

**MEMOIRE**  
**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE**  
**« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE »**

**VALIDATION DES METHODES DU SPERMOGRAMME :**  
**LA CONCENTRATION DES SPERMATOZOÏDES**

GALATI Eve

Année 2016

## **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 leurs 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

GALATI Eve

Praticien Hospitalier

Laboratoire de biologie de la reproduction et d'assistance médicale à la procréation

Laboratoire de Biologie médicale,

Hôpital Victor Jouselin

44 Avenue du Président John Fitzgerald Kennedy

28102 Dreux Cedex

## Table des matières

<b>1. Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Contexte</b> .....	<b>6</b>
2.1 Présentation du Centre Hospitalier .....	6
2.2 Présentation du laboratoire de biologie médicale (LBM) .....	7
2.3 Présentation de l'unité biologie de la reproduction et du centre d'AMP .....	7
2.4 Démarche qualité .....	8
2.4.1 Laboratoire de Biologie Médicale.....	8
2.4.2 Unité de biologie de la reproduction et centre d'AMP .....	8
3.1 Rappel sur le spermogramme .....	9
3.2 Choix du sujet et objectifs du travail .....	9
3.3 Méthodologie .....	10
<b>4. Planification</b> .....	<b>11</b>
4.1 Etat de lieux .....	11
4.1.1 Les documents existants.....	11
4.1.2 Les contrôles de qualités .....	11
4.1.3 La gestion de la métrologie.....	12
4.1.4 Les outils qualités.....	12
4.2 Actions à mettre en place et planning .....	13
<b>5. Réalisation de la validation de méthode</b> .....	<b>14</b>
5.1 Revue de la bibliographie : définition, intérêt et étiologies .....	14
5.2 Rédaction et mise à jour des documents .....	15
5.3 Gestion des contrôles de qualité .....	15
5.3.1 Mise en place des contrôles internes de la qualité .....	15
5.3.2 Traçabilité et exploitation de contrôles de qualité.....	15
5.4 Analyse et maîtrise des risques .....	16
5.5 Evaluation des performances des méthodes .....	19
5.5.1 Les critères de performance à évaluer.....	19
5.5.2 Choix des limites d'acceptabilité des critères de performance.....	20
5.5.3 Répétabilité .....	21
5.5.4 Fidélité intermédiaire.....	21
5.5.5 Justesse.....	22
5.5.6 Exactitude .....	23
5.5.7 Incertitude de mesure .....	23
5.5.8 Limite de détection .....	25
5.5.9 Comparaison de méthodes.....	25
5.5.10 Etendue de mesure .....	28
5.5.11 Interférences .....	28
5.5.12 Contamination.....	28
5.5.13 Intervalle de référence .....	29
<b>6. Conclusion et évaluation du travail</b> .....	<b>29</b>
<b>7. Ajustement et discussion</b> .....	<b>30</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:</b> .....	<b>31</b>

## Liste des abréviations

ABM : Agence de la biomédecine

AMP : Assistance médicale à la procréation

ASHQ : Agent des services hospitaliers qualifiés

CIQ : Contrôle interne de la qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

EEQ : Evaluations externes de la qualité

FIV : Fécondation in vitro

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

MO : Mode Opérateur

NS : Non significatif

SMQ : Système de management de la qualité

UF : Unité fonctionnelle

## 1. Introduction

Notre laboratoire est engagé dans la démarche d'accréditation selon la norme EN NF ISO 15189 version 2007 depuis Octobre 2013. La première visite du COFRAC en février 2014 nous a permis d'obtenir l'accréditation pour le domaine de l'hémostase. Aujourd'hui la portée accréditée représente 10,7 % de l'activité du laboratoire mais la demande d'extension faite en mai 2016 concerne 62% de son activité.

Dans le cadre de l'extension de la portée accréditée nous souhaitons faire entrer l'unité de biologie de la reproduction et d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) dans les démarches d'accréditation.

Etant responsable de l'Unité fonctionnelle (UF) de biologie de la reproduction et d'Assistance Médicale à la Procréation, et désireuse de m'assurer de la qualité des résultats rendus je me suis tout d'abord intéressée à la validation des méthodes utilisées en spermologie diagnostic, et plus particulièrement aux différents paramètres du spermogramme.

Les examens de spermologie diagnostic, qui représentent une part importante de l'activité du laboratoire, sont des éléments clés dans l'orientation de la prise en charge des couples vers les techniques d'AMP. Il est donc primordial de garantir la validité des résultats rendus aux patients et aux cliniciens afin de permettre, si l'AMP est indiquée, de choisir la technique la plus appropriée. La validation des méthodes utilisées dans notre laboratoire pour le spermogramme et plus particulièrement pour la mesure de la concentration des spermatozoïdes sera donc l'objet de ce mémoire.

Après avoir décrit le contexte de ce travail et l'objectif poursuivi, nous exposerons la démarche entreprise sous forme de PDCA et discuterons ensuite des résultats obtenus et des perspectives envisagées.

## 2. Contexte

### 2.1 Présentation du Centre Hospitalier

Le Centre Hospitalier Victor Jousset, situé à Dreux, est un hôpital général qui comporte 797 lits et dont le bassin de population est estimé à 100.000 habitants. Le Centre Hospitalier est organisé en GCS avec le centre Hospitalier de HOUDAN.

## 2.2 Présentation du laboratoire de biologie médicale (LBM)

Le laboratoire de biologie médicale est mono-site et comporte 3 UF :

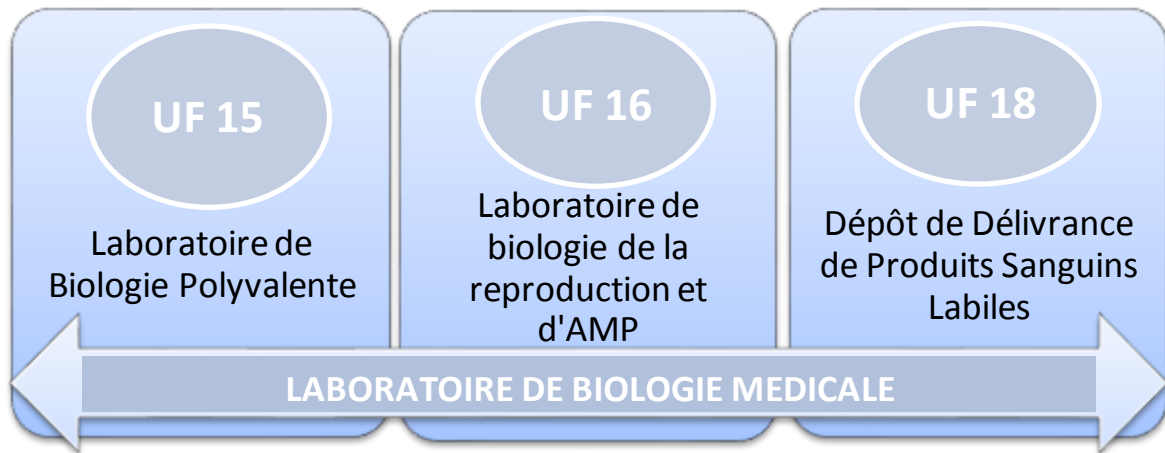


Figure 1 : les Unités Fonctionnelles du laboratoire

L'activité du LBM représente environ 23 millions de B par an avec 400 dossiers/jour. Les ressources humaines pour les 3 UF réunis sont en équivalent temps plein de 6,9 biologistes, 2 cadres, 30,1 techniciens de laboratoire, 0,5 infirmière, 4,3 secrétaires, 4 Agent des services hospitaliers qualifiés (ASHQ).

## 2.3 Présentation de l'unité biologie de la reproduction et du centre d'AMP

L'unité de biologie de la reproduction occupe, de par son activité à la frontière entre la biologie et la clinique, une place particulière. Définir son appartenance à un service est difficile car effectuant des actes de biologie elle est de fait rattachée au laboratoire de l'hôpital, mais de part son activité extrêmement intriquée avec la clinique elle constitue, avec l'unité de médecine de la reproduction, le centre d'AMP (entité clinico-biologie).

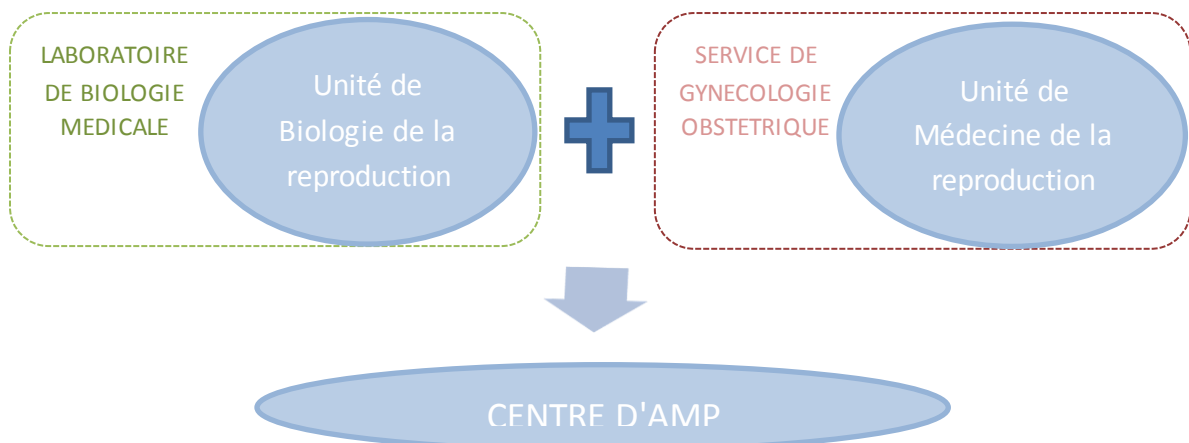


Figure 2 : les Unités Fonctionnelles du centre d'AMP

L'unité de biologie de la reproduction compte 1,9 ETP biologistes, 2 ETP techniciennes et 0,5 ETP secrétaire. L'unité de médecine de la reproduction est composée de 3 ETP gynécologues obstétriciens, 1,8 ETP sage-femme et 1,5 ETP secrétaire.

Le laboratoire de biologie de la reproduction effectue environ 650 actes d'AMP et 500 actes de spermiologie diagnostic par an.

## 2.4 Démarche qualité

### 2.4.1 Laboratoire de Biologie Médicale

Le système de management de la qualité (SMQ) mis en place au sein du laboratoire de biologie s'applique à l'ensemble de ses unités fonctionnelles. L'organisation du système qualité est définie dans le manuel de qualité du laboratoire. Le bilan du SMQ et des activités du LBM est réalisé chaque année au cours de la revue de direction. Elle permet de contrôler l'efficacité du SMQ et du système documentaire.

La démarche qualité a été initiée au laboratoire en Octobre 2013 ce qui nous a permis d'obtenir l'accréditation pour le domaine de l'hémostase en juillet 2014. Une demande d'extension de la portée d'accréditation a été déposée en Mai 2016 concernant les domaines suivants : biochimie, immunologie, hématologie, bactériologie, virologie, parasito-mycologie et spermiologie diagnostic.

### 2.4.2 Unité de biologie de la reproduction et centre d'AMP

L'arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 (J.O. du 11 septembre 2010) relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'Assistance Médicale à la Procréation reprend les exigences réglementaires et les conditions de fonctionnement d'un centre d'AMP. Dans ce décret apparaît pour la première fois en France l'obligation de mise en place d'un système de management de la qualité, ce qui a amené certains centres d'AMP à s'engager dans un processus de certification avec comme référentiel la norme ISO 9001. Toutefois, si les centres d'AMP (entité clinico-biologique) doivent pouvoir faire la preuve d'un management de la qualité, les activités de biologie de la reproduction et d'Aide médicale à la procréation devront être accréditées selon la norme ISO 15189, comme tous les examens de biologie médicale.

Notre laboratoire de biologie de la reproduction et d'AMP est donc impliqué dans la qualité sur 2 axes :

- depuis 2011 et avec l'unité de médecine de la reproduction, il est entré dans un processus de certification du centre d'AMP selon le référentiel ISO 9001. Les démarches de certifications ont été finalisées en 2015 et 2016 ; la visite de certification est prévue le 29 novembre 2016.
- depuis 2013 et avec le laboratoire de biologie médicale, il est entré dans les processus d'accréditation selon la norme ISO 15189.

### 3. Choix du sujet, objectif du travail et méthodologie

#### 3.1 Rappel sur le spermogramme

Le spermogramme constitue avec le spermocytogramme les examens clés de l'exploration de la fertilité masculine ; ils font partis des premières analyses pratiqués dans le bilan d'infertilité et de stérilité du couple. On peut noter, bien que ce ne soit pas l'indication principale, que le spermogramme est également prescrit en post-vasectomie afin de s'assurer de l'efficacité de l'intervention.

Le spermogramme - spermocytogramme reflète, entre autres, les étapes de production, formation et maturation des spermatozoïdes dans les deux mois et demi précédant l'examen, période correspondant approximativement à un cycle complet de spermatogenèse suivi de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme. Le mot spermogramme désigne l'ensemble des tests réalisés à l'état frais; le mot spermocytogramme désigne l'analyse cytologique faite dans un second temps à partir d'un frottis coloré. Ces examens apportent des informations directes sur les aspects qualitatifs et quantitatifs des spermatozoïdes et des autres cellules présentes dans le sperme mais aussi des informations indirectes sur l'état de la voie génitale et des glandes associées, prostate et vésicules séminales, dont les sécrétions constituent le plasma séminal auquel viennent s'additionner les spermatozoïdes au moment de l'éjaculation.

#### 3.2 Choix du sujet et objectifs du travail

Les techniques de biologie de la reproduction et d'AMP sont pour la majorité manuelle et qualitative, pour ces techniques les notions de justesse, d'intervalle de mesure et

d'incertitude sont difficiles voire impossible à déterminer. Ce fait a amené beaucoup de laboratoires, dont le nôtre, à privilégier d'autres disciplines pour entrer dans l'accréditation. Aujourd'hui nous avons plus de recul et il est nécessaire que la biologie de la reproduction entre à son tour dans les démarches d'accréditation. Nous avons choisi de débuter par la validation de 3 paramètres du spermogramme, à savoir la concentration, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes. Notre travail tout au long de l'année a porté sur la validation des 3 paramètres cités ci-dessus, cependant afin de respecter les exigences en terme de nombre de page et de synthétiser ce mémoire je présenterai uniquement la validation de la mesure de la concentration des spermatozoïdes.

L'objectif de ce travail est d'une part de réaliser le SHform 43 qui sera soumis au Cofrac, d'autre part de s'assurer que la technique utilisée est conforme aux spécifications attendues et ainsi de garantir la qualité des résultats rendus.

### 3.3 Méthodologie

Le projet a été organisé selon la roue de Deming (PDCA) :

- P : « Plan » pour la planification du travail
- D : « Do » pour la réalisation des actions décidées lors du plan
- C : « Check » pour l'évaluation des actions mises en place
- A : « Act » pour trouver les actions permettant d'améliorer le processus

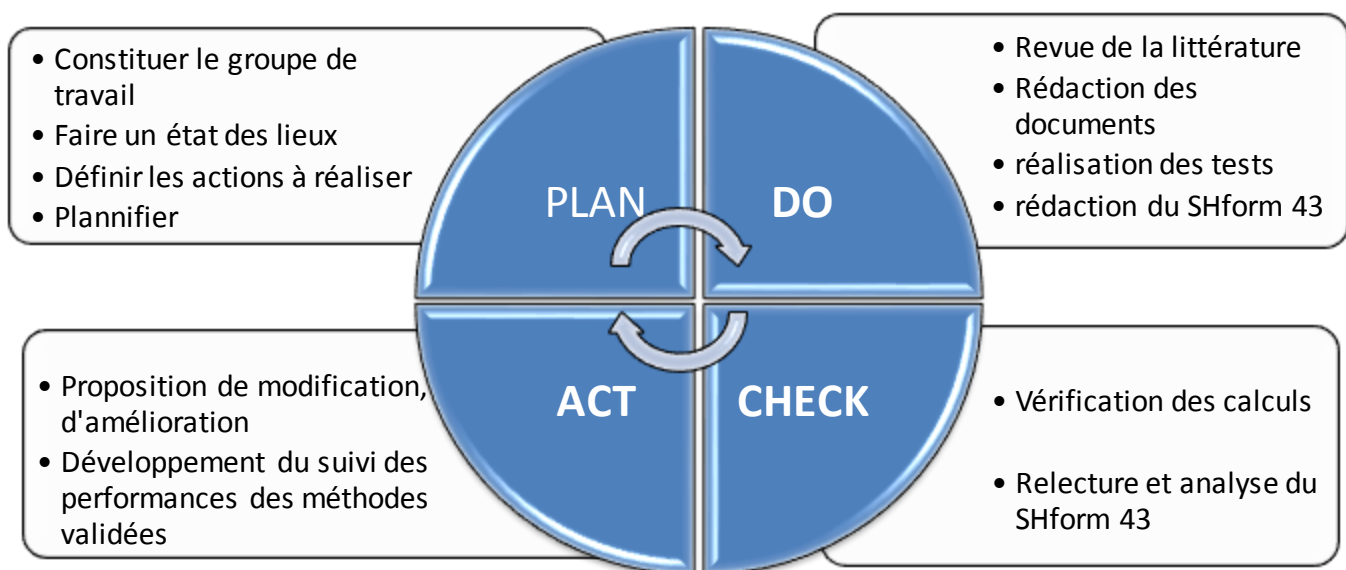


Figure 3 : Schéma de l'organisation du projet

## 4. Planification

J'ai présenté ce projet lors de la réunion de service mi-janvier afin de faire prendre conscience à l'équipe médicale et technique de la nécessité d'avancer dans l'accréditation de l'unité de biologie de la reproduction et d'AMP. Nous avons alors proposé la participation du personnel (2 ou 3 personnes) à un groupe de travail sur le sujet. Des volontaires se sont fait connaître et notre groupe de travail fut constitué de 1 biologiste de spermiologie : Ahmed Chargui, la technicienne référente qualité au laboratoire d'AMP : Isabelle Royeau, de la RAQ adjointe et technicienne : Véronique Zare et de moi-même : biologiste responsable de l'UF de biologie de la reproduction. La première réunion de notre groupe de travail a permis de faire l'état des lieux et de présenter les outils qualité sur lesquelles nous allons nous appuyer pour réaliser la validation de méthode.

### 4.1 Etat de lieux

#### 4.1.1 Les documents existants :

Les documents supports de notre laboratoire pour réaliser les validations de méthodes sont : la procédure générale de vérification des méthodes analytiques (ANA-PG-001), la procédure de gestion de la portée flexible (AQO-PG-003) et le SH Form 43 (AQO-DX-008).

Les principaux documents de spermiologie diagnostic sont : des documents (modes opératoires et fiches d'information) concernant la prise de rendez-vous et l'accueil des patients, le prélèvement, des modes opératoires décrivant les techniques utilisées, des fiches de qualification et d'habilitation, des documents sur les réactifs et matériels et les non-conformités.

#### 4.1.2 Les contrôles de qualités

Le laboratoire est abonné à des évaluations externes de la qualité (EEQ) pour la concentration des spermatozoïdes depuis janvier 2016. Les contrôles inter-opérateurs ont été instaurés au laboratoire de biologie de la reproduction en 2015.

#### 4.1.3 La gestion de la métrologie :

Les matériels sont raccordés au système Cofrac, les étalonnages des pipettes et la cartographie des enceintes ont lieu annuellement et une procédure générale décrit la gestion de la métrologie au laboratoire (MET-PG-001).

#### 4.1.4 Les outils qualité

Afin d'analyser les actions à mener nous avons commencé par réaliser un diagramme d'Ishikawa (5M) concernant l'analyse des risques des méthodes de spermologie diagnostic :

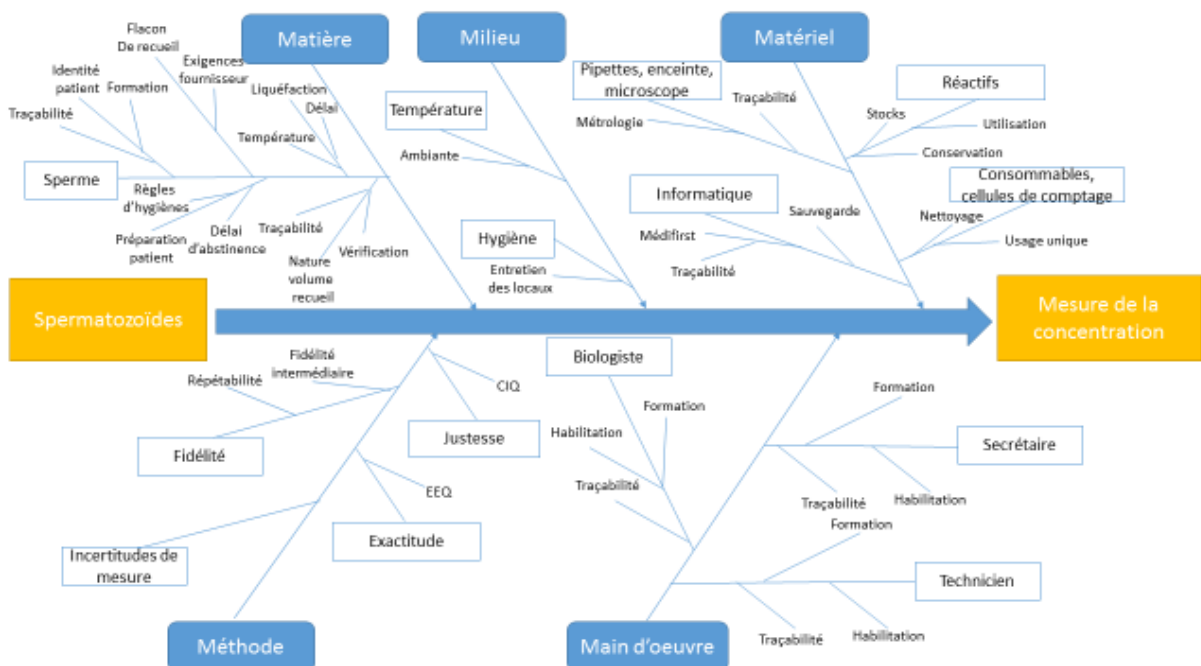


Figure 4 : Analyse des risques selon le diagramme d'Ishikawa

Grâce au diagramme d'Ishikawa, nous avons pu discuter de chaque étape, cibler certains dysfonctionnements :

- Absence de document sur la validation des comptes rendus biologiques
- Absence de document sur certaines tâches réalisées
- Absence de document de gestion des contrôles de qualité
- Absence de contrôles internes externalisés

et commencer à réfléchir aux actions à mener pour réaliser la validation des méthodes.

## 4.2 Actions à mettre en place et planning

Suite aux dysfonctionnements recensés nous avons, lors de la seconde réunion de notre groupe de travail, défini les actions à mettre en place :

Actions	Planning
Relecture et mise à jour des modes opératoires et procédures	Février
Rédactions des documents manquants	Mars
Trouver des contrôles de qualité interne et les mettre en place	Avril
Réaliser un tableau retraçant la maîtrise des risques	Mai
	Juin
Définir le type de méthodes et les seuils d'acceptabilité	Juillet
Réaliser les essais nécessaires à l'évaluation des performances	Aout
	Septembre
Réaliser l'évaluation des performances des méthodes	

Tableau 1 : Actions et planning

La rédaction des documents a été répartie entre les différentes personnes du groupe de travail :

Actions	Personnel
Rédaction du MO prise en charge du prélèvement après le recueil	EG
Relecture et mise à jour des MO : évaluation de la concentration	EG + IR
Rédaction de la procédure générale spermogramme	AC
Rédaction du MO nettoyage des cellules de comptage	IR
Rédaction du MO gestion et interprétation des contrôles qualités en spermologie	EG + VZ
Rédaction des enregistrements pour les contrôles qualité	AC + EG
Rédaction du MO validation biologique	EG

Tableau 2 : Rédaction des nouveaux documents

## 5. Réalisation de la validation de méthode

### 5.1 Revue de la bibliographie : définition, intérêt et étiologies

Une baisse de concentration des spermatozoïdes se nomme oligozoospermie et correspond à une concentration inférieure à 15 millions de spermatozoïdes par millilitre d'éjaculat [1]. Elle peut être d'origine obstructive (excrétoire) ou non obstructive (sécrétoire). Le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat et la concentration sont corrélés positivement au délai de conception et au taux de grossesse [2], [3].

Sur le plan diagnostique, une altération des paramètres spermatiques peut être liée aux étiologies suivantes :

- Causes « pré – testiculaire » ou endocrinienne: Il s'agit de pathologies organiques ou fonctionnelles mettant en cause l'axe hypothalamo-hypophysaire (hypogonadisme hypogonadotrope).
- Causes « testiculaire » : La fréquence des troubles de la spermatogenèse par altération primitivement testiculaire est beaucoup plus fréquente que les altérations testiculaires secondaires à une pathologie hypothalamo-hypophysaire. L'exploration hormonale pourra mettre en évidence un hypogonadisme hypergonadotrope. On notera cependant que la fonction endocrine et la fonction exocrine testiculaire ne sont qu'imparfaitement corrélées.
- Causes « post-testiculaire » : Le mécanisme se situe en aval du testicule, au niveau des voies excrétrices. Il peut s'agir de pathologies des voies excrétrices (épididymes, canaux déférents ou éjaculateurs, vésicules séminales et autres glandes annexes, insuffisance du sphincter vésical...), ou de pathologies sexologiques (anéjaculation partielle ou totale).

Enfin, il apparaît que le nombre total de spermatozoïdes mobiles après sélection, prenant en compte la concentration et la mobilité, permet d'orienter la prise en charge en AMP (IIU, FIV ou ICSI) [4][5].

## 5.2 Rédaction et mise à jour des documents

Le mode opératoire « évaluation de la concentration des spermatozoïdes » (AMP-MO-028 : annexe 1) a été mis à jour et de nouveaux documents ont été rédigés par les membres du groupe de travail afin de décrire des tâches réalisées mais non formalisées : « AMP-MO-015 : prise en charge du prélèvement après le recueil (annexe 2), « AMP-PG-001 : procédure générale pour la réalisation du spermogramme » (annexe : 3), « AMP-MO-020 : rédaction du MO nettoyage des cellules de comptage (annexe : 4), «AMP-MO-050 » : rédaction du MO validation biologique des comptes rendus ( annexe 5).

## 5.3 Gestion des contrôles de qualité

### 5.3.1 Mise en place des contrôles internes de la qualité

Nous avons recherché et commandé des contrôles internes de qualité (Accu-beads plus) ; ces contrôles sont des solutions contenant une concentration définie de billes, symbolisant les spermatozoïdes ; ils sont déjà utilisés dans plusieurs laboratoires de spermiologie.

Afin de mettre en place les contrôles de qualité interne pour la concentration des spermatozoïdes nous avons rédigés un mode opératoire : «AMP-MO-041 : réalisation des contrôles internes en spermiologie diagnostic» (annexe 6) et un enregistrement : «AMP-EN-15 : Contrôles de qualité internes en spermiologie diagnostic» (annexe 7). Le personnel a été formé et nous avons décidé de réaliser une mesure de cette concentration chaque semaine.

### 5.3.2 Traçabilité et exploitation de contrôles de qualité

Bien que des contrôles qualités aient été mis en place au laboratoire des difficultés sur l'interprétation ou même la traçabilité étaient récurrentes. Nous avons donc rédigé le mode opératoire : AMP-MO-040 « Gestion et interprétation des contrôles qualité en spermiologie diagnostic» (annexe 8). Il manquait également un enregistrement pour tracer la réalisation des contrôles inter-opérateur qui a été rédigé : AMP-EN-016 «Contrôles de qualité inter-opérateur en spermiologie diagnostic» (annexe 9).

## 5.4 Analyse et maîtrise des risques

Nous avons effectué un tableau retraçant l'analyse et la maîtrise des risques selon la méthode des 5M.

MAITRISE DES RISQUES				
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
MATIERE (ECHANTILLONS)	Identité	4	Formation et information du personnel Traçabilité de l'identité	AMP-MO-003 accueil du patient pour rendez-vous de spermologie  AMP-MO-014 Installation du patient pour le recueil de sperme  Habilitation du personnel : - PER-MO-001 : Rôle dans la gestion des qualifications -PER-PG-001 Procédure habilitation -AMP-EN-006 Qualification secrétaire -AMP-EN-007 Qualification technicien -AMP-EN-008 Qualification biologiste
	Préparation du patient	3	délai d'abstinence (2 à 7 jours) et conditions cliniques compatibles, conduite à tenir en cas de délai non respecté  respect des règles d'asepsie lors du recueil	Recommandation lors de la prise de rendez-vous : AMP-MO-006 Prise de rendez-vous de spermologie et AMP-MO-003 accueil du patient pour rendez-vous de spermologie AMP-MO-060 Non conformités au laboratoire de biologie de la reproduction phase pré-analytique, spermologie diagnostic  AMP-MO-013 les étapes du prélèvement de sperme AMP-MO-014 Installation du patient pour le recueil de sperme
	Type de contenants	2	Flacon de recueil adapté et intègre Préservatif adapté	Fiche technique fournisseur flacon de recueil de sperme Fiche technique fournisseur préservatif
	Nature et volume de l'échantillon	4	Contrôle après le recueil de la nature du recueil Recueil complet	AMP-PG-001 Spermogramme  AMP-MO-015 Prise en charge préanalytique des prélèvements après le recueil
	Prétraitement de l'échantillon : liquéfaction	1	Respecter le délai nécessaire à la liquéfaction 15 min à 1 heure  Respecter la température de liquéfaction entre 20 et 36.5°C  Métrologie/suivi de l'étuve de spermologie	AMP-EN-003 Feuille de renseignement (traçabilité de l'heure de prélèvement et d'une éventuelle perte de recueil et de l'heure de mise à l'étuve)  Surveillance métrologique de la température (MET-PG-001 : Gestion de la métrologie) : Suivi de température l'étuve de spermologie par une sonde raccordée Cofrac (MET-DX-152 Certificat d'étalonnage COFRAC) Cartographie de l'étuve de spermologie MET-DX-160

			INB 200 N°équipe 9163 (GMAO 10362)	
MILIEU	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	1	Température ambiante	Les locaux sont maintenus à une température ambiante
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1	Température ambiante Propreté des locaux	Les locaux sont maintenus à une température ambiante Entretien des locaux par l'équipe d'ASHQ (traçabilité : AMP-EN-037 : Nettoyage du laboratoire AMP)
MATÉRIEL (EQUIPEMENT)	Surveillance des dérives	4	Pipette BioHitproline 4056567 (GMAO8997) Pipette 4056567 GMAO 8297 (fixe 20µl) Pipette MU 28008 GMAO 8296 (variable 20 – 200µl)  Microscope Labophot (n°GMAO 185, Num Inventaire : AO-MIC-0002)  étuve de spermiologie INB 200 N°équipe 9163 (GMAO 10362)  Suivi des résultats des EEQ et contrôle interne	métrologique des pipettes : Etalonnage annuel des pipettes (MET-PG-001 : Gestion de la métrologie) Certificat d'étalonnage MET-DX-130  Surveillance annuelle des microscopes MET- DX-169  Surveillance métrologique de la température (MET-PG-001) : Suivi de température l'étuve de spermiologie par une sonde raccordée Cofrac (MET-DX-152 Certificat d'étalonnage COFRAC) Cartographie de l'étuve de spermiologie MET-DX-160  Respect des modes opératoires AMP-MO-040 « Gestion et interprétation des contrôles qualité en spermiologie diagnostic » et AMP-MO-041
	Contamination	3	Nettoyage des cellules de comptage  Utilisation de lame et de lamelle, de cône propre	AMP-MO-020 « Nettoyage des cellules de comptage »,  1 seul échantillon techniqué, lame identifié et jetée après lecture, matériel à usage unique
	Informatique	2	Ordinateur  Sauvegarde des données  vérification de la saisie manuelle  Logiciel métier Médifirst	Maintenance par le service informatique de l'hôpital Serveur de l'hospital  Vérification de la saisie manuelle comme définit AMP-MO-050 « validation biologique des comptes rendus » (Signature du biologiste sur la feuille de pailasse lors de la validation)  Mise à jour et vérification de l'intégrité des données selon les AMP-MO-051 « fonctionnement et gestion du logiciel informatique » et AMP-EN-052 « dossier intégrité des données essai »
MATÉRIEL	Conservation et conditions d'utilisation	1	Ringer formol	Conservation à température ambiante dans un flacon fermé teinté AMP-MO-017 « Préparation du ringer formol »
	Gestion des stocks	1	Acceptation à réception des réactifs	AMP-MO-61 Réception réactif et matériel

		Gestion des stocks	AMP-MO-60 Gestion des stocks au laboratoire d'AMP
	1	Respect du mode opératoire de reconstitution du ringer formol	Respect du MO AMP-MO-17 « Préparation du ringer formol »
METHODE	2	Faible concentration en spermatozoïdes	Respect des modes opératoires AMP-MO-028 « évaluation de la concentration des spermatozoïdes »  AMP-MO-29 « prise en charge du sperme en cas d'azoospermie, de cryptozoospermie ou d'oligozoospermie extrême »
	2	Homogénéisation du prélèvement  Choix de la dilution et réalisation (Prise d'essai de 50µl)  dépôt de 10µl de préparation dans la chambre de comptage  compte des spermatozoïdes	Respect des MO AMP-MO-028 « évaluation de la concentration des spermatozoïdes », formation du personnel,  Pipettes raccordée COFRAC et adaptée à la prise d'essai, surveillance métrologique des pipettes (MET-PG-001 : Gestion de la métrologie)  Enregistrement et suivi des EEQ et des CIQ par opérateur
MAIN D'ŒUVRE (PERSONNEL)	4	Formation et habilitation initiale, vérification des compétences du personnel, plan de formation	PER-MO-001 : Rôle dans la gestion des qualifications PER-PG-001:Procédure habilitation AMP-EN-006 Qualification et maintien secrétaire AMP-EN-007 Qualification et maintien technicien AMP-EN-008 Qualification et maintien biologiste AMP-MO-011, AMP-MO-012, AMP-MO-013 : réponse aux questionnaires de d'habilitation Formation : PER-EN-020 Plan de Formation  EEQ biologie prospective CIQ : Contrôle interne avec Accu-beads+ et Contrôle interopérateur Respect des modes opératoires AMP-MO-040 « Gestion et interprétation des contrôles qualité en spermologie diagnostic» et AMP-MO-041 «Réalisation des contrôles internes en spermologie diagnostic» Enregistrement des résultats : AMP-EN-15 «Contrôles de qualité internes en spermologie diagnostic» et AMP-EN-016 «Contrôles de qualité inter-opérateur en spermologie diagnostic»
		Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure	Traçabilité de l'occupation des postes de travail : AMP-EN-009 Planning réalisé laboratoire d'AMP

Légende : Echelle de criticité de 1 à 5 :1 non critique, 5 très critique ;

Tableau 3 : Analyse de la maîtrise des risques en 5M de l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes au laboratoire de spermologie

Ce tableau nous permet d'une part de mettre en évidence les points critiques de la méthode, d'autre part de montrer que les actions mises en place permettent de maîtriser ces risques.

## 5.5 Evaluation des performances des méthodes

### 5.5.1 Les critères de performance à évaluer

Toutes les méthodes que nous utilisons dans le laboratoire étant des méthodes reconnues et décrites dans les deux référentiels de la discipline [1] [6], la validation de méthode correspondra donc à une vérification de méthode sur site, en portée flexible A. La mesure de la concentration des spermatozoïdes est une méthode de type quantitative, les paramètres à vérifier sont donc, selon le SH GTA 04 :

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A
Spécificité analytique	OUI	Non
Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire	OUI	OUI
Justesse (approche de)	OUI	OUI si possible
Intervalle de mesure (Limite de quantification et de linéarité)	OUI	A vérifier si nécessaire
Incertitudes / facteurs de variabilité et évaluation	OUI	OUI
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	OUI	OUI
Stabilité des réactifs (après ouverture)	OUI	NON
Robustesse	NON	NON
Interférences	OUI	A vérifier si nécessaire
Intervalle de référence	OUI	A vérifier si justifié
Comparaison avec une méthode de référence	OUI	NON
Comparaison avec méthode utilisée au LBM	OUI	OUI (si possible)
Analyse des discordances	OUI	OUI
Le dossier doit conclure sur l'aptitude de la méthode ou du système analytique		

Tableau 4: Paramètres à vérifier ou connaître pour une méthode quantitative

Ces paramètres sont définis dans la procédure de notre laboratoire ANA-PG-001-V03 «Validation des méthodes analytiques».

### 5.5.2 Choix des limites d'acceptabilité des critères de performance

La définition de critères de qualité destinés à vérifier la technique de comptage en cellule calibrée pour la détermination de la concentration spermatique de l'éjaculat a fait l'objet plusieurs travaux de groupes d'experts. Sur la base des données expérimentales provenant de l'application du protocole de vérification de techniques de la Société Française de Biologie Clinique SFBC , des données de la base RICOS[7], des recommandations internationales de l'OMS[1], ainsi que de l'exploitation des résultats de différents programmes de contrôle de qualité intra- et inter-laboratoires, des limites acceptables sont proposées. Ces limites sont destinées à juger de la qualité de la technique de comptage et à vérifier cette technique en fonction de sa fidélité et de son exactitude.

Les critères :

- de la base RICOS auquel nous appliquons un facteur de capabilité de 1.33 pour la répétabilité (recommandations de la SFBC [8], soit une CV inférieur à 10.1% (13.4/1.33),
- de l'OMS (erreur systématique inter-opérateur) et RICOS (Fidélité intermédiaire) pour la reproductibilité inter-opérateur,
- proposés par biologie prospective pour l'exactitude,

nous paraissent être pertinents pour répondre aux besoins de nos patients et prescripteurs en termes de performance analytique. Nous décidons donc de les utiliser comme critères d'acceptabilité des analyses que nous réalisons en interne.

Analyse	Répétabilité	Fidélité intermédiaire		Exactitude
	CV% (RICOS)	Erreur systématique (OMS 2010)	Fidélité intermédiaire CV% (RICOS)	(Biologie prospective)
Spermatozoïdes concentration	10.1%	3 SD	13.4%	$0 \leq  Zscore  \leq 2$

Tableau 5: Critères de validation de méthode - Protocole Valtec, étude de l'équipe de C. RICOS, recommandations OMS 2010, recommandation biologie prospective.

### 5.5.3 Répétabilité

Les conditions du test sont les suivantes : même opérateur, même jour, 2 niveaux de sperme différents, même lot de pipettes, même solution de formaldéhyde, dosages répétés en rafale de 2 échantillons (niveau 1 et niveau 2) de sperme de patient.

Prise essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Niveau 1</b>	24,60	22,10	24,84	23,29	21,70	20,80	25,31	24,08	23,18	22,73
<b>Niveau 2</b>	87,40	85,00	86,20	76,26	78,87	88,30	84,40	85,90	78,01	70,60

Prise essai	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>Niveau 1</b>	23,82	22,87	25,80	22,05	26,87	31,65	22,95	20,60	24,08	21,60
<b>Niveau 2</b>	88,00	83,29	85,91	83,91	80,73	89,30	78,08	91,02	87,50	90,30

Prise essai	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<b>Niveau 1</b>	23,51	24,53	26,49	25,92	24,64	22,00	23,72	24,14	24,41	21,60
<b>Niveau 2</b>	82,90	68,98	84,90	73,53	86,00	79,71	70,45	83,90	70,01	76,09

Tableau 6 : Résultat des mesures de la répétabilité

La moyenne (m), l'écart type (S) et le coefficient de variation (CV) ont été calculés pour les 2 niveaux de mesure. Le CV obtenu lors du test est inférieur au CV limite défini (cf. tableau 7). La répétabilité de la méthode utilisée est donc conforme.

REPETABILITE						
Echantillons	n	m	S	CV (%)	CV (%) limite (Ricos 2014)	Conclusion
<b>Niveau 1</b>	30	23,86	2,19	9,16	10.1	Conforme
<b>Niveau 2</b>	30	81,85	6,43	7,86	10.1	Conforme

Tableau 7 : calculs et interprétations des mesures de la répétabilité

### 5.5.4 Fidélité intermédiaire

La mesure de la fidélité intermédiaire a été effectuée par la mesure de la concentration de 10 spermes de patients par 4 opérateurs.

Technicien	Echantillon									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>IR</b>	31,25	35,50	19,15	6,98	39,60	33,50	32,00	85,62	120,30	60,70
<b>KB</b>	30,62	29,87	15,95	8,30	45,71	31,32	29,72	75,90	101,52	51,83
<b>AC</b>	33,30	37,10	20,12	6,43	38,73	36,52	34,62	80,23	131,63	48,93
<b>EG</b>	30,27	34,90	15,53	7,04	42,81	37,98	37,64	90,57	98,67	66,78

Tableau 8 : Résultats des mesures de la fidélité intermédiaire

L'exploitation des résultats pour la mesure de la fidélité intermédiaire a été réalisée à deux niveaux :

D'une part nous avons calculé : la moyenne ( $m_j$ ) et l'écart type des écarts à la moyenne ( $S_j$ ) ; ceci nous a permis de calculer ERMS (error root mean square) et l'erreur standard :  $Se(m_j)$  ( $t$  = nombre de technicien et  $n$  = nombre de mesures).

$$ERMS = \sqrt{\frac{\sum s_j^2}{t-1}} \quad \text{et} \quad Se(m_j) = ERMS \times \sqrt{\frac{1-\frac{1}{t}}{n}}$$

Opérateur	n	( $m_j$ )	( $S_j$ )	ERMS	$Se(m_j)$	Limite : 3 $Se(m_j)$ (OMS [1])	Conclusion
Technicien 1	10	1,08	2,85	6.26	1,71	5.14	Conforme
Technicien 2	10	-3,30	4,34	6.26	1,71	5.14	Conforme
Technicien 3	10	1,38	6,93	6.26	1,71	5.14	Conforme
Technicien 4	10	0,84	6,53	6.26	1,71	5.14	Conforme

Tableau 9 : calculs et interprétations des mesures de la fidélité intermédiaire

D'autre part, nous avons calculé le CV intra-technicien pour chaque mesure et déduit le CV global.

Echantillons	Opérateur	CV max / CV min	CV global (%)	CV (%) limite (Ricos [7])	Conclusion
10	4	14.35/4.32	9.96	13.4	Conforme

Tableau 10 : calculs et interprétation des mesures de la fidélité intermédiaire

Le CV global des mesures est inférieur au CV limite défini et la moyenne des écarts à la moyenne de chaque technicien est inférieur à 3 fois l'écart type des écarts des différences à la moyenne : la fidélité intermédiaire de la méthode est donc conforme

### 5.5.5 Justesse

Le calcul de la justesse est effectué avec les résultats des contrôles internes de la qualité, ces contrôles ont été insaturés en juin 2016, nous disposons de 10 valeurs de mesure pour chaque niveau.

CIQ	Echantillon									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
niveau 1 = 46 +/- 7M/ml	42,4	39,7	46,3	43,2	39,8	41,4	45,4	43,2	46,1	43,2
niveau 2 = 23 +/- 4 M/ml	24,2	23,1	19,5	21,7	26,7	21,3	20,1	24,1	22,1	19,1

Tableau 11 : Résultats des mesures de la justesse

Pour chaque niveau la moyenne (m) et le biais (B) pas rapport à la cible attendue ont été calculé :  $\text{Biais (\%)} = \frac{(m-v) \times 100}{v}$  (n : nombre de valeur, S : écart type).

JUSTESSE								
Echantillons	n	m	S	Cible	Biais (%)	Biais (%) Limite RICOS	Conclusion	
Accu-beads+ 1	10	21.97	2.41	23	4.5	15.6	Conforme	
Accu-beads+ 2	10	43.07	2.37	46	6,37	15.6	Conforme	

Tableau 12 : calculs et interprétations des mesures de la justesse

Une approche de la justesse est calculée grâce aux CIQ et le biais calculé est inférieur au biais limite défini : la justesse de la méthode est donc conforme.

### 5.5.6 Exactitude

Les EEQ du laboratoire sont réalisés chez Biologie prospective ; la mise en place de ces EEQ datant de cette année à ce jour un seul EEQ est disponible. L'interprétation des résultats est effectuée par les calculs de la moyenne et de l'écart type de l'ensemble des participants ; le Z-score est ensuite calculé :

$$\text{Zscore} = \frac{(X_{\text{lab}} - V_{\text{ref}})}{S_{\text{ref}}}$$

( $X_{\text{lab}}$  : résultat du laboratoire,  $V_{\text{ref}}$  : valeur de référence,  $S_{\text{ref}}$  : écart type de référence)

EXACTITUDE								
Echantillons	Xlab	Nbe lab.	Vref(%)	Limite acceptable	Sref	Z-score	Z-score limite	Conclusion
NUM.SPZ 2016-1A	3.5	268	6	[2.9 ; 9.0]	1,5	-1.6	≤ 2	Conforme

Légende :  $0 \leq |\text{Zscore}| \leq 2$  : satisfaisant,  $2 < |\text{Zscore}| \leq 3$  : à surveillance,  $|\text{Zscore}| > 3$  : insatisfaisant

Tableau 13 : Résultat de mesure de l'exactitude

L'EEQ réalisé est dans la zone « satisfaisant » : les performances de la méthode seront confirmées par la réalisation des EEQ suivants (2 fois par an) : l'approche transitoire de l'exactitude est conforme.

### 5.5.7 Incertitude de mesure

Aujourd'hui il n'existe qu'un seul EEQ réalisé ; nous ne pouvons donc pas nous servir de cette valeur pour réaliser le calcul de l'incertitude. Nous avons donc utilisé les résultats du CIQ externalisé afin de réaliser le calcul de l'incertitude de mesure (incertitude composée) :

$$U(c) = \sqrt{u^2(\text{CIQ}) + u^2(\text{CIQexternalisé})} \text{ avec}$$

$$u^2(\text{CIQ}) = S^2; u^2(\text{CIQexternalisé}) = \frac{se^2 + |E|^2}{\sqrt{3}}$$

Niveau 1					
Composante de l'incertitude	Source d'information		u: Incertitude type	Incertitude Composé	U (K=2)
Incertitude due à la dispersion intra (CIQ)	Dispersion CIQ	2,41	2,41	3,42	6,84
	Ecart-type CIQexternalisé	2,38			
Incertitude due à la justesse	Ecart moyen CIQexternalisé	-0,81	2,427		
Niveau 2					
Composante de l'incertitude	Source d'information		u: Incertitude type	Incertitude Composé	U (K=2)
Incertitude due à la dispersion intra (CIQ)	Dispersion CIQ	2,37	2,37	3,75	7,50
	Ecart-type CIQexternalisé	2,36			
Incertitude due à la justesse	Ecart moyen CIQexternalisé	-2,93	2,91		

Tableau 13 : calculs des incertitudes de mesure

INCERTITUDE DE MESURE	
Quantification de l'incertitude Niveau 1 :	21.2 +/- 6,84
Quantification de l'incertitude Niveau 2 :	42.5 +/- 7,50
Limite d'erreur acceptable	20% selon l'OMS 2010
Interprétation	Conforme

Tableau 13 Résultats et interprétation des incertitudes de mesure

Nous avons calculé les incertitudes de mesure selon les recommandations du SH GTA 14 et elles sont inférieures à l'incertitude maximale tolérée par l'OMS on peut donc conclure notre technique est conforme. La littérature nous apporte cependant plus de détails quant à l'incertitude de mesure dans une cellule de comptage : la précision du calcul de la concentration dépend du nombre de spermatozoïdes compté, elle suit une loi de Poisson ; l'erreur standard est égale à  $\sqrt{N}$  (N : nombre de spermatozoïdes comptés). Si 100 spermatozoïdes sont comptés l'erreur associée à la mesure est de +/-10% ; si 200 spermatozoïdes sont comptés, l'erreur associée à la mesure est +/- 7%, étant précisé que l'erreur maximale acceptée par l'OMS est de +/- 20%.

L'incertitude de mesure est très importante lorsque la numération est faible. Cependant, en pratique, cela n'a que peu d'impact puisque les décisions cliniques sont les mêmes pour des concentrations inférieures au seuil de  $10^6$ M/ml. L'approche de l'incertitude que nous proposons ici est transitoire. Les performances de la méthode seront confirmées en routine lors de l'étude des EEQ et CIQ. Nous pouvons tout de même conclure que l'incertitude de la méthode est conforme sur le plan de l'interprétation clinique.

#### 5.5.8 Limite de détection

Absence de valeur dans la littérature : en pratique la limite de détection est de 1 spermatozoïde visible après centrifugation de l'éjaculat et lecture de l'ensemble du culot de centrifugation.

#### 5.5.9 Comparaison de méthodes

Nous avons effectué une comparaison de méthode entre le compte en utilisant les cellules de Neubauer modifié et les cellules de Thoma (anciennement utilisées au laboratoire). La technique de mesure avec les cellules de Neubauer modifiée est la méthode utilisée aujourd'hui au laboratoire, les cellules de thoma étaient utilisées auparavant dans le laboratoire. L'étendue des mesures testées est de 3 à 323 millions/ml. La méthode d'exploitation utilisée est la méthode des moindres rectangles. Nous avons calculé les différences ( $X_i - Y_i$ ), les rapports ( $Y_i/X_i$ ) et les limites de suivi  $NS = 4.24S$  (avec  $S$  : écart type de la fidélité intermédiaire) : cf. le tableau ci-dessous. Nous avons ensuite réalisé les graphiques des différences et rapports en y reportant les limites calculées, puis reporté les retenues. Nous avons ensuite calculé l'équation de la droite de régression :  $Y = 0,986X - 0,0467$ .

Ech.	Neubauer (Y)	Thoma (X)	X-Y	NS(X-Y) min	NS(X-Y) max	Y/X	NS(Y/X) min	NS(Y/X) max				
N°1	14,47	16,10	1,63	4,67	-4,67	13,65	-13,65	0,90	2,86	-1,86	6,27	-5,27
N°2	48,60	51,94	3,34	15,06	-15,06	44,05	-44,05	0,94	1,58	-0,58	2,63	-1,63
N°3	55,60	69,00	13,40	20,01	-20,01	58,51	-58,51	0,81	1,43	-0,43	2,23	-1,23
N°4	72,36	76,80	4,44	22,27	-22,27	65,13	-65,13	0,94	1,39	-0,39	2,10	-1,10
N°5	149,04	162,40	13,36	47,10	-47,10	137,72	-137,72	0,92	1,18	-0,18	1,52	-0,52
N°6	115,71	106,80	-8,91	30,97	-30,97	90,57	-90,57	1,08	1,28	-0,28	1,79	-0,79
N°7	92,40	85,60	-6,80	24,82	-24,82	72,59	-72,59	1,08	1,35	-0,35	1,99	-0,99
N°8	135,60	129,60	-6,00	37,58	-37,58	109,90	-109,90	1,05	1,23	-0,23	1,65	-0,65
N°9	312,00	323,20	11,20	93,73	-93,73	274,07	-274,07	0,97	1,09	-0,09	1,26	-0,26
N°10	113,66	101,20	-12,46	29,35	-29,35	85,82	-85,82	1,12	1,30	-0,30	1,84	-0,84
N°11	55,54	47,20	-8,34	13,69	-13,69	40,03	-40,03	1,18	1,64	-0,64	2,80	-1,80
N°12	164,88	170,40	5,52	49,42	-49,42	144,50	-144,50	0,97	1,18	-0,18	1,50	-0,50
N°13	56,57	47,20	-9,37	13,69	-13,69	40,03	-40,03	1,20	1,64	-0,64	2,80	-1,80
N°14	46,80	56,00	9,20	16,24	-16,24	47,49	-47,49	0,84	1,54	-0,54	2,51	-1,51
N°15	2,72	3,00	0,28	0,87	-0,87	2,54	-2,54	0,91	10,99	-9,99	29,27	-28,27
N°16	131,40	129,07	-2,33	37,43	-37,43	109,45	-109,45	1,02	1,23	-0,23	1,66	-0,66
N°17	17,02	19,30	2,28	5,60	-5,60	16,37	-16,37	0,88	2,55	-1,55	5,39	-4,39
N°18	5,06	7,07	2,01	2,05	-2,05	6,00	-6,00	0,72	5,24	-4,24	12,99	-11,99
N°19	80,40	79,20	-1,20	22,97	-22,97	67,16	-67,16	1,02	1,38	-0,38	2,07	-1,07
N°20	35,25	30,40	-4,85	8,82	-8,82	25,78	-25,78	1,16	1,99	-0,99	3,79	-2,79
N°21	126,60	102,80	-23,80	29,81	-29,81	87,17	-87,17	1,23	1,29	-0,29	1,82	-0,82
N°22	267,75	243,00	-24,75	70,47	-70,47	206,06	-206,06	1,10	1,12	-0,12	1,35	-0,35
N°23	312,00	323,20	11,20	93,73	-93,73	274,07	-274,07	0,97	1,09	-0,09	1,26	-0,26
N°24	20,60	21,20	0,60	6,15	-6,15	17,98	-17,98	0,97	2,41	-1,41	5,00	-4,00
N°25	39,60	39,40	-0,20	11,43	-11,43	33,41	-33,41	1,01	1,76	-0,76	3,15	-2,15
N°26	250,88	254,00	3,12	73,66	-73,66	215,39	-215,39	0,99	1,12	-0,12	1,33	-0,33
N°27	267,75	243,00	-24,75	70,47	-70,47	206,06	-206,06	1,10	1,12	-0,12	1,35	-0,35
N°28	164,88	170,40	5,52	49,42	-49,42	144,50	-144,50	0,97	1,18	-0,18	1,50	-0,50
N°29	56,57	47,20	-9,37	13,69	-13,69	40,03	-40,03	1,20	1,64	-0,64	2,80	-1,80
N°30	46,80	56,00	9,20	16,24	-16,24	47,49	-47,49	0,84	1,54	-0,54	2,51	-1,51

Tableau 14 : Résultats et calculs de la comparaison de méthode

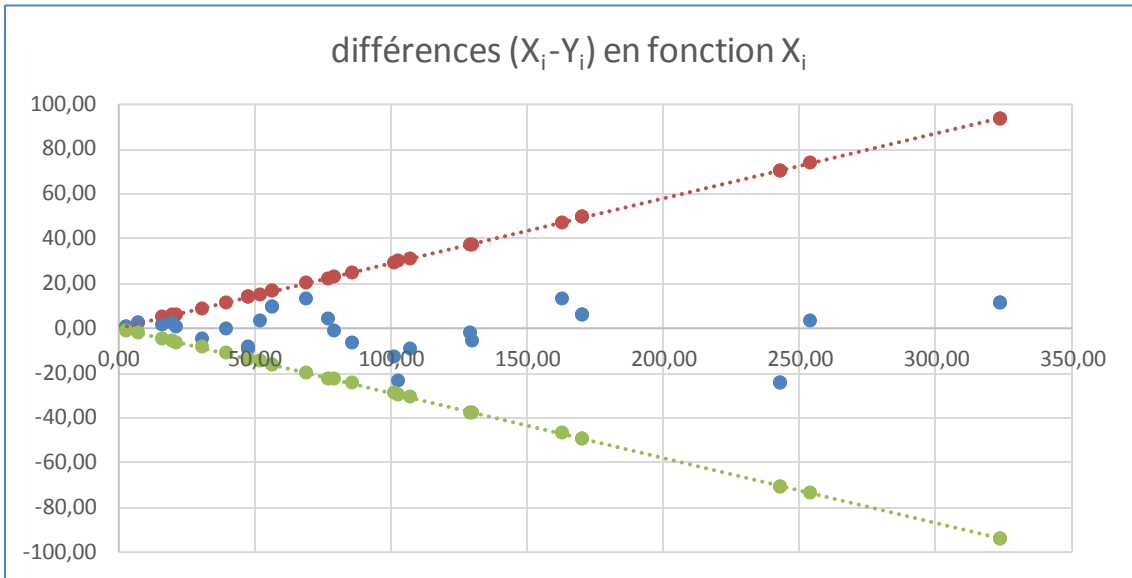


Figure 4 : Graphe des différences de la comparaison de méthode

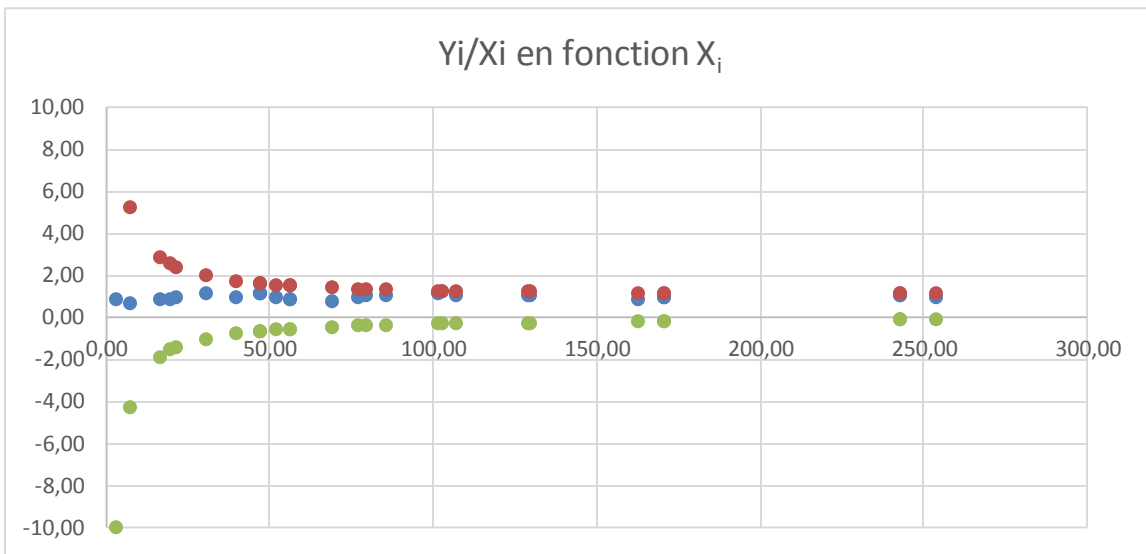


Figure 5 : Graphe des rapports de la comparaison de méthode

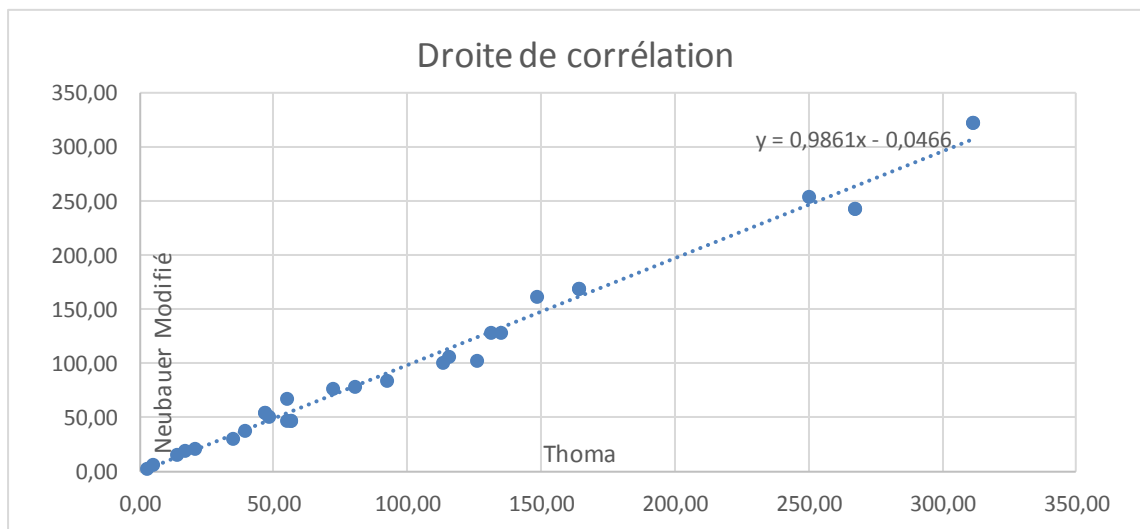


Figure 6 : Droite de corrélation de la comparaison de méthode

Nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de différences entre les 2 méthodes comparées car : il n'y a pas de points en dehors de limites, la pente de la droite de régression est très proche de 1 et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression est proche de 0.

#### 5.5.10 Etendue de mesure

Aucune valeur exacte n'est retrouvée dans la littérature concernant la limite de détection : en pratique, on peut considérer que la limite de détection est de 1 spermatozoïde visible après centrifugation de la totalité de l'éjaculat et lecture de l'ensemble du culot de centrifugation. Dans ce cas l'erreur associé à la mesure est importante et le résultat à indiquer est une numération inférieure à la limite de quantification c'est-à-dire : 56 000 spermatozoïdes/ml [1]. Concernant la Limite supérieure de linéarité, il n'y a pas de valeur décrite dans la littérature mais elle ne semble pas présenter d'intérêt puisqu'elle correspondrait à une concentration telle qu'elle saturerait la cellule de comptage après dilution. Une telle concentration serait extrêmement plus élevée que l'intervalle de référence.

#### 5.5.11 Interférences

Les principales interférences possibles sont : l'absence de liquéfaction, la viscosité augmentée, la présence d'agrégats ou d'agglutinats, la répartition inhomogène sur la cellule de lecture. La littérature ne quantifie pas l'impact de ces interférences sur les résultats mais émet des recommandations sur les modes opératoires à suivre afin de limiter la survenue de ces interférences. Notre laboratoire suit les recommandations des référentiels afin de maîtriser au mieux les risques d'erreur de résultats liés à ces interférences. En conclusion, les éventuelles interférences ne sont pas quantifiables mais maîtrisées par la gestion des risques.

#### 5.5.12 Contamination

Le risque de contamination inter-réactif n'existe pas puisque le matériel utilisé est à usage unique (cône de pipetage, tube de dilution et sont jeté après chaque utilisation).

Le risque de contamination inter-échantillon est très limité puisque nous traitons chaque sperme de manière séparée et que le matériel utilisé est à usage unique, à l'exception des cellules de comptage. Afin de maîtriser ce risque nos cellules sont nettoyées selon un mode opératoire défini « AMP-MO-020 : rédaction du MO

nettoyage des cellules de comptage » (annexe : 4), de plus nous avons réalisé un test sur 10 cellules de Neubauer modifiée afin d'évaluer le risque. Les conditions du test sont : 10 cellules utilisées pour la lecture de la concentration ont été observées au microscope à contraste de phase après l'étape de lavage et décontamination (selon les recommandations fournisseurs : 15 minutes de contact puis séchage). Aucun spermatozoïde n'a été observé sur l'ensemble de chaque cellule : nous pouvons donc conclure que le risque est maîtrisé.

#### 5.5.13 Intervalle de référence

L'intervalle de référence défini dans la bibliographie est de 15 à 213 millions/ml [9].

En conclusion les différents tests effectués ont permis de montrer que les performances de la méthode sont conformes aux spécifications attendues.

## 6. Conclusion et évaluation du travail

Après les deux premières réunions de notre groupe de travail, présentées au début de ce mémoire, nous avons effectués les réunions « 3 » et « 4 » afin de piloter la réalisation de la validation de méthode. Le sujet de la troisième réunion fut la maîtrise des risques : à partir d'un premier document que j'avais réalisé, l'ensemble des membres du groupe c'est assuré du fait que tous les risques étaient identifiés et maîtrisés. L'évaluation des performances de la méthode a été abordée lors de notre quatrième réunion, le nombre et le type d'essais à réaliser afin d'effectuer la validation de méthode ont été définis par les membres du groupe de travail.

En conclusion cette étude nous a permis de mettre en évidence, d'une part que nous maîtrisons les risques associés à la méthode, d'autre part que les performances de la méthode utilisée sont conformes aux spécifications attendues. Nous avons donc atteint l'objectif fixé au début de ce travail et pu rédiger le SH Form 43 qui sera présenté au Cofrac lors de sa prochaine visite.

L'évaluation de ce projet était le sujet de la 5<sup>ème</sup> réunion de notre groupe de travail qui a eu lieu le 10 septembre 2016. Ce projet a été réalisé au total sur 7 mois, il nous a permis de travailler sur la qualité de nos techniques de spermologie diagnostic, nous avons réalisés plusieurs procédures, modes opératoires et enregistrement afin de mieux retracer nos actions et gérer les risques qui y sont associés. L'évaluation des

performances de la méthode nous a amenée d'une part, à retravailler sur l'exploitation des contrôles de qualité déjà en place, d'autre part, à instaurer des contrôles de qualité internes ; en outre le travail sur l'incertitude de mesure nous a permis de modifier la façon dont nous rendons les résultats de la concentration. Grâce à l'ensemble de ces actions nous maîtrisons mieux, aujourd'hui, la précision et donc la qualité des résultats que nous rendons aux patients et aux cliniciens.

## 7. Ajustement et discussion

Bien que nous ayons atteints les objectifs fixés, il semble indispensable, après cette première étape de validation, que les performances de la méthode utilisée soient confirmées par l'exploitation des contrôles de qualité qui ont été mis en place. De plus il nous semble nécessaire qu'un audit blanc soit réalisé dans le secteur de spermologie avant la venue du Cofrac, cette demande avait déjà été formulée auprès de notre direction ; la réalisation de ce travail et la validation des méthodes de spermologie sera l'occasion de relancer cette demande.

Ce projet sur la validation de méthode, intégré à la réalisation du mémoire du diplôme universitaire d'Assurance Qualité, m'a donné l'occasion de faire partager les connaissances apprises pendant les cours de DU, à une partie du personnel du laboratoire. Ce travail était le premier sur les méthodes utilisées au laboratoire de spermologie, il nous a amené à réaliser la validation de l'évaluation de la mesure de la concentration des spermatozoïdes mais aussi de l'évaluation de la vitalité et de la mobilité des spermatozoïdes. Il nous a également permis d'entrer concrètement dans les démarches d'accréditation en collaboration avec laboratoire général de l'hôpital et de nous rapprocher des responsables qualité du laboratoire général . Ce travail a ouvert la voie de la validation des méthodes du spermogramme et va nous permettre de continuer les validations afin de pouvoir étendre l'accréditation à l'ensemble des techniques du spermogramme.

Personnellement, la mise en place et la réalisation de ce projet ont été très enrichissantes, j'ai appris à manier les outils qualités acquis lors des cours théoriques et pratiques du DU, mais aussi à mieux organiser et planifier les actions entreprises. Cet enseignement m'a permis d'appréhender la qualité sous un angle différent et d'y trouver les moyens d'améliorer la prise en charge que les laboratoires proposent aux patients.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- [1] World Health Organization, Ed., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [2] R. Slama, F. Eustache, B. Ducot, T. K. Jensen, N. Jørgensen, A. Horte, S. Irvine, J. Suominen, A. G. Andersen, J. Auger, M. Vierula, J. Toppari, A. N. Andersen, N. Keiding, N. E. Skakkebaek, A. Spira, and P. Jouannet, "Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities," *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 17, no. 2, pp. 503–515, Feb. 2002.
- [3] M. J. Zinaman, C. C. Brown, S. G. Selevan, and E. D. Clegg, "Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples," *J. Androl.*, vol. 21, no. 1, pp. 145–153, Feb. 2000.
- [4] S. Repping, J.-M. van Weert, B. W. J. Mol, J. W. A. de Vries, and F. van der Veen, "Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization," *Fertil. Steril.*, vol. 78, no. 1, pp. 22–28, Jul. 2002.
- [5] J. Van Waart, T. F. Kruger, C. J. Lombard, and W. Ombelet, "Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review," *Hum. Reprod. Update*, vol. 7, no. 5, pp. 495–500, Oct. 2001.
- [6] Bioforma, *Exploration de la fonction de reproduction versant masculin.*, vol. 42. Paris: Bioforma, 2009.
- [7] RJoana Minchinela[1,2], Carmen Ricós[1], Carmen Perich\* [1,3], Pilar Fernández-Calle[1,4], Virtudes Alvarez[1,5], Mariví Domenech[1,6], Margarita Simón[1,7], Carmen Biosca[1,8], Beatriz Boned[1,9], Fernando Cava[1,10], José-Vicente García-Lario[1,11], M<sup>a</sup> Pilar Fernández-Fernández[1], "Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update."
- [8] A. Vassault, D. Grafmeyer, J. de Graeve, R. Cohen, A. Beaudonnet, and J. Bienvenu, "[Quality specifications and allowable standards for validation of methods used in clinical biochemistry]," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 57, no. 6, pp. 685–695, Dec. 1999.
- [9] T. G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein, J. Auger, H. W. G. Baker, H. M. Behre, T. B. Haugen, T. Kruger, C. Wang, M. T. Mbizvo, and K. M. Vogelsong, "World Health Organization reference values for human semen characteristics," *Hum. Reprod. Update*, vol. 16, no. 3, pp. 231–245, Jun. 2010.

## **ANNEXES**

Annexe 1 : (AMP-MO-028) Mesure de la concentration des spermatozoïdes et des autres cellules

Annexe 2 : AMP-MO-015 : Prise en charge pré-analytique des prélèvements après le recueil

Annexe 3 : AMP-PG-001 : Spermogramme

Annexe 4 : AMP-MO-020 Nettoyage des cellules de Neubauer

Annexe 5 : AMP-MO-050 Validation biologique en spermiologie diagnostic

Annexe 6 : AMP-MO-041 Réalisation des contrôles de qualité interne en spermiologie diagnostic

Annexe 7 : AMP-EN-015 Contrôle qualité interne en spermiologie diagnostic

Annexe 8 : AMP-MO-040 Gestion et interprétation des contrôles de qualité en spermiologie diagnostic

Annexe 9 : AMP-EN-016 Contrôle qualité inter-opérateurs en spermiologie diagnostic

Annexe 10 : AMP-MO-060 SH FORM 43

## Résumé

La norme NF EN ISO 15189, à laquelle les laboratoires de biologie médicale ont l'obligation de s'accréditer depuis l'ordonnance du 13 juillet 2010, stipule que les procédures d'examens doivent faire l'objet d'une validation indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement.

Ce mémoire présente la validation de l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes qui a été effectuée au sein du laboratoire de biologie de la reproduction et d'AMP du centre hospitalier Victor Jousselin de Dreux.

Afin de réaliser ce projet nous avons créé un groupe de travail et planifier les tâches en dénombrant les dysfonctionnements et en réfléchissant aux actions à mettre en place. Ce projet a été piloté grâce à un planning et à plusieurs réunions du groupe de travail. Les principales actions mises en place ont été : la rédaction de divers documents (modes opératoires, procédures, enregistrements), l'instauration de contrôle interne de la qualité et l'analyse et la gestion des contrôles internes et externes de la qualité. Ces actions ont été réalisées afin de remédier aux dysfonctionnements et de mieux encadrer la réalisation de la méthode. Par la suite, l'analyse que nous avons effectuée a permis de montrer que les risques étaient identifiés et maîtrisés. L'évaluation de la concentration des spermatozoïdes étant une technique quantitative et la méthode que nous utilisons étant celle reconnue et décrite dans les référentiels de notre discipline, la validation correspond à une vérification sur site en portée A. Les essais réalisés ont concerné la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la justesse, l'exactitude, l'incertitude de mesure, la comparaison de méthode et la contamination. Le travail sur les performances de la méthode nous a permis de conclure à la conformité de la méthode utilisée dans notre laboratoire. Au terme de ce travail nous avons rédigé le SH Form 43 qui sera présenté au Cofrac lors de sa visite. La technique utilisée réponds aux spécifications attendues par le laboratoire, elle est donc apte à être utilisée. Il sera cependant important de maîtriser l'évolution des performances de la méthode par le suivi et l'analyse des contrôles qualités instaurés.