	21.6
Semen-	Semen, progressive rapid motility	18.8	51.8	9.4	13.8	29.3
Semen-	Semen, total motility	18.4	29.8	9.2	8.8	23.9
Semen-	Semen, vitality	10.3	25.8	5.2	6.9	15.4

CVw = variation biologique intra-sujet

CVG = variation biologique entre-sujet

I = spécifications souhaitables pour l'imprécision

B = spécification souhaitable pour l'inexactitude

TE = spécifications souhaitables pour l'erreur totale admissible

www.westgard.com/biodatabase1.htm

Références

Cahier de formation Bioforma. « Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin », [s.n], [s.l], 2009

Guide technique d'accréditation des méthodes en biologie médicale – Document SH GTA 04

Norme NF EN ISO 15189

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Human Reproduction. 1991 Jul;6(6):811-6.

World Health Organization. Infertility. A tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Geneva, 1991.

World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen. 5th edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.

Résumé

La formation initiale et continue du personnel en spermiologie est un élément essentiel de la qualité d'évaluation des paramètres spermatiques car la plupart de ces paramètres sont mesurés par des méthodes manuelles qui sont dépendantes de la compétence de l'observateur. L'objectif de ce travail a été de créer un plan de formation et d'habilitation du personnel en spermiologie au laboratoire d'Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction à l'hôpital Cochin, et d'appliquer ce plan à un des paramètres spermatiques étudiés, la mobilité spermatique. L'arrivée d'une nouvelle technicienne a permis la réalisation de la formation initiale suivie d'une épreuve technique qui a été validé. Des films de mobilités spermatiques ont été créés pour le maintien des compétences afin de réaliser un contrôle de qualité interne (CQI) permettant de valider l'étape analytique de la lecture de la mobilité. Au total 3 parmi les 17 lecteurs du CQI n'ont pas validé le CQI et devront réaliser des mesures correctrices. La formation initiale ainsi que les critères d'habilitation initiale proposés assurent la compétence du technicien novice. Le CQI est simple et pratique dans son utilisation, mais ne permet pas de tester les étapes préanalytiques critiques au rendu des résultats. De plus, il est indispensable de vérifier la justesse du centre par rapport à d'autres laboratoires par la participation aux évaluations externes de la qualité. Au total, ce plan de formation-habilitation va pouvoir être appliqué aux autres paramètres spermatiques.