

Université Pierre et Marie Curie  
Paris 6

**MÉMOIRE**  
**POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE**  
**« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE**  
**DE BIOLOGIE MÉDICALE »**

**VERIFICATION D'UNE METHODE DE PORTEE FLEXIBLE A**  
**Application à la mesure du VOLUME DE L'EJACULAT**  
**dans le secteur Spermologie au Laboratoire de Biologie de**  
**la Reproduction de l'hôpital Bichat**

LLABADOR – de ROYER Marie-Astrid  
2013

## **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.

**AUTEUR**

**LLABADOR - de ROYER Marie-Astrid**

Assistante Hospitalo-Universitaire

Laboratoire de Biologie de la Reproduction

Hôpital Bichat-Claude Bernard

46, rue Henri Huchard

75877 PARIS Cédex 18

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Professeur Catherine PATRAT pour m'avoir donné l'opportunité de suivre la formation du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale » et de m'apporter toute sa confiance au quotidien dans ma fonction de biologiste de la reproduction et de Responsable Assurance Qualité au sein de son service.

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Jacques DAROLLES pour ses précieux conseils et ses riches enseignements.

Toute ma considération pour Madame Fatima TOUBAIS, ingénieur responsable qualité à la Direction Qualité – Gestion des risques – Droits des Patients des HUPNVS.

Sincères remerciements aux technicien et interne de mon service qui m'ont aidée pour les manipulations dans ce travail.

Aux intervenants du Diplôme Universitaire, recevez ma gratitude pour la qualité de la formation et les échanges de leur expérience.

# SOMMAIRE

<b>GLOSSAIRE</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Présentation de la structure</b>	<b>6</b>
1.1.1. Le Groupe Hospitalier Bichat-Claude Bernard	6
1.1.2. Le pôle Biologie	7
<b>1.2. Politique qualité et avancement dans la démarche d'accréditation</b>	<b>7</b>
1.2.1. La politique qualité des HUPNVS	7
1.2.2. L'Accréditation	8
1.2.3. L'avancement vers l'accréditation en Biologie de la Reproduction	8
<b>1.3. Validation d'une méthode quantitative de portée A</b>	<b>9</b>
1.3.1. Information normative	9
1.3.2. Intérêts et objectifs de l'étude	10
1.3.3. Déroulement de l'étude	11
1.3.4. Problématique et limites de l'étude	12
<b>2. METHODOLOGIE</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Contexte de la méthode</b>	<b>13</b>
2.1.1. Intérêt clinique	13
2.1.2. Principe de la mesure du volume de sperme éjaculé	15
2.1.3. Méthode de la mesure du volume de sperme au laboratoire de BDR	15
2.1.4. Matériel	16
<b>2.2. Protocole de vérification de la mesure du volume de l'éjaculat et évaluation expérimentale des performances</b>	<b>16</b>
2.2.1. Fidélité	17
2.2.1.1. Evaluation de la répétabilité	17
2.2.1.2. Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)	18
2.2.2. Approche de la justesse	19
2.2.3. Estimation de l'incertitude de mesure	20
<b>2.3. Rapport de validation d'une méthode quantitative de portée A</b>	<b>25</b>
<b>3. CONCLUSION</b>	<b>26</b>
<b>4. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>27</b>
<b>5. ANNEXES</b>	<b>29</b>

## GLOSSAIRE

AHU : Assistante Hospitalo-Universitaire

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

AP-HP : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris

BDR : Biologie de la Reproduction

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation

CV : Coefficient de Variation

DU : Diplôme Universitaire

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

ET : Ecart-Type

GH : Groupe Hospitalier

GTA : Guide Technique d'Accréditation

HPST : Hôpital, Patients, Santé et Territoires

HUPNVS : Hôpitaux Universitaires Paris Nord-Val de Seine

ISO : International Organization for Standardization (organisation internationale de normalisation)

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PUI : Pharmacie à Usage Interne

RAQ : Responsable Assurance Qualité

UF : Unité Fonctionnelle

WHO : World Health Organization

§ : paragraphe

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Présentation de la structure

### 1.1.1. Le Groupe Hospitalier Bichat-Claude Bernard

L'hôpital Bichat-Claude Bernard est un Centre Hospitalier Universitaire de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), situé dans le 18<sup>ème</sup> arrondissement de Paris. Il est né en 1970 de la fusion de l'hôpital Bichat (ouvert en 1882) et de l'hôpital Claude Bernard (ouvert en 1905).

Doté d'environ 1000 lits, il assure à la fois une prise en charge de proximité, avec l'un des plus importants services d'accueil des Urgences en médecine et en chirurgie de l'agglomération parisienne, et une prise en charge spécialisée et de référence dans la plupart des disciplines médicales et chirurgicales.

Son territoire de santé couvre les 17<sup>ème</sup>, 18<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> arrondissements ainsi que la commune de Saint-Ouen.

L'hôpital Bichat-Claude Bernard est également universitaire, conventionné avec l'université Paris VII Diderot. Il accueille 9 unités INSERM et dispose d'un pôle de recherche clinique et de santé publique.

Depuis janvier 2011, parmi les 13 groupes de l'AP-HP, l'hôpital Bichat-Claude Bernard fait partie du groupe « Hôpitaux Universitaires Paris Nord - Val de Seine » (HUPNVS).

Ce dernier comprend 5 sites :

- l'hôpital Bichat - Claude Bernard
- l'hôpital Beaujon
- l'hôpital Bretonneau
- l'hôpital Louis Mourier
- l'hôpital Charles Richet.

### 1.1.2. Le pôle Biologie

Le pôle Biologie est un des 15 pôles créés au sein des HUPNVS.

<b>Biologie - Pharmacie à Usage Interne (PUI)</b>	Imagerie-Pathologie	Digestif	Cœur-Vaisseaux	Thorax-Vaisseaux	Santé publique, Recherche clinique, Information médicale	Gériatrie	Adulte proximité
Addictologie-Gériatrie-Pédopsychiatrie-Psychiatrie-Médecine Physique et de Réadaptation (AGAPPP)		Femme-Enfant	Urologie-Gynécologie-Obstétrique	Maladies systémiques et Cancérologie	Tête-Cou-Orthopédie-Rachis	Infectieux	Urgence-Réanimation-Anesthésie

Tableau 1 : Les 15 pôles des HUPNVS

Le Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) des HUPNVS est constitué des fonctionnelles (UF) des différents groupes hospitaliers (GH), réunies en une même entité. Le LBM est donc un **laboratoire multisite**, comprenant 3 sites (Bichat, Beaujon et Louis Mourier) (*cf Annexe I*).

L'UF de Biologie de la Reproduction de Bichat, dirigée par le Professeur Catherine Patrat, fait partie du pôle Biologie-PUI des HUPNVS.

## 1.2. Politique qualité et avancement dans la démarche d'accréditation

### 1.2.1. La politique qualité des HUPNVS

Les HUPNVS développent et mettent en œuvre une politique qualité au sein des 5 sites, ayant pour objet d'améliorer la prise en charge des usagers et d'être à leur écoute afin de mieux répondre à leurs demandes.

Tous les 4 ans, des axes d'amélioration sont décidés par la direction des HUPNVS, encadrés par la directrice qualité et mis en œuvre par les équipes sur le terrain.

### **1.2.2. L'Accréditation**

Après la publication de la loi HPST (Hôpital, Patients, Santé et Territoires) le 21 juillet 2009, l'ordonnance d'application du 13 janvier 2010 relative à la réforme de la biologie médicale en France rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) publics et privés selon la norme internationale **NF EN ISO 15189** (dernière version parue en décembre 2012 mais version 2007 toujours en vigueur jusqu'en 2015) « Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence » [1]. Cette accréditation est délivrée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Pour l'obtenir, les laboratoires doivent respecter les exigences de la norme NF EN ISO 15189.

Les LBM, publics et privés, doivent être accrédités au 1<sup>er</sup> novembre 2020 sur la totalité de leurs activités (50% en 2016 et 100% en 2020). Au 1<sup>er</sup> novembre 2013, ils doivent fournir la preuve d'engagement dans la démarche d'accréditation.

C'est ainsi que le pôle Biologie des HUPNVS, accompagné de la direction qualité, a entrepris une démarche d'accréditation (*cf Annexe II et III*).

### **1.2.3. L'avancement vers l'accréditation en Biologie de la Reproduction**

Afin de prouver son entrée effective dans la démarche d'accréditation, le LBM des HUPNVS a déposé auprès du COFRAC une demande d'accréditation partielle en octobre 2012 (voie A).

Le service de Biologie de la Reproduction (BDR) participe à la mise en œuvre de la démarche d'accréditation (*cf Annexe IV*). Une partie des activités techniques de spermologie a été choisie comme portée partielle d'accréditation du GH HUPNVS. Un dossier de validation de méthodes a d'ailleurs été remis en avril 2013.

Pharmacien biologiste spécialisée en Assistance Médicale à la Procréation (AMP), je suis actuellement Assistante Hospitalo-Universitaire (AHU) dans le service de Biologie de la Reproduction.

Depuis le 1<sup>er</sup> novembre 2012, je suis également le Responsable Assurance Qualité du service (RAQ). A ce titre, d'une part je pilote le processus d'accréditation en BDR, et d'autre part je dynamise l'application du système de management de la qualité au sein de mon service. C'est dans cette optique que j'effectue le Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale » cette année qui contribue à valider mes compétences en tant que RAQ.

### **1.3. Validation d'une méthode quantitative de portée A**

#### **1.3.1. Information normative**

Les exigences organisationnelles et techniques pour la réalisation d'examens de biologie médicale sont mentionnées dans le document **SH REF 02** [2]. Celui-ci précise et complète les dispositions législatives et réglementaires applicables relatives à la qualité des pratiques en biologie médicale ainsi que les exigences normatives du COFRAC.

Les types de portée d'accréditation et leurs modalités d'évaluation par le COFRAC pour les examens de biologie médicale sont présentés dans le document **SH REF 08** [3].

Dans la norme NF EN ISO 15189, la validation est abordée aux paragraphes 5.3 et 5.5. :

- § 5.3.1.2 : « *Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre la performance nécessaire et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés. Cette exigence s'applique au matériel utilisé dans le laboratoire, au matériel prêté ou au matériel utilisé dans des locaux associés ou mobiles par des tiers autorisés par le laboratoire.* »

- § 5.5.1.1 : « *Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue.* »

- § 5.5.1.2 : « *Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement.* » ; « *La vérification indépendante menée par le laboratoire doit confirmer, par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que*

*les performances annoncées pour la procédure analytique ont été satisfaites. Les performances annoncées pour la procédure analytique confirmées pendant le processus de vérification doivent être appropriées à l'utilisation prévue des résultats d'examen. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification et enregistrer les résultats obtenus.»*

*- § 5.5.1.3 : «Le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes :a) les méthodes non normalisées ;b) les méthodes conçues ou développées par le laboratoire ;c) les méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application prévu ;d) les méthodes validées, puis modifiées. La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la validation et enregistrer les résultats obtenus. »*

Le guide technique **SH GTA 04** [4] explicite les exigences des paragraphes 5.3 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15189 concernant la **vérification sur site/validation des méthodes en biologie médicale**, en se fondant sur les bonnes pratiques dans ce domaine et les performances communément observées et acceptées (état de l'art).

Le LBM doit démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire les exigences de la norme.

### **1.3.2. Intérêts et objectifs de l'étude**

Afin de réaliser la vérification/validation de ses méthodes, le LBM analyse et définit pour chaque examen la nature des opérations à mettre en œuvre en fonction :

- du **type de flexibilité** :

- Méthode « fournisseur » (portée flexible standard A), dite adoptée, avec uniquement une vérification de performances sur site,
- Méthode adaptée ou développée en interne (portée flexible étendue B), avec une validation de méthode.

- du **type de méthode** (quantitatif ou qualitatif).

D'autre part, pour respecter les exigences de la norme NF EN ISO 15189, le LBM des HUPNVS a rédigé une procédure de vérification/validation d'une méthode décrivant sa démarche et les données expérimentales établies sur site dans le cas d'une portée de type A et/ou de type B.

L'adoption de portées de type flexible s'accompagne d'une procédure de "gestion de la portée flexible" listant l'ensemble des opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement de méthode ou de réactif ne faisant pas intervenir de compétence nouvelle.

Ainsi, en BDR, étant donné que la Spermiologie a été choisie comme portée partielle d'accréditation, j'ai pris en charge en particulier de valider le **volume d'un éjaculat**, en m'appuyant sur le document SH GTA 04 [4], la procédure du LBM des HUPNVS et sur la fiche-type **SH FORM 43** [5].

Il s'agit d'une méthode **quantitative** puisque qu'elle fournit un résultat chiffré en relation directe avec une quantité.

Elle dépend de la **portée flexible standard A** car il s'agit d'une méthode reconnue (méthode de référence). Conformément au document SH REF 08 [8], une méthode reconnue est a priori validée dans son domaine d'application. Selon l'exigence de la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.5.1.2), le LBM doit s'assurer que « *Les performances annoncées pour la procédure analytique* » sont « *appropriées à l'utilisation prévue des résultats d'examen.* » et qu'elles sont « *satisfaites* » « *par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances)* »

Nous avons alors effectué une **vérification sur site** des performances de la méthode de façon à confirmer la validité des résultats.

### **1.3.3. Déroulement de l'étude**

La vérification d'une méthode comprend une phase initiale, avant sa mise en œuvre effective en routine, et une phase de vérification continue et de confirmation des performances, dans le cadre du fonctionnement normal et quotidien du laboratoire.

Notre étude s'est attachée à la phase initiale et a consisté en différentes étapes :

- évaluer en détail le contexte de la méthode (présentation de l'intérêt clinique, du principe de la méthode, du matériel, du mode opératoire) en nous appuyant sur une étude de documents bibliographiques
- élaborer le protocole de validation en déterminant les critères de performance à évaluer (en justifiant ceux à vérifier et ceux qui ne sont pas jugés nécessaires) et les limites acceptables
- définir le plan expérimental et réaliser les vérifications expérimentales
- exploiter et analyser les résultats (traitement statistique des données obtenues)
- effectuer le rapport de validation/vérification (conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique)

#### **1.3.4. Problématique et limites de l'étude**

L'évaluation au laboratoire consiste à vérifier que les performances annoncées par les fournisseurs sont satisfaites dans les conditions réelles d'utilisation au laboratoire.

Au cours de notre vérification de méthode quantitative de portée A appliquée à la mesure du volume de sperme, nous avons été confrontés à une difficulté. En effet, en l'absence de données bibliographiques relatives aux critères de performance, les limites d'acceptabilité ont été choisies en fonction de la pertinence clinique.

## 2. METHODOLOGIE

### 2.1. Contexte de la méthode

Deux sources bibliographiques décrivent la méthode de référence de la mesure du volume de l'éjaculat : les recommandations de l'OMS [6] et le cahier Bioforma [7]. Nous nous sommes donc appuyés sur ces documents dans notre étude.

#### 2.1.1. Intérêt clinique

L'évaluation du volume du sperme, caractéristique physique de l'éjaculat, permet d'apprécier une partie du caractère fertile du sperme et fournit des informations indirectes sur l'état de la voie génitale masculine et des glandes associées. C'est en effet le premier paramètre évalué lors du spermogramme, ce dernier étant l'examen de première intention au cours du bilan masculin d'infertilité.

Dans la 5<sup>ème</sup> Edition OMS [6], la valeur de référence de la limite inférieure du volume spermatique est de 1,5 ml (5<sup>ème</sup> percentile, intervalle de confiance 95%, 1,4 -1,7).

La mesure précise du volume est essentielle lorsqu'on évalue le sperme, parce que cela permet notamment de calculer le nombre total de spermatozoïdes et de cellules rondes dans l'éjaculat.

Le volume d'un éjaculat reflète l'équilibre des sécrétions des différentes glandes annexes de l'appareil génital masculin, principalement des vésicules séminales (60%) et de la prostate (30%) et de façon moindre par les épидидymes et les glandes bulbo-urétrales [6]. En effet, ces sécrétions constituent le liquide séminal auquel viennent s'ajouter les spermatozoïdes au moment de l'éjaculation.

Le volume de l'éjaculat peut être influencé par des **facteurs non pathologiques** :

- le non-respect du délai d'abstinence sexuelle (temps depuis la dernière éjaculation)
- la perte d'une fraction de l'éjaculat lors du recueil.

Une mesure précise du volume revêt un caractère important pour le diagnostic.

Une **hypospermie** (volume d'éjaculat strictement inférieur à 1,5 ml) peut correspondre à plusieurs situations indépendantes et se doit d'être explorée après avoir été confirmée sur plusieurs recueils. Elle peut traduire une atteinte des voies excrétrices et/ou des glandes participant à l'élaboration du sperme (vésicules séminales, prostate, anse épидидymo-déférentielle...): obstruction des canaux éjaculateurs, absence congénitale bilatérale des canaux déférents [8, 9, 10, 11], dysgénésie des vésicules séminales, obstruction d'origine infectieuse.

- un hypogonadisme (caractérisé par un déficit androgénique), l'activité sécrétoire de la prostate et des vésicules séminales étant en partie androgéno-dépendante [12] :

- dysfonctionnement sécrétoire des glandes annexes de l'appareil génital mâle (vésicules séminales, prostate, épидидyme)
- dysfonctionnement de l'innervation cholinergique et adrénergique des parois du tractus (qui intervient également dans la régulation des activités sécrétoires et dans la proportion respective des différentes sécrétions dans la composition du liquide séminal)

- une éjaculation rétrograde (reflétée par un volume très faible de manière répétée)

Le volume et la composition du liquide séminal sont altérés dans tout processus inflammatoire de l'appareil génital qui provoque en général une **hyperspermie** (volume très important).

Il faut cependant prendre soin, au moment de l'interprétation, d'éliminer les biais pouvant expliquer une hypospermie : une perte d'une fraction de l'éjaculat lors du recueil (recueil incomplet de sperme) ou un délai d'abstinence sexuelle trop court (< 2 jours). De plus, le volume du sperme diminue progressivement avec l'âge (sans altération des autres paramètres).

Par ailleurs, il existe des variabilités intra-individuelles (stress, tabac, sport...) et inter-individuelles (photopériode, saison...).

### **2.1.2. Principe de la mesure du volume de sperme éjaculé**

Selon les dernières recommandations de l'OMS [6], le volume de l'éjaculat est soit déterminé en utilisant une pipette graduée (mesure faite à 0,1 ml près) soit estimé par pesée (balance à deux décimales). Dans les deux cas, il s'agit d'une méthode manuelle.

La mesure du volume est préférentiellement recommandée par calcul à partir de la méthode par pesée du flacon contenant l'éjaculat plutôt que par la méthode d'aspiration de l'éjaculat directement à l'aide d'une pipette graduée. En effet, d'une part la pipette graduée ne permet pas d'aspirer réellement tout l'éjaculat, et d'autre part la viscosité d'un échantillon amène à mesurer le volume par défaut. Ainsi, le volume peut être sous-estimé de 0,3 à 0,9 ml si on utilise une pipette graduée [13, 14, 15].

L'intérêt principal de la pesée est donc de disposer de données plus précises, essentiellement lorsqu'il s'agit d'échantillons visqueux. Il est admis que la densité du sperme est voisine de 1 g/ml puisque, selon les études, elle varie entre 1,043 et 1,102 g/ml [13, 15, 16].

### **2.1.3. Méthode de la mesure du volume de sperme au laboratoire de BDR**

Le volume est pesé directement sur une balance de précision en suivant une méthodologie rigoureuse (*cf Annexe V*) :

- pré-peser le réceptacle à vide
- peser le réceptacle contenant l'éjaculat (après liquéfaction du sperme)
- calculer le volume (en estimant que la densité du sperme est de 1g/ml) :

Volume (ml) = poids du réceptacle avec éjaculat (g) – poids du réceptacle vide (g)

#### **2.1.4. Matériel**

- Réceptacle ionisé stérile de 100 ml à usage unique et qui se ferme hermétiquement (marque JCD) n° lot 461658 (date limite d'utilisation juin 2015)
- Balance de précision (instrument de pesage à fonctionnement non automatique) (marque OHAUS) Pioneer (n° série 8732513594) étalonnée le 31/10/12 par un organisme expert en métrologie et accrédité COFRAC et exclusivement dédiée à la pesée des flacons de recueil de sperme.

#### **2.2. Protocole de vérification de la mesure du volume de l'éjaculat et évaluation expérimentale des performances**

La vérification de la méthode a été réalisée par trois opérateurs du laboratoire habilités pour les actes techniques de spermologie : le technicien référent qualité, un interne en biologie médicale et moi-même.

Pour évaluer les performances de notre technique de mesure du volume du sperme par pesée, nous avons étudié les différents paramètres nécessaires à la vérification d'une méthode quantitative de portée A déterminés par le SH GTA 04 [4] et conformément à la procédure générale du LBM.

Néanmoins, nous avons été confrontés à une difficulté dans notre démarche. En effet, notre choix des critères de performance n'a pu s'appuyer ni sur des recommandations de sociétés savantes, de consensus ou de publications scientifiques, ni sur des comparaisons inter-laboratoire car il n'en existe pas. De ce fait, notre choix s'est effectué en tenant compte de la pertinence clinique.

### **2.2.1. Fidélité**

La fidélité (ou précision) est appréciée par l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité intra-laboratoire. Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre des mesures répétées du même échantillon dans des conditions précisées. Elle est évaluée en fonction de la dispersion des résultats par rapport à la moyenne, cette dispersion étant représentée par l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV).

#### **2.2.1.1. Evaluation de la répétabilité**

Principe :

En pratique, l'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon de sperme dans les mêmes conditions standardisées.

Vérification sur site :

Les essais ont été effectués en suivant le mode opératoire (*cf Annexe V*).

Les conditions du test ont été identiques pour toutes les mesures : même jour, même horaire, même opérateur, même lot de réceptacles, même balance de précision.

Pour évaluer la répétabilité de la méthode, nous avons choisi 3 niveaux de volume de sperme : volume faible, volume moyen et volume élevé.

Pour chaque niveau, le volume a été mesuré 30 fois de suite.

Les résultats rangés dans un tableau Excell ont permis de calculer les moyenne, ET et CV de répétabilité pour les 30 valeurs (cf Annexe VI).

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs)	Conclusion
Niveau 1	30	0,44	0,004	<b>0,86</b>	.	.	<b>conforme</b>
Niveau 2	30	3,10	0,005	<b>0,16</b>	.	.	<b>conforme</b>
Niveau 3	30	7,52	0,005	<b>0,06</b>	.	.	<b>conforme</b>

Les CV de la répétabilité sont acceptables par rapport à la pertinence clinique que représente le volume dans un éjaculat.

Conclusion : **Méthode répétable**

#### **2.2.1.2. Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)**

Principe :

Il s'agit d'un critère important étant donné que c'est une composante majeure de l'incertitude de mesure (l'écart-type de la reproductibilité sera repris pour l'estimation de l'incertitude).

Cette évaluation permet de connaître la variabilité analytique d'une méthode. L'objectif est de prendre en compte tous les facteurs d'influence, sources de dispersions aléatoires : balance, réceptacle, opérateur, température, etc. En effet, ces facteurs peuvent être des données variables, correspondant à une activité normale du laboratoire.

La reproductibilité se mesure sur une période longue. La période de 2 semaines nous a permis d'évaluer ce critère de performance, mais il faudrait une période encore plus longue pour l'établir vraiment (plusieurs mois).

En pratique, l'essai de reproductibilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes.

Vérification sur site :

Les essais ont été effectués en suivant le mode opératoire (cf Annexe V).

Les conditions du test ont été les suivantes : même balance de précision, même lot de réceptacle, opérateurs différents.

Pour évaluer la reproductibilité de la méthode, nous avons choisi 2 niveaux de volume (< 1.5 ml et > 1.5 ml) (2 réceptacles contenant un éjaculat).

Pour chaque sperme, le volume a été mesuré deux fois par jour pendant 15 jours consécutifs, par trois opérateurs différents.

Les résultats rangés dans un tableau Excell ont permis de calculer les moyenne, ET et CV de reproductibilité pour les 30 valeurs (cf Annexe VII).

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs)	Conclusion
Niveau 1	30	0.89	0,002	<b>0.28</b>	.	.	<b>conforme</b>
Niveau 2	30	3.35	0,006	<b>0.19</b>	.	.	<b>conforme</b>

Les CV de la fidélité intermédiaire sont acceptables par rapport à la pertinence clinique que représente le volume dans un éjaculat.

Conclusions : **Méthode reproductible**

### 2.2.2. Approche de la justesse

Principe :

L'essai de justesse a pour objectif d'évaluer le biais de la méthode. En théorie, le résultat du dosage d'un échantillon biologique de contrôle devrait être analysé en parallèle avec celui obtenu par la méthode de référence. Il est possible d'effectuer le test de justesse en utilisant la moyenne des résultats des différents laboratoires participant à un programme d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ), considérée

alors comme « valeur vraie » à défaut d'utiliser le résultat obtenu par une méthode de référence.

**Concernant la mesure du volume du sperme, la pesée est considérée comme la méthode de référence [6].**

La justesse est évaluée par le biais estimé en comparant la moyenne (m) obtenue lors de l'étude de la fidélité intermédiaire des groupes de pair à la valeur cible assimilée à la valeur vraie (v).

Vérification sur site :

L'évaluation de la justesse n'a pu être appliquée car nous ne disposons pas de CIQ externalisés ni d'EEQ afin de comparer notre valeur du volume obtenue de notre laboratoire à la valeur cible de l'essai inter-laboratoire.

De plus, il s'agit d'une méthode de pesée et donc dépendante de la métrologie : la justesse correspond en fait à celle de la balance de précision et l'opérateur n'intervient que très peu comme l'a montré l'évaluation de la fidélité intermédiaire.

### **2.2.3. Estimation de l'incertitude de mesure**

L'estimation de l'incertitude de mesure sur les résultats est une exigence de la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.5.1.4) :

*« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée... » ; « ...doit définir les exigences de performances pour l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure, et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure.*

*Note 1 : Les composantes d'incertitude de mesure sont celles associées au processus de mesure réel, depuis la présentation de l'échantillon à la procédure de mesure jusqu'à l'obtention de la valeur mesurée.*

*Note 2 : Les incertitudes de mesure peuvent être calculées à l'aide de grandeurs obtenues par la mesure de matériaux de contrôle dans les conditions de fidélité intermédiaire comprenant autant de modifications communes que raisonnablement possible dans le déroulement normalisé d'une procédure de mesure (par exemple modifications des lots de*

réactifs et d'agents d'étalonnage, différents opérateurs, maintenance planifiée des instruments). »

« Le laboratoire doit tenir compte de l'incertitude de mesure lors de l'interprétation des grandeurs mesurées. »

Cette étape comprend à la fois **l'étude de risques** (consistant à lister les paramètres d'influence et les moyens de maîtrise associés) et **l'estimation de l'incertitude** sur les résultats d'analyses.

Nous avons effectué l'étude de l'incertitude en tenant compte des différents facteurs d'influence. Pour cela, nous avons utilisé le **diagramme des 5 M** : **M**atières, **M**atériel, **M**ain d'œuvre, **M**ilieu, **M**éthodes.

La réalisation du diagramme d'Ishikawa repose sur 5 éléments (6 si on tient compte du Management) permettant d'identifier les principaux facteurs d'influence susceptibles d'introduire une variation significative sur le résultat.

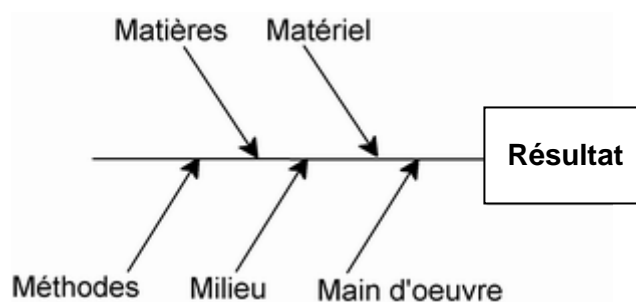


Schéma 1 : Diagramme d'Ishikawa

- **Analyse de risques**

<b>MAITRISE DES RISQUES</b>		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<p><b>MATIERE :</b>  <b>Sperme éjaculé</b></p> <p>Type d'échantillon primaire (urine, sang,...)  Type de récipient (tubes, ...)  Additifs</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modalités de recueil (phase pré-analytique) du sperme éjaculé</li> <li>- Réceptacle de recueil adapté et intègre, à usage unique et fermé hermétiquement par un bouchon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modes opératoires « Accueil au laboratoire de BDR » « Installation en vue de prélèvement de sperme »</li> <li>- Respect des conditions de prélèvement (affichage et explication orale)</li> <li>- Exigence fournisseur flacon de recueil de sperme</li> <li>- Date de péremption flacon de recueil</li> </ul>
<p><b>MATERIEL</b></p> <p>Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...)</p> <p>Equipements : Exigences métrologiques (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques spécifiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incubation (liquéfaction de l'éjaculat)</li> <li>- Homogénéisation du sperme</li> <li>- Etuve à 35°C ± 2°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect du temps de liquéfaction (au moins 30 minutes et moins d'1 heure) et de la température de l'étuve (35°C +/- 2°C)</li> <li>- Respect de la procédure en cas de sperme non liquéfié au bout d'une heure</li> <li>- Surveillance métrologique de la température de l'étuve</li> <li>- Contrat de maintenance étuve</li> </ul>

<b>MAITRISE DES RISQUES</b>		
<b>Données d'entrée</b>	<b>Points critiques à maîtriser</b>	<b>Modalités de maîtrise</b>
	- Balance de précision	- Surveillance métrologique de la balance : étalonnage annuel par un organisme accrédité COFRAC  - Respect des préconisations de l'utilisation de la balance (stabilisation de la tare)
<b>MAIN D'OEUVRE</b> (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	- Personnel habilité (technicien, biologiste, interne) en secteur spermologie, niveau 1	- Procédure « Habilitation du personnel de laboratoire »  - Fiches de formation, d'habilitation et de maintien de compétences (technicien, biologiste, interne)
<b>MILIEU</b> Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	- Local de travail dédié à la spermologie pour éviter une activité intense et des mouvements d'air - Balance à l'abri des courants d'air, des rayons du soleil, des vibrations, réservée à la spermologie	- Paillasse à proximité des salles de recueil  - Protection adaptée pour la balance, sur un plan de travail stable
<b>METHODES</b>	- Mesure du volume de l'éjaculat	- Manuel de l'OMS 2010  - Mode opératoire « Mesure du volume de l'éjaculat »

- **Calcul de l'incertitude**

Le document SH GTA 14 apporte des précisions sur les incertitudes de mesures en biologie médicale [17].

Principe :

Le calcul d'incertitude de mesure permet d'évaluer les erreurs se produisant lors de mesures liées à la vérification d'une relation entre différentes grandeurs physiques. Les instruments de mesure n'étant pas de précision infinie, les mesures faites pendant une expérience ne sont pas exactes. Il faut donc évaluer ces incertitudes.

Pour évaluer l'incertitude de mesure, il convient de retenir comme principales composantes :

- l'incertitude liée à l'étalonnage
- l'incertitude liée à la méthode de mesure
- l'incertitude liée à d'autres facteurs (lorsque cela est nécessaire)

Le calcul de l'incertitude (U résultat) correspond alors à :

$$U \text{ résultat} = \sqrt{U^2 \text{ étalonnage} + U^2 \text{ méthode} + U^2 \text{ divers}}$$

Bien que ce paramètre ne soit pas considéré comme pertinent dans notre vérification de méthode, nous avons choisi d'essayer d'estimer l'incertitude de mesure.

Celle-ci est exprimée sous forme d'incertitude élargie, en utilisant un facteur d'élargissement k (k=2 étant conseillé pour un intervalle de confiance de 95 %).

L'incertitude sur la valeur assignée à la balance (étalonnage de la balance) nous a été transmise par le fournisseur de la balance. Il s'agit de l'incertitude élargie correspondant aux 2 niveaux de pesée :

$$U \text{ (balance) niveau 1 (poids étalon de 1 g)} = 0,0005 \text{ g}$$

$$U \text{ (balance) niveau 2 (poids étalon de 2 g)} = 0,0006 \text{ g}$$

L'incertitude liée à la méthode de mesure proprement dite est estimée correspondre à la fidélité intermédiaire (approchée par l'écart-type de reproductibilité), ce qui inclut les incertitudes liées aux différentes étapes de la phase analytique, soit :

$$U \text{ (méthode) niveau 1} = 2 \times 0,002537081 = 0,0050 \text{ g}$$

$$U \text{ (méthode) niveau 2} = 2 \times 0,006288102 = 0,0126 \text{ g}$$

Vérification sur site :

<b>INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :</b>	
<b>Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :</b>	$\sqrt{(U \text{ méthode}^2 + U \text{ balance}^2)} = \sqrt{(ET^2 + U \text{ balance}^2)}$
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 1) :</b>	<b>0,0050</b>
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 2) :</b>	<b>0,0126</b>
<b>Interprétation :</b>	<b>Incertitude négligeable</b>

Conclusion : **Acceptable**

L'incertitude calculée pour les 2 niveaux de volume de sperme est négligeable.

On constate cependant que l'opérateur a un impact plus important que la balance, alors qu'on s'attend a priori à observer que le risque réel se porte sur la balance elle-même, et non pas sur l'acte technique de la pesée. Néanmoins, l'intervention de l'opérateur est négligeable comme le montre l'évaluation de la reproductibilité intra-laboratoire.

### **2.3. Rapport de validation d'une méthode quantitative de portée A**

La fiche-type SH FORM 43 reprend les principales indications concernant la vérification de la méthode de mesure du volume de l'éjaculat (*cf Annexe VIII*).

La méthode a été validée le 8/02/2013.

### 3. CONCLUSION

La méthode de mesure du volume de l'éjaculat est validée.

Bien que nous ne disposons pas de références bibliographiques relatives aux critères de performance, nous avons pu établir un plan expérimental. Celui-ci a permis de conclure que les CV de répétabilité et de reproductibilité sont acceptables, et que les incertitudes sont cliniquement négligeables. Une étude de risques nous a amené à exposer précisément toutes les erreurs pouvant apparaître au cours de la mesure du volume de l'éjaculat et notre façon de les maîtriser.

Alors que le manuel de l'OMS de 2010 [6] et le cahier de Bioforma [7] exigent de rendre un résultat de mesure du volume de l'éjaculat à 0,1 ml près, nous nous interrogeons encore sur la pertinence de cette précision sur le plan clinique.

Cette étude a contribué également à former puis habilitier l'ensemble des techniciens, des internes de biologie médicale et des biologistes du service à la mesure du volume de l'éjaculat par la pesée. Ainsi, nous avons établi que la formation se réalise par l'apprentissage de l'utilisation de la balance, et l'habilitation et le maintien des compétences par la pesée de dix échantillons en comparaison avec un opérateur déjà habilité.

Enfin, en prenant exemple sur cette vérification de méthode, nous avons pu également effectuer les vérifications des autres examens (quantitatifs et qualitatifs) du spermogramme (concentration des spermatozoïdes et des cellules rondes, mobilité, vitalité, pH, agglutination, viscosité).

## 4. BIBLIOGRAPHIE


1. NF EN ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR, 2012.
2. SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. COFRAC, 2013.
3. SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. COFRAC, 2010.
4. SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. COFRAC, 2011.
5. SH FORM 43. Fiche Type Quantitatif. COFRAC, 2011.
6. World Health Organization WHO. Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen. Cambridge University Press, UK. (2010) (5th edition).
7. Cahier de formation biologie médicale n°42. Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin. Bioforma, 2009.
8. de la Taille A, Rigot JM, Mahe O, Vankemmel R, Gervais R, Dumur V, et al. *Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens*. Br J Urol 1998;**81**:614-9.
9. Weiske WH, Sälzler N, Schroeder-Printzen I, Weidner W. *Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia*. Andrologia 2000;**32**:13-8.
10. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieuxset R. *Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling*. Fertil Steril 2000;**74**:1164-74.

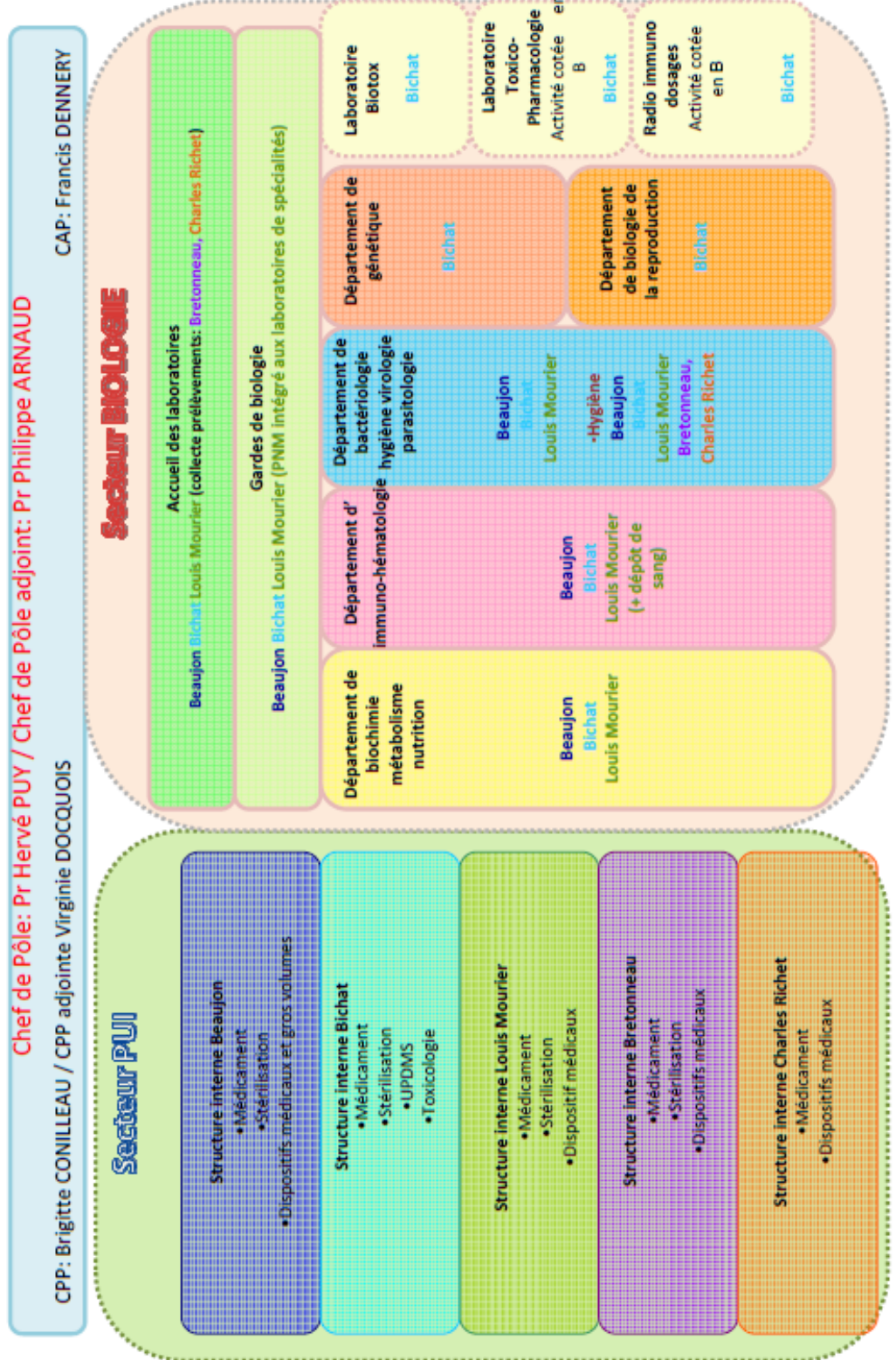
11. von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, et al. *Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples.* J Clin Endocrinol Metab. 1999; **84**(7).
12. Robin G, Marcelli F, Mitchell V, Marchetti C, Lemaitre L, Dewailly D, et al. *Why and how to assess hypospermia?* Gynecol Obstet Fertil. 2008;**36**(10):1035-42.
13. Brazil C, Swann SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB, et al. *Standardized Methods for Semen Evaluation in a Multicenter Research Study.* J Androl. 2004; **25**:635-644.
14. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T, et al. *Semen quality of 324 fertile Japanese men.* Human Reprod. 2006; **21**:760-765.
15. Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. *Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipette or decanted into cylinders from the collection vessel.* J Androl. 2007; **28**(1).
16. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. *Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years.* The New England Journal of Medicine. 1995; **332**:281-285.
17. SH GTA 14. *Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale.* COFRAC, 2011.

## 5. ANNEXES

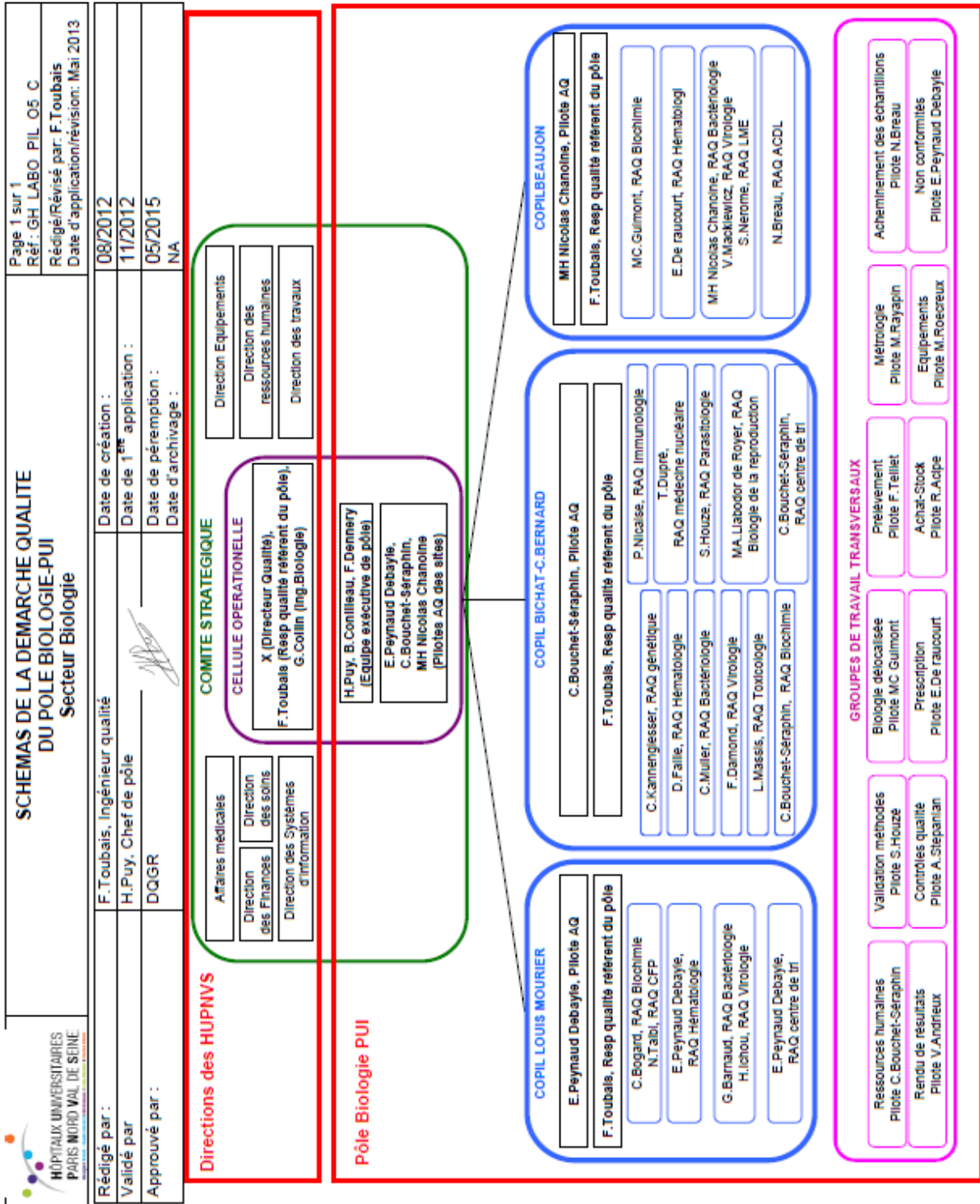
<b>Annexe I</b> : Schéma de l'organisation générale du pôle Biologie – PUI	30
<b>Annexe II</b> : Schéma de la démarche qualité du pôle Biologie – PUI - Secteur Biologie	31
<b>Annexe III</b> : Cartographie des processus – Pôle Biologie-PUI – Activités de Biologie	32
<b>Annexe IV</b> : Lettre d'engagement Qualité du Laboratoire de BDR	33
<b>Annexe V</b> : Mode opératoire « Mesure du volume de l'éjaculat »	34
<b>Annexe VI</b> : Etude de Répétabilité de la mesure du volume de l'éjaculat	36
<b>Annexe VII</b> : Etude de Reproductibilité de la mesure du volume de l'éjaculat	37
<b>Annexe VIII</b> : Fiche-type SH FORM 43 du COFRAC	38

# Annexe I


	<b>ORGANISATION GENERALE POLE BIOLOGIE - PUI</b>		Page 1 sur 1
			Ref : GH LABO PIL_04_A Rédigé/Révisé par: B. Conilleau Date d'application/révision: 11/2012
Rédigé par :	Brigitte Conilleau, CPP	Date de création :	08/2012
Validé par :	Hervé Puy, chef du pôle Biologie-PUI	Date de 1 <sup>ère</sup> application :	11/2012
Approuvé par :	DQGR	Date de préemption :	11/2014
		Date d'archivage	NA

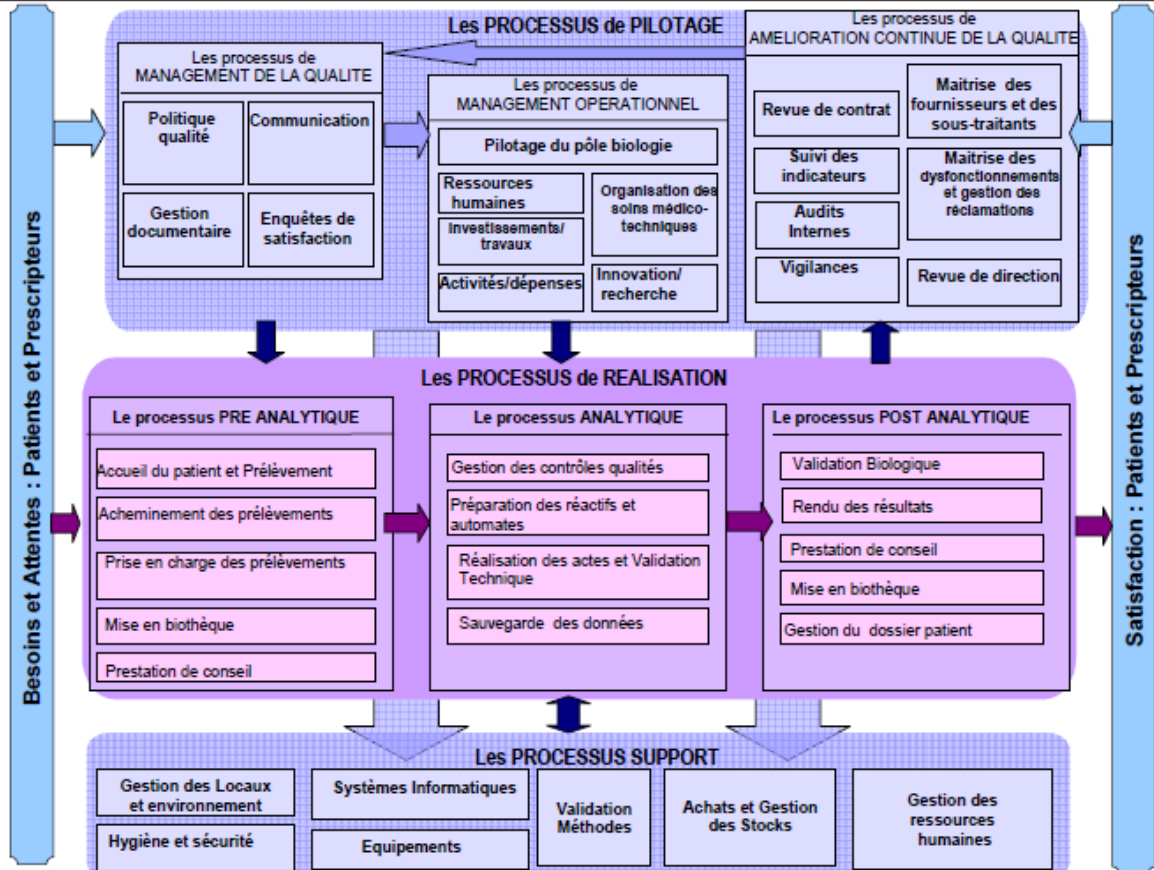


# Annexe II



## Annexe III

	<b>CARTOGRAPHIE DES PROCESSUS PÔLE BIOLOGIE-PUI ACTIVITE DE BIOLOGIE</b>		Page 1 sur 1 Réf : GH_LABO_PIL_C1_B
			Rédigé/Révisé par: F.Toubais Date d'application/révision: 10/2012
Rédigé par :	F.Toubais, ingénieur qualité ; C.Bouchet-Séraphin, PH	Date de création :	Aout 2009
Validé par :	H.Puy, chef de pôle	Date de 1 <sup>ère</sup> application :	Aout 2009
Approuvé par :	DQGR	Date de péremption :	Septembre 2014
		Date d'archivage :	NA



## Annexe IV

### LETTRE D'ENGAGEMENT QUALITE Service d'Histologie – Biologie de la Reproduction

- Le laboratoire d'Histologie-Biologie de la Reproduction de l'Hôpital Bichat assure :
- la prise en charge des couples infertiles et le bilan d'infertilité masculine par :
    - o la réalisation de consultations médicales et des examens biologiques (spermogramme, spermocytogramme, test de migration-survie, test pré-IMSI)
    - o l'envoi des prélèvements spermatiques dans les laboratoires spécialisés (Bactériologie, Virologie, Biochimie,)
    - o la participation à des staffs pluridisciplinaires décidant de la prise en charge du patient
  - la réalisation des techniques biologiques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) des patients présentant ou non un risque viral (infection de l'un ou des deux partenaires par le VIH, le VHB ou le VHC). Les différentes techniques réalisées sont l'insémination intra-utérine (IIU), la Fécondation In Vitro avec (ICSI) et sans (FIV) micromanipulation et l'IMSI (pré-sélection des spermatozoïdes à fort grossissement puis ICSI). Cette prise en charge se fait en collaboration avec l'unité de Médecine de la Reproduction de l'Hôpital Bichat.

L'ensemble du personnel du Laboratoire s'engage à mettre en œuvre une politique qualité dont les objectifs prioritaires sont de satisfaire les patients et les médecins prescripteurs et d'assurer la meilleure réponse aux projets parentaux des couples, dans le respect de la législation en vigueur et de la déontologie.

La réussite de cette politique qualité passe, entre autres, par une implication permanente et totale de l'ensemble médical et non médical de l'équipe, la familiarisation de l'ensemble du personnel avec la documentation concernant la qualité et son engagement à appliquer cette politique et suivre les procédures telles qu'elles ont été définies, et ce à tout moment. Cette politique doit également être conforme aux bonnes pratiques professionnelles en AMP et aux exigences de la norme internationale 15189.

L'ensemble du personnel médical et non médical du laboratoire s'engage à offrir aux patients pris en charge des prestations de la meilleure qualité possible, en accord avec le guide des bonnes pratiques en AMP, l'évolution des connaissances et de la norme 15189.




Docteur Catherine Patrat  
Chef de Service

Docteur Marie Astrid Llabador – de Royer  
Réfèrent Qualité



## Annexe V

 HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE	<b>Mesure du volume de l'éjaculat</b>	Page : 1 sur 2 Réf : BCH/HIST/ANA/SPR/TEC/P-1/M6/B
		Date d'application :

Rédigé par :	Achraf BENAMMAR, biologiste	Date de création :	10/06/2013
Validé par :	(nom, fonction, signature) Signature : PATRAT Catherine, chef de service	Date d'application :	12/06/2013
Approuvé par :	PATRAT Catherine, RAQ suppléant	Date de péremption :	12/06/2014

Objet(s) de la modification :	page(s) :
-------------------------------	-----------

Nombre de copies : Nombre de copies : 3 (spermiologie diagnostique, thérapeutique avec et sans risque viral)

### 1. OBJET

Evaluer précisément le volume d'un éjaculat. Fait partie du bilan spermatique (spermogramme)

### 2. DOMAINE D'APPLICATION ET PERSONNES CONCERNEES

Ne concerne que le sperme éjaculé frais

Techniciens, internes, biologistes

### 3. DOCUMENTS DE REFERENCE

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION

Bioforma Cahier de formation biologie médicale n°42 Exploration de la fonction de la reproduction – versant masculin édition 2009

### 4. DEFINITIONS ET ABREVIATIONS (le cas échéant)

### 5. MATERIELS ET REACTIF

#### 5.1. Equipement

Hotte à flux laminaire vertical cf cahier de vie

#### 5.2. Matériel

Pipette graduées 2, 5, 10 mL

Propipette

Pipettes automatiques P(10) ; P(20-200) adaptées à la manipulation des gamètes sans risque viral ou VHB, VHC, VIH

Cônes de 10 µl, 200µl stériles ou non stériles adaptées à la manipulation des gamètes sans risque viral ou VHB, VHC, VIH

Feuille de paillasse

Tenue réglementaire (BCH/HIST/HSL/P1/M2)

Balance de précision

## 6. DESCRIPTION DU PROCESSUS

Le volume de l'éjaculat fait partie du bilan standard d'un spermogramme, il renseigne sur la sécrétion des glandes annexes et permet l'estimation du nombre totale de spermatozoïdes éjaculés.

Celui-ci peut se faire de deux manières

### 6.1. MESURE DU VOLUME DIRECT :

Après le temps de liquéfaction, le réceptacle contenant l'éjaculat est posé sous la hotte à flux laminaire, une première lecture approximative du volume sur les graduations du réceptacle permet de choisir la pipette adaptée.

Si le volume semble être supérieur à 0.5 mL, prendre une pipette graduée à 2, 5, ou 10 mL, et à l'aide de la propipette, aspirer doucement tout l'éjaculat, sans faire de bulles d'air et lire le volume, puis le noter.

Si le volume semble être inférieur à 0.5 ml, prendre une pipette automatique P(1000) et un cône adapté, aspirer doucement l'éjaculat, sans faire de bulles d'air, en augmentant le volume réglé sur la pipette jusqu'à aspiration totale. Lire le volume marqué sur la pipette et le noter.

### 6.2. MESURE DU VOLUME PAR PESEE (TECHNIQUE DE REFERENCE) :

Cette technique est recommandée notamment dans les cas de sperme hyper visqueux. Elle est basée sur le principe d'une densité (d) constante du sperme frais éjaculé.

Avant que le patient ne soit installé en cabine, le réceptacle identifié à son nom et prénom est pesé à l'aide d'une balance de précision, ce poids est noté sur sa feuille de paillasse.

Après le recueil et le temps de liquéfaction, le réceptacle contenant l'éjaculat est pesé, et le poids noté sur la feuille de paillasse.

La différence des mesures représentant le poids exact de l'éjaculat, le volume peut être ainsi calculé :

$$\text{Vol (ml)} = \text{poids (g)}$$

On établie que  $d = 1 \text{ g/ml}$  et que cette valeur est constante selon les spermés.

## Annexe VI

<b>ETUDE DE LA REPETABILITE</b>
---------------------------------

**Sur un temps le plus court possible**

**Pesée du même sperme par le même opérateur 30 fois de suite**

**3 éjaculats différents correspondants chacun à un niveau de valeurs**

	<i>volume bas</i>	<i>volume moyen</i>	<i>volume haut</i>
<b>Date de l'essai</b>	06/12/2012	06/12/2012	14/12/2012
Mesure 1	0,43	3,09	7,51
Mesure 2	0,43	3,09	7,51
Mesure 3	0,43	3,09	7,51
Mesure 4	0,43	3,09	7,51
Mesure 5	0,43	3,09	7,51
Mesure 6	0,44	3,09	7,52
Mesure 7	0,44	3,09	7,52
Mesure 8	0,44	3,09	7,52
Mesure 9	0,44	3,10	7,52
Mesure 10	0,44	3,10	7,52
Mesure 11	0,44	3,10	7,52
Mesure 12	0,44	3,10	7,52
Mesure 13	0,44	3,10	7,52
Mesure 14	0,44	3,10	7,52
Mesure 15	0,44	3,10	7,52
Mesure 16	0,44	3,10	7,52
Mesure 17	0,44	3,10	7,52
Mesure 18	0,44	3,10	7,52
Mesure 19	0,44	3,10	7,52
Mesure 20	0,44	3,10	7,52
Mesure 21	0,44	3,10	7,52
Mesure 22	0,44	3,10	7,52
Mesure 23	0,44	3,10	7,52
Mesure 24	0,44	3,10	7,52
Mesure 25	0,44	3,10	7,52
Mesure 26	0,44	3,10	7,53
Mesure 27	0,44	3,10	7,52
Mesure 28	0,44	3,10	7,52
Mesure 29	0,44	3,10	7,53
Mesure 30	0,44	3,11	7,52
<b>Moyenne</b>	<b>0,438333333</b>	<b>3,097666667</b>	<b>7,519</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,00379049</b>	<b>0,005040069</b>	<b>0,004806605</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,86475062</b>	<b>0,162705348</b>	<b>0,063926116</b>

**Conclusion : CV très faible cliniquement pertinent => Méthode répétable**

## Annexe VII

<b>ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE</b>
-------------------------------------

**Pendant 2 semaines consécutives (du 16/01/2013 au 01/02/2013)**  
**Pesée d'un même éjaculat à 2 niveaux par 3 opérateurs différents**  
**Jusqu'à obtenir 30 valeurs du même éjaculat**


	<i>volume &lt; 1,5 ml</i>	<i>volume &gt; 1,5 ml</i>
Mesure 1	0,89	3,34
Mesure 2	0,89	3,34
Mesure 3	0,89	3,34
Mesure 4	0,89	3,34
Mesure 5	0,89	3,35
Mesure 6	0,89	3,35
Mesure 7	0,89	3,35
Mesure 8	0,89	3,35
Mesure 9	0,89	3,35
Mesure 10	0,89	3,35
Mesure 11	0,89	3,35
Mesure 12	0,89	3,35
Mesure 13	0,89	3,35
Mesure 14	0,89	3,35
Mesure 15	0,89	3,35
Mesure 16	0,89	3,35
Mesure 17	0,89	3,35
Mesure 18	0,89	3,35
Mesure 19	0,89	3,35
Mesure 20	0,89	3,35
Mesure 21	0,89	3,35
Mesure 22	0,89	3,35
Mesure 23	0,89	3,36
Mesure 24	0,89	3,36
Mesure 25	0,89	3,36
Mesure 26	0,89	3,36
Mesure 27	0,89	3,36
Mesure 28	0,89	3,36
Mesure 29	0,90	3,36
Mesure 30	0,90	3,36

<b>Moyenne</b>	<b>0,890666667</b>	<b>3,351333333</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,002537081</b>	<b>0,006288102</b>

<b>CV (%)</b>	<b>0,284851944</b>	<b>0,187629866</b>
---------------	--------------------	--------------------

**Conclusion : CV très faible cliniquement pertinent => Méthode reproductible**

## Annexe VIII

	<b>FICHE TYPE QUANTITATIF</b> VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	RÉFÉRENCE : SH FORM 43  INDICE DE RÉVISION : 00  DATE D'APPLICATION : 15/04/11
---	---	--

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.1.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera une fiche par examen de biologie médicale*

<b>EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :</b>
<b>Spermogramme</b>

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Volume d'un éjaculat spermatique
Principe de la Mesure :	Méthode manuelle de type Quantitatif
Méthode de mesure :	par pesée
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Sperme éjaculé
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Flacon de recueil
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Incubation (liquéfaction) Homogénéisation du prélèvement
Unités :	mL
Intervalles de référence <sup>1</sup> :	> 1.5 mL
Marquage CE (Oui/Non) :	Non Applicable
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Balance de précision
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Marque OHAUS, type Pioneer N° série : 8732513594 Max : 110 g d = 0.0001 g Date d'étalonnage : 31/10/2012
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Certificat d'étalonnage Artémis (accrédité COFRAC)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Certificat d'étalonnage Artémis (7 pages)

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Biologiste : Dr Marie-Astrid LLABADOR-de ROYER Technicien référent : Mr Christophe BENOIST Interne : Mme Gaëlle CAYROL
Procédure de validation :	GH_LABO_VAM_PT1_B
Procédure de gestion de la portée flexible :	GH/LABO/VAM/PT2/A
Période d'évaluation :	du 6/12/2012 au 7/02/2013
Date de mise en service :	Septembre 2013
Autorisation de mise en service par :	Dr Marie-Astrid LLABADOR-de ROYER et Dr Catherine PATRAT

<sup>1</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modalités de recueil (phase pré-analytique) du sperme éjaculé</li> <li>- Flacon de recueil adapté et intègre, à usage unique et fermé hermétiquement par un bouchon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modes opératoires « Accueil au laboratoire de BDR » « Installation en vue de prélèvement de sperme »</li> <li>- Respect des conditions de recueil (affichage et explication orale)</li> <li>- Exigence fournisseur flacon de recueil de sperme</li> <li>- Date de péremption flacon de recueil</li> </ul>
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incubation (liquéfaction de l'éjaculat)</li> <li>- Homogénéisation du sperme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respect du temps de liquéfaction (au moins 30 minutes et moins d'1 heure) et de la température de l'étuve (35°C +/- 2°C)</li> <li>- Respect de la procédure en cas de sperme non liquéfié au bout d'1 heure</li> </ul>
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Personnel formé et habilité (technicien, biologiste, interne) en secteur spermologie, niveau 1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Procédure « Habilitation du personnel de laboratoire » et tutorat</li> <li>- Fiches de formation, d'habilitation et de maintien de compétences (technicien, biologiste, interne)</li> </ul>
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Local de travail réservé à la spermologie (éviter une activité intense et des mouvements d'air)</li> <li>- Balance à l'abri des courants d'air, des rayons du soleil, des vibrations, et dédiée à la spermologie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paillasse à proximité des salles de recueil</li> <li>- Protection adaptée pour la balance, sur un plan de travail stable</li> </ul>
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Non Applicable	
Matériau de référence :	Non Applicable	
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etuve à 35°C ± 2°C</li> <li>- Balance de précision</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Surveillance métrologique de la température de l'étuve</li> <li>- Contrat de maintenance étuve</li> <li>- Surveillance métrologique de la balance : étalonnage annuel par un organisme accrédité COFRAC</li> <li>- Respect des préconisations de l'utilisation de la balance (stabilisation de la tare)</li> </ul>

\* item à renseigner si nécessaire



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...):

#### Répétabilité:

Pesée à 30 reprises d'un flacon (3 niveaux) dans des conditions analytiques (avec étiquette et éjaculat)

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>2</sup>	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs <sup>3</sup> )	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon niveau 1	30	0,4383	0,0038	0,8647	.	.	CONFORME
Echantillon niveau 2	30	3,0977	0,0050	0,1627	.	.	CONFORME
Echantillon niveau 3	30	7,5190	0,0048	0,0639	.	.	CONFORME

#### Conclusions :

Les CV de la répétabilité sont acceptables par rapport à la pertinence clinique que représente le volume dans un éjaculat.

#### Fidélité intermédiaire :

Pesée pendant 15 jours consécutifs de 2 flacons (2 niveaux) dans des conditions analytiques (avec étiquette et éjaculat)

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>2</sup>	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs <sup>3</sup> )	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon niveau 1	30	0,8907	0,0025	0,2848			CONFORME
Echantillon niveau 2	30	3,3513	0,0062	0,1876			CONFORME


#### Conclusions :

Les CV de la fidélité intermédiaire sont acceptables par rapport à la pertinence clinique que représente le volume dans un éjaculat.

<sup>2</sup> Nombre de chiffres significatifs

<sup>3</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>4</sup> Conforme/non conforme


	<b>FICHE TYPE QUANTITATIF</b> VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	RÉFÉRENCE : SH FORM 43 INDICE DE RÉVISION : 00 DATE D'APPLICATION : 15/04/11
---	---	--

**Justesse (approche de la) :**      **Non Applicable**

Cas des contrôles internes externalisés

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo <sup>2</sup>	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite <sup>3</sup>	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

**Conclusions :**

	<b>FICHE TYPE QUANTITATIF</b> VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	RÉFÉRENCE : SH FORM 43
		INDICE DE RÉVISION : 00
		DATE D'APPLICATION : 15/04/11

**Exactitude :** **Non Applicable**  
Cas des contrôles externes ponctuels

Echantillons	Nombre (N)	Valeur Labo <sup>5</sup>	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite <sup>6</sup>	Conclusion
Echantillon CQN								
Echantillon ponct xy								
Echantillon ponct zy								

**Conclusions :**

INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :	
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	<b>Non Applicable</b>
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	
Interprétation :	

**Conclusions :**

COMPARAISON DE METHODES :	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	<b>Non Applicable</b>
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	
Nombre de mesures :	
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	
Méthode d'exploitation des résultats :	
Equation de la droite de régression :	
Diagramme des différences et/ou des rapports :	
Conclusions et dispositions <sup>7</sup> :	

<sup>5</sup> Nombre de chiffres significatifs

<sup>6</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>7</sup> Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

### INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B)

(si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :

Mode de détermination :	<b>Non Applicable</b>
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	
Limite supérieure de linéarité :	

### INTERFERENCES

(ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :

Vérification bibliographique :	<b>Non Applicable</b>
Vérification :	

### CONTAMINATION

(indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)

Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, $\beta$ HCG) :	<b>Non Applicable</b>
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides) :	
Vérification bibliographique :	
Vérification :	

### CONCLUSION :

L'ensemble des performances de la **balance** est vérifié.  
La méthode de détermination du **VOLUME de l'éjaculat** est déclarée apte par rapport aux besoins définis par le laboratoire.

## RESUME

Afin de prouver son entrée effective dans la démarche d'accréditation selon la norme internationale NF EN ISO 15189, le laboratoire des Hôpitaux Universitaires Paris Nord – Val de Seine (HUPNVS) a déposé auprès du COFRAC une demande d'accréditation partielle en octobre 2012 (voie A).

Le service de Biologie de la Reproduction faisant partie du laboratoire des HUPNVS participe à la mise en œuvre de la démarche d'accréditation. Une partie des activités techniques de Spermologie a été choisie comme portée partielle d'accréditation du groupe hospitalier HUPNVS et un dossier de vérification de méthodes a été remis en avril 2013. Ce dernier a nécessité notamment d'effectuer une vérification de la mesure du volume de l'éjaculat par pesée (méthode quantitative de portée A) dans sa phase initiale.

Pour cela, conformément au document SH GTA 04, après la réalisation d'une étude bibliographique, les critères de performances de la méthode ont été évalués : répétabilité, fidélité intermédiaire et estimation de l'incertitude de mesure.

Ainsi, il a été conclu que notre méthode est valide pour la mesure du volume de l'éjaculat et apte à être utilisée au laboratoire de Biologie de la Reproduction.