

Université Pierre et Marie Curie -

Sorbonne Universités

MÉMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE

DE BIOLOGIE MÉDICALE »

**Validation de méthode quantitative :
détermination de la concentration des
spermatozoïdes dans un éjaculat**

GIRARD Jean-Maxime

2015-2016

Notes 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 D.U. concerné ».

Jean-Maxime GIRARD

Interne en pharmacie, D.E.S. biologie médicale

Laboratoire du C.H.U. Nantes

Service de biologie et médecine du développement et de la reproduction

Hôpital Femme-Enfant-Adolescent

38 boulevard Jean-Monnet

44093 Nantes Cedex 1

Remerciements

Je remercie le Professeur Vaubourdolle et le Docteur Pernet ainsi que l'ensemble des intervenants pour la qualité de leurs enseignements.

Je tiens à remercier le Docteur Thomas FREOUR, chef du service de biologie et médecine du développement et de la reproduction du C.H.U. de Nantes, de m'avoir permis de suivre ce diplôme universitaire d'assurance qualité au laboratoire de biologie médicale.

Je tiens également à remercier pour leurs conseils, leur soutien et leurs disponibilités : Mme Elisabeth NICOD-RACINEUX, cadre du service et coordinatrice qualité du service de B.D.R. ; Mme Fanny HERSANT, interlocutrice qualité du service de B.D.R. ; Dr Florent KRASKE, biologiste qualificateur et le Dr Pascal VERDIER, biologiste référent validation de méthode.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du laboratoire qui s'implique de plus en plus dans la démarche qualité.

Je souhaite également remercier l'ensemble des participants au D.U. pour les échanges et leur bonne humeur. Simon, Valentin, Vincent, Charline et Isabelle, nos déjeuners au Bidule vont me manquer !

Pour finir, je tiens à remercier Camille pour son soutien et sa patience...

Sommaire

Glossaire	6
Introduction	7
1. Présentation du C.H.U. de Nantes.....	7
2. Présentation du laboratoire du C.H.U. de Nantes.....	7
3. Présentation du service de biologie et médecine du développement et de la reproduction	8
4. Organisation de la qualité au niveau du laboratoire de biologie médicale.....	9
Intérêts et objectifs	10
1. Exigences réglementaires et normatives	10
2. Intérêt pour le service de biologie et médecine du développement et de la reproduction	11
3. Intérêt de la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat	11
4. Objectifs	12
Le spermogramme	13
Validation de méthode.....	18
1. Etapes de réalisation du projet	18
2. Analyse de risques	18
3. Description du processus	19
4. Résultats et exploitation des données	20
A) Répétabilité.....	20
B) Reproductibilité.....	21
C) Justesse	21
D) Exactitude.....	22
E) Incertitude de mesure.....	22
F) Comparaison de méthodes	23
G) Etendue de mesure	26
H) Intervalle de référence.....	26
I) Autres critères de performance	26
J) Stratégie de passage des contrôles internes de qualité	27
Révision du mode opératoire	28
Conclusion.....	29
Bibliographie.....	30
Annexes	31

Glossaire

A.M.P. : Assistance Médicale à la Procréation

C.E.C.O.S. : Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humain

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

C.Q.I. : Contrôle de Qualité Interne

C.V. : Coefficient de Variation

D.P.I. : Diagnostic Pré-Implantatoire

E.E.Q. : Evaluation Externe de la Qualité

F.I.V. : Fécondation *in vitro*

F.I.V.-I.C.S.I. : Fécondation *in vitro* avec micro-injection intra cytoplasmique

H.D. : Hôpital Hôtel-Dieu

H.G.R.L. : Hôpital Guillaume et René Laennec

I.A.C. : Insémination intra-utérine Avec sperme de Conjoint

I.A.D. : Insémination intra-utérine Avec sperme de Donneur

L.B.M. : Laboratoire de Biologie Médicale

MAR-test : Mixed Antiglobulin Reaction test

N.A. : Non applicable

O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé

Introduction

1. Présentation du C.H.U. de Nantes

Le centre hospitalier universitaire de Nantes est composé de neuf établissements répartis à Nantes et dans son agglomération : l'Hôtel-Dieu, l'hôpital Femme-Enfant-Adolescent, Tourville, l'hôpital Saint-Jacques, l'hôpital Nord Laennec, la Maison Beauséjour, la Seilleraye et la Maison Pirmil.

Il dispose d'une offre de soins regroupant des soins de courte durée, des soins de suite et de réadaptation, des soins de longue durée, des soins de psychiatrie et de l'hébergement pour personnes âgées.

Le C.H.U. compte 2 641 personnels médicaux et 9 415 personnels non médicaux.

2. Présentation du laboratoire du C.H.U. de Nantes

Le C.H.U. est organisé en onze pôles hospitalo-universitaires (PHU) depuis le 1er janvier 2013.

Le PHU 7 regroupe les spécialités suivantes :

- Anatomopathologie
- Bactériologie-hygiène
- Biochimie
- Centre de réception et de traitement des échantillons
- Centre de prélèvements
- Génétique médicale
- Hématologie
- Immunologie
- Parasitologie
- Virologie
- Pharmacologie-toxicologie

Le laboratoire de la Biologie de la Reproduction est rattaché fonctionnellement au PHU 5 – Femme – Mère - Enfant.

Le laboratoire se répartit entre deux plateaux techniques :

- à l'hôtel-Dieu au centre de Nantes, où neuf disciplines biologiques sont représentées.
- à l'hôpital Nord Laennec à Saint-Herblain, où quatre disciplines biologiques sont représentées.

Le laboratoire est accrédité depuis le 1^{er} mars 2013, section laboratoire, sur le prélèvement et l'analyse de légionnelle dans les eaux propres selon le référentiel ISO 17025.

Le laboratoire est également accrédité en santé humaine, depuis le 1^{er} mai 2014 sur les sous-familles suivantes :

- Biochimie / Biochimie générale et spécialisée
- Biochimie / Pharmacologie – Toxicologie
- Immunologie / Auto-immunité
- Immunologie / Allergie
- Génétique / Génétique constitutionnelle
- Génétique / Génétique somatique

Le personnel du LBM compte environ 350 personnels non médicaux et 110 personnels médicaux.

3. Présentation du service de biologie et médecine du développement et de la reproduction

Le service de biologie et médecine du développement et de la reproduction est situé dans l'hôpital Femme-Enfant-Adolescent. Il rassemble des activités cliniques et des activités biologiques indissociables l'une de l'autre.

L'activité de soins du service est centrée sur le diagnostic et la prise en charge des couples ou patients infertiles grâce aux techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP), telles que l'insémination intra utérine, la fécondation *in vitro*, le diagnostic pré-implantatoire et le transfert d'embryons congelés. Le Centre d'AMP réalise en moyenne 1100 tentatives de F.I.V. et F.I.V.-I.C.S.I., 350 I.A.C. et 350 I.A.D. par an, ce qui le situe parmi les dix centres français les plus importants.

Le service réalise également la cryoconservation de sperme ou de tissus gonadiques afin de préserver la possibilité de devenir parents à des patients devant subir un traitement potentiellement stérilisant (suite à un cancer par exemple).

L'activité de soins est assurée par une équipe pluridisciplinaire qui réunit des gynécologues, des endocrinologues, des biologistes médicaux, des sages-femmes et des techniciens de laboratoire.

L'activité d'AMP est certifiée **ISO 9001**.

4. Organisation de la qualité au niveau du laboratoire de biologie médicale

L'organisation de la qualité au niveau du laboratoire est détaillée dans le Manuel Qualité du laboratoire de biologie médicale du C.H.U. de Nantes.

Extrait du Manuel Qualité du laboratoire de biologie médicale du C.H.U. de Nantes :

« Le groupe qualité :

Ce groupe est constitué d'au moins un biologiste de chaque service de biologie médicale et des qualitiens du pôle. Sa mission est de proposer des outils et des méthodes en lien avec les objectifs définis par la Direction du Laboratoire et de suivre les plans d'action du LBM. Des sous-groupes de travail peuvent être organisés sur certaines thématiques. Le groupe qualité assure également la veille réglementaire.

Le comité de suivi 15189 (COSU) :

Ce comité est constitué de la direction et des qualitiens du laboratoire, des représentants de chaque service de biologie médicale (le cadre de santé, un biologiste et un technicien) et un représentant de la DURQ (Direction des Usagers, des Risques et de la Qualité). Ce comité a pour mission d'assurer le suivi du plan d'actions dans le cadre de la mise en place de la démarche d'accréditation ISO 15189 et ISO17025, de suivre les actualités réglementaires et de diffuser toutes informations utiles à la démarche qualité du Laboratoire.

Chaque service de biologie médicale a défini dans sa Fiche Manuel Qualité son organisation lui permettant de répondre aux exigences de l'accréditation ».

Intérêts et objectifs

1. Exigences réglementaires et normatives

Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale

Article 6221-1 : « un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation ».

Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013

« A compter du 1er novembre 2016, les laboratoires de biologie médicale ne peuvent fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 50 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent.

A compter du 1er novembre 2018, les laboratoires de biologie médicale ne peuvent fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 70 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent.

A compter du 1er novembre 2020, les laboratoires de biologie médicale ne peuvent fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 100 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent ».

Norme NF EN ISO 15 189 décembre 2012

La validation de méthode est abordée dans différents paragraphes de la norme NF EN ISO 15 189 :

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 ».

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

5.5.1.3 « Le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes : - [...] - les méthodes validées, puis modifiées. La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles, 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 personnel compétent doit examiner les résultats de la validation et enregistrer la revue ».

Le guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (document SH GTA 04) est un guide technique explicitant les exigences des paragraphes 5.3 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15 189.

2. Intérêt pour le service de biologie et médecine du développement et de la reproduction

Le service de biologie et médecine du développement et de la reproduction participe activement à la démarche d'accréditation et a déposé une liste d'examens pour l'extension 2016 d'accréditation : volume, pH et viscosité. La stratégie adoptée pour le service est de présenter l'ensemble des examens de spermologie et d'embryologie lors de la visite du COFRAC en 2018.

Lors de mon stage dans le service de biologie et médecine du développement et de la reproduction du C.H.U. de Nantes, j'ai pu réaliser plusieurs validations de méthode. Pour le sujet de ce mémoire, je me suis limité à la présentation de la validation de méthode de la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat.

3. Intérêt de la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat

Le spermogramme est réalisé en première intention dans l'exploration des couples infertiles. L'objectif est de proposer aux patients un examen participant au bilan d'infertilité du couple et de proposer, si nécessaire, une prise en charge adaptée ou d'assurer le suivi d'un patient en parcours d'AMP.

Le spermogramme se compose de différents tests : pH ; volume ; viscosité ; numération, concentration, mobilité et morphologie des spermatozoïdes (spermocytogramme).

Pour information, un test de migration-survie et une spermoculture sont associés au spermogramme dans le cadre d'une prise en charge en AMP.

4. Objectifs

Les objectifs de ce mémoire sont doubles :

- Objectif technique : validation de méthode initiale concernant la détermination de la concentration des spermatozoïdes (non réalisée auparavant). De plus, les recommandations O.M.S. étaient suivies de façon partielle. Un travail de validation de méthode s'imposait donc pour confirmer la fiabilité de nos résultats.
- Objectif réglementaire : afin de se mettre en conformité avec la norme NF EN ISO 15 189, un dossier de validation de méthode doit être déposé au COFRAC pour accréditer cette technique.

Le spermogramme

Tous les patients devant réaliser un prélèvement de sperme pour réaliser un spermogramme doivent respecter une abstinence sexuelle de deux à sept jours (délai préconisé par l'O.M.S.). Après vérification de l'identité du patient et après avoir recueilli les éléments cliniques pertinents (fièvre dans les 3 derniers mois, traitements, délai d'abstinence, antécédents uro-génitaux...), le patient procède au recueil de sperme par masturbation.

Après recueil, les prélèvements sont placés sur un agitateur orbital afin de favoriser la liquéfaction du sperme. Celle-ci devant être faite à température ambiante (20-37°C), la pièce est équipée d'une sonde de température reliée au système de contrôle Océasoft®. En cas de dysfonctionnement de l'agitateur orbital, le prélèvement est laissé au repos sur la paillasse le temps de la liquéfaction.

Le spermogramme débute par un examen macroscopique du sperme juste après sa liquéfaction, environ 30 minutes après le recueil. En effet, juste après l'éjaculation, l'échantillon de sperme est une masse coagulée semi-solide qui se liquéfie spontanément en quelques minutes à température ambiante. L'échantillon devient finalement presque liquide. Des granules gélatineux qui ne se liquéfient pas peuvent persister dans le prélèvement mais cela ne semble pas avoir d'impact clinique.

L'examen macroscopique du sperme doit être débuté dès que la liquéfaction est obtenue. En effet, il faut réduire le temps de contact entre le liquide séminal et les spermatozoïdes. Une durée de 30 minutes est préconisée, les lectures de la mobilité, de la vitalité et du MAR-test devant impérativement être faites dans l'heure qui suit le prélèvement.

Le volume de l'éjaculat dépend principalement des vésicules séminales et de la prostate mais aussi des glandes de Cowper et de l'épididyme. La mesure de l'éjaculat est très importante pour la détermination du nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat. La limite inférieure définie par l'O.M.S. est de 1,5 mL. Le volume de l'éjaculat se fait par pesée du réceptacle qui a servi au prélèvement. Lors de l'accueil du patient, le réceptacle est identifié avec une étiquette du patient et pesé. Le réceptacle est pesé une seconde fois après le recueil de l'éjaculat pour obtenir par soustraction le poids de celui-ci. La densité du sperme est considérée comme égale à 1 g/ml : un poids de 1,5 g correspond un volume de 1,5 mL.

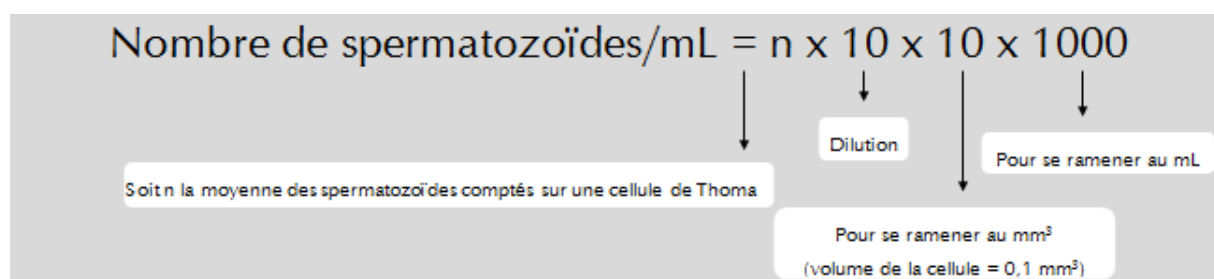
La solution dégradée validée en cas de pesée non réalisable est la mesure à l'aide d'une pipette graduée. Un dossier de validation de méthode concernant le volume a déjà été adressé au COFRAC pour accréditation.

Une fois la liquéfaction faite, la viscosité de l'éjaculat peut également être évaluée à l'aide d'une pipette (viscosité faible, normale ou forte).

Un éjaculat défini comme visqueux doit être traité avec précaution pour ne pas induire d'erreurs de résultats. En effet, un prélèvement visqueux est difficile à pipeter et l'échantillon étudié peut ne pas être représentatif de l'éjaculat. Une pipette à déplacement positif est utilisée si le sperme est trop visqueux.

La détermination de la concentration des spermatozoïdes nécessite un microscope à contraste de phase, une cellule de comptage (cellule de Thoma dans notre laboratoire), des pipettes pour effectuer les dilutions nécessaires et un diluant (dilution de formaldéhyde). Selon l'O.M.S., la chambre de comptage recommandée est la cellule de Neubauer. Comme nous utilisons une cellule de Thoma, nous avons donc réalisé une validation de méthode (portée B).

Avant cette validation de méthode, une dilution systématique du sperme au 1/10^{ème} était réalisée lors du dispatch après homogénéisation du prélèvement. La dilution du sperme était homogénéisée à l'aide d'un vortex juste avant le dépôt sur la cellule de Thoma. Après sédimentation des spermatozoïdes, l'opérateur comptait au grossissement x400 le nombre de spermatozoïdes sur une, deux ou quatre colonnes. Il n'y avait pas de nombre minimum de spermatozoïde à compter. L'opérateur déposait deux fois la dilution réalisée afin de procéder à deux comptes. La moyenne de ces deux comptes servait à calculer la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat :



Pour cette validation de méthode une étude bibliographique a été réalisée :

L'O.M.S. (Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva : World Health Organization ; 2010) recommande d'adapter la dilution en fonction du nombre de spermatozoïdes observés à l'examen direct. En effet, pour réduire le risque d'erreur, un nombre minimum de spermatozoïdes doit être compté. L'O.M.S. recommande un compte total d'au moins 400 spermatozoïdes sur deux comptes d'approximativement 200 spermatozoïdes chacun. En effet, la précision de l'estimation de la concentration de spermatozoïdes dans un éjaculat dépend du nombre de spermatozoïdes comptés. Selon la loi de Poisson, l'intervalle de confiance à 95% du nombre de spermatozoïdes comptés dans un volume donné de sperme est approximativement $N \pm 1.96 \sqrt{N}$ avec N : nombre de spermatozoïdes comptés. Pour 100 spermatozoïdes comptés, l'intervalle de confiance à 95 % est 80-120, pour 200 spermatozoïdes 172-228 et pour 400 spermatozoïdes : 360-440.

Le tableau ci-dessous indique le pourcentage d'erreur qu'il existe sur l'estimation de la concentration des spermatozoïdes en fonction du nombre total de spermatozoïdes comptés :

Table 2.2 Rounded sampling errors (%) according to total number of spermatozoa counted

Total (N)	Sampling error (%)	Total (N)	Sampling error (%)	Total (N)	Sampling error (%)
1	100	25	20	85	10.8
2	70.7	30	18.3	90	10.5
3	57.7	35	16.9	95	10.3
4	50	40	15.8	100	10
5	44.7	45	14.9	150	8.2
6	40.8	50	14.1	200	7.1
7	37.8	55	13.5	250	6.3
8	35.4	60	12.9	300	5.8
9	33.3	65	12.4	350	5.3
10	31.6	70	12	400	5
15	25.8	75	11.5	450	4.7
20	22.4	80	11.2	500	4.5

Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva : World Health Organization ; 2010.

Pour permettre de compter avec précision un nombre de spermatozoïdes suffisant, une dilution adaptée de l'échantillon de sperme est nécessaire. Cette dilution est évaluée à partir d'une préparation de sperme non diluée. L'opérateur effectue une estimation du nombre de spermatozoïdes par champ au grossissement x400 et adapte sa dilution en fonction de son observation.

Le tableau ci-dessous indique les dilutions requises en fonction du nombre de spermatozoïdes observés par champ au grossissement x400 :

Nombre de spermatoïdes par champ (objectif x400)	Dilution requise
> 101	1:20 (1+19)
16 - 100	1:5 (1+4)
< 16	1:2 (1+1)

Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva :
World Health Organization; 2010.

De plus, l'O.M.S. recommande, pour s'affranchir de la viscosité du sperme et donc de l'hétérogénéité potentielle des résultats, de réaliser deux fois la même dilution, en prélevant le sperme dans le réceptacle à deux endroits différents. Ces deux dilutions sont ensuite introduites dans une cellule de comptage. Après sédimentation des éléments (quatre à cinq minutes), un compte des spermatozoïdes est effectué dans les deux cellules de comptage. L'O.M.S. fournit un tableau des différences acceptables entre deux comptes. Si la différence est acceptable, le résultat de la moyenne des deux comptes peut être rendu, et donc, l'opérateur peut calculer la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat. Connaissant le volume, nous pouvons également déterminer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Si la différence n'est pas acceptable, l'opérateur doit refaire deux dilutions et procéder à deux nouveaux comptes.

Table 2.4 Acceptable differences between two replicate counts for a given sum

Sum	Acceptable Difference*	Sum	Acceptable Difference*
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

*Based on the rounded 95% confidence interval.

Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva :
World Health Organization ; 2010.

Validation de méthode

1. Etapes de réalisation du projet :

La validation de méthode s'est déroulée en plusieurs étapes :

- Bibliographie sur les différentes méthodes de détermination de la concentration des spermatozoïdes
- Description des différentes étapes de la méthode
- Réalisation d'une analyse de risques
- Réalisation des mesures nécessaires à la validation de méthode
- Exploitation des données
- Rédaction du rapport de validation de méthode et modification du mode opératoire de la détermination de la concentration des spermatozoïdes
- Rédaction du mémoire

La validation de méthode a été réalisée en se basant sur différents référentiels : le SH GTA 01 (Guide technique d'accréditation en biologie médicale), le SH GTA 04 (Guide technique d'accréditation de vérification / validation des méthodes en biologie médicale), le SH GTA 14 (Incertitude de mesure) et le Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva : World Health Organization ; 2010.

Une procédure interne au laboratoire (7180-PR-022) décrit les lignes directrices et les modalités de mise en œuvre pour la validation des méthodes quantitatives. Cette procédure reprend les éléments du guide technique d'accréditation SH GTA 04.

2. Analyse de risques

Une analyse de risques a été réalisée en amont de l'évaluation des performances de la méthode. En effet, dans le cadre d'une validation de méthode, le laboratoire est amené à réaliser une analyse de risques, afin d'évaluer les points critiques de la méthode qu'il utilise et mettre en place des actions correctives et/ou préventive. L'analyse de risques permet d'anticiper les problèmes avant qu'ils ne se produisent.

L'analyse de risques a été effectuée selon la méthode des « 5 M » (diagramme d'Ischikawa ; Matière/Milieu/Matériel/Main d'œuvre/Méthode). Cette méthode permet de recenser de manière exhaustive les causes et les effets des dysfonctionnements pouvant survenir pendant un processus.

Cette analyse peut être complétée avec la méthode AMDEC. Elle prend en compte la gravité, la fréquence d'apparition et les moyens de détection du risque identifié. Les qualitiens du pôle de biologie du C.H.U. de Nantes ont rédigé une analyse de risques simplifiée pour les vérifications/validations de méthode. Les risques identifiés sont regroupés selon les « 5 M » et l'échelle de criticité utilisée (allant de 2 à 10) correspond à la notion de « gravité » :

- 2 : pas d'impact sur l'analyse
- 5 : perte de temps, perte de réactif
- 7 : impact empêchant de rendre le résultat
- 10 : risque de résultat erroné

Pour information, une analyse de risques détaillée du secteur de spermologie a été effectuée selon les méthodes des « 5M » et AMDEC. Elle est réévaluée une fois par an.

L'analyse de risques de la validation de méthode de la détermination de la concentration des spermatozoïdes est présentée en annexe I.

3. Description du processus

Elements à vérifier (argumentation)	Modalités de validation
Essai sur site	<input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité
Essai sur site	<input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire (reproductibilité)
Essai sur site	<input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs
NA - absence de CQI externalisé	<input type="checkbox"/> 4. Justesse
EEQ	<input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude
NA - méthode quantitative	<input type="checkbox"/> 6. Sensibilité-spécificité analytique
CIQ + EEQ	<input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes
Bibliographie	<input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure
Essai sur site	<input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes
NA - examen microscopique	<input type="checkbox"/> 10. Interférences
NA	<input type="checkbox"/> 11. Contamination
NA - examen microscopique	<input type="checkbox"/> 12. Robustesse-stabilité réactifs
Bibliographie	<input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

4. Résultats et exploitation des données

A) Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage et dans un délai le plus court possible. Pour un même analyseur, la répétabilité doit être effectuée pour chaque analyte à mesurer et à plusieurs niveaux de concentration. Les résultats obtenus sont comparés aux CV annoncés par le fournisseur et/ou à d'autres critères (sociétés savantes...). Il est recommandé d'utiliser au minimum deux niveaux de concentrations choisis en fonction des valeurs physiopathologiques.

La répétabilité a été étudiée sur trois échantillons de sperme frais présentant trois niveaux de concentrations de spermatozoïdes différentes. Pour le premier niveau, nous avons sélectionné un sperme présentant une oligospermie ; pour le second niveau, une concentration de spermatozoïdes à la limite de la référence O.M.S. (15 millions/mL) ; pour le troisième niveau, un sperme ayant une concentration normale de spermatozoïdes. Après dilution dans du formaldéhyde, 30 dépôts ont été réalisés sur des cellules de Thoma et lus par un seul opérateur. Le coefficient de variation limite théorique est calculé selon la formule : CV répétabilité = 0,75 CV reproductibilité (A. Vassault and *al.* Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Annales de Biologie Clinique. 1999 ; 57(6):685-95).

Pour les trois niveaux, nous obtenons des coefficients de variation inférieurs aux coefficients de variation limites définis par RICOS and *al.* Les résultats sont donc conformes.

Les différentes mesures sont présentées en annexe II.

<u>REPETABILITE</u>							
		<input checked="" type="checkbox"/> Applicable		<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)			
Echantillons	Nombre (N)	Moyenne Millions/mL	Ecart-type Millions/mL	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion
Niveau 1	51068	8,04	0,71	8,9	NA	10	Conforme
Niveau 2	51185	16,09	1,46	9,1	NA	10	Conforme
Niveau 3	51166	29,56	2,79	9,4	NA	10	Conforme

Tableau 1 : résultats de l'étude de répétabilité

B) Reproductibilité

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages...

La reproductibilité a été étudiée sur les 3 mêmes niveaux de concentration des spermatozoïdes que la répétabilité.

Les dilutions de sperme ont été lues par l'ensemble des techniciens, ingénieurs, internes et biologistes présents. Une lecture a été faite le matin et une seconde l'après-midi. Pour des raisons d'effectifs, le nombre de lecture est égale à quatorze.

Nous obtenons des coefficients de variation inférieurs aux coefficients de variation limites définis par RICOS and *al*. Les résultats sont donc conformes.

Les différentes mesures sont présentées en annexe III.

FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE								
		<input checked="" type="checkbox"/> Applicable	<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)					
Echantillons	Nombre (N)	Moyenne Millions/mL	Ecart-type Millions/mL	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion	
Niveau 1	51068	14	7,60	0,51	6,8	NA	13,4	Conforme
Niveau 2	51185	14	16,07	0,89	5,6	NA	13,4	Conforme
Niveau 3	51166	14	28,39	1,83	6,4	NA	13,4	Conforme

Tableau 2 : résultats de l'étude de reproductibilité

C) Justesse

La justesse est l'écart de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie).

L'absence de contrôle interne externalisé n'a pas permis d'étudier la justesse.

D) Exactitude

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des E.E.Q. : évaluations externes de la qualité. Ainsi, l'exactitude a été estimée à l'aide des derniers E.E.Q. auxquelles le laboratoire a participé.

Les biais obtenus pour les niveaux de concentration 1 et 3 sont conformes selon les recommandations de RICOS and *al*. Le biais obtenu pour la deuxième concentration est trop important pour être conforme. Néanmoins, le CV du groupe de pairs est de 14 % et le Zscore est satisfaisant. De plus, le résultat rendu ne change pas la prise en charge du patient. Ce résultat est donc acceptable.

EXACTITUDE (cas des contrôles externes ponctuels)								
<input checked="" type="checkbox"/> Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> Contrôles qualitatifs								
	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Zscore	Conclusion (quantitatif)
NUM. SPZ 2016-1A	5,9	6,12	6	-3,59	-1,67	15,60	-0,045	Conforme
NUM. SPZ 2015-2A	13,9	18,7	18	-25,67	-22,78	15,60	-0,71	Non conforme
NUM. SPZ 2014-1A	26,1	27,6	28,8	-5,43	-9,38	15,60	-0,39	Conforme

Tableau 3 : résultats de l'étude d'exactitude

E) Incertitude de mesure

« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée pour consigner les grandeurs mesurées sur les échantillons des patients [...] et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure ».

« Le laboratoire doit tenir compte de l'incertitude de mesure lors de l'interprétation des grandeurs mesurées. Sur demande, le laboratoire doit mettre ses estimations d'incertitude de mesure aux utilisateurs du laboratoire » (norme NF EN ISO 15189).

L'incertitude de mesure est calculée selon la méthode « C.I.Q. + E.E.Q. » décrite dans le guide SH-GTA-14 du COFRAC : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation

des incertitudes de mesure en biologie médicale. Elle est estimée à partir des données de reproductibilité et des résultats d'E.E.Q.

Les incertitudes obtenues paraissent élevées mais nos résultats sont dans les limites acceptables des différents E.E.Q. Le groupe de pairs a un écart-type élevé dans les différents E.E.Q., donc les incertitudes de mesure sont probablement surévaluées.

La variabilité intra-opérateur est maîtrisée en routine par la lecture systématique de deux dilutions de sperme pour chaque échantillon, en appliquant les critères O.M.S. pour l'acceptation des résultats (cf page 17).

La variabilité inter-opérateur est maîtrisée par le passage périodique de contrôles internes de qualité (échantillons frais). Cette variabilité prend en compte la préparation de la cellule de Thoma, mais également la variabilité inhérente à l'échantillon (qui ne peut être totalement maîtrisée).

De plus, les CV inter-opérateurs sont dans les limites acceptables (cf. reproductibilité/variabilité inter-opérateurs).

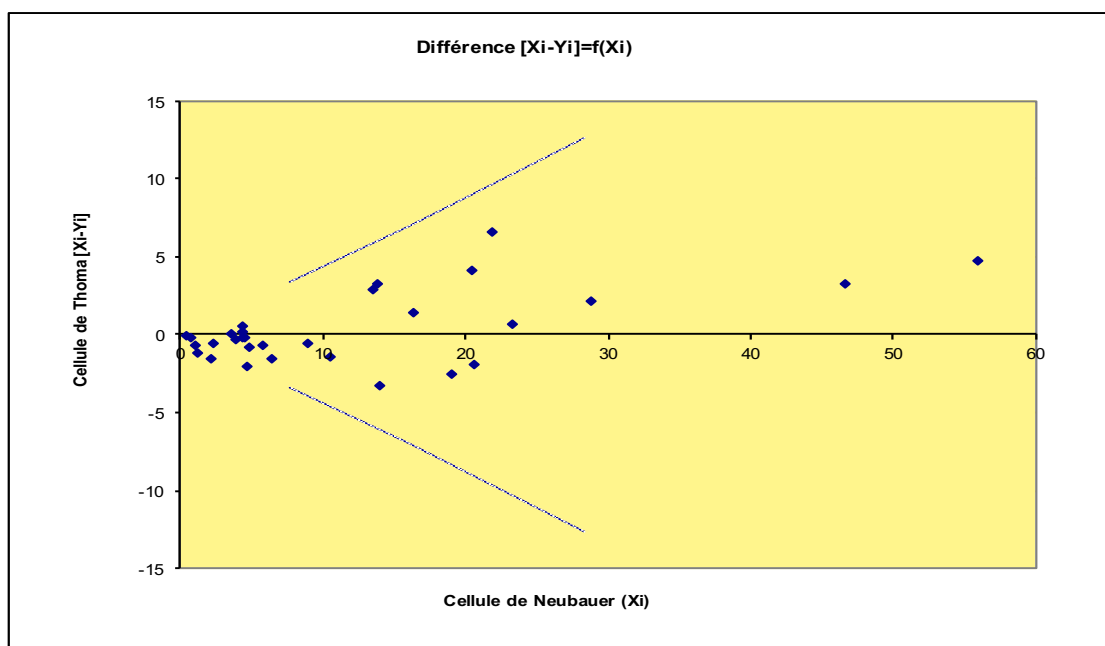
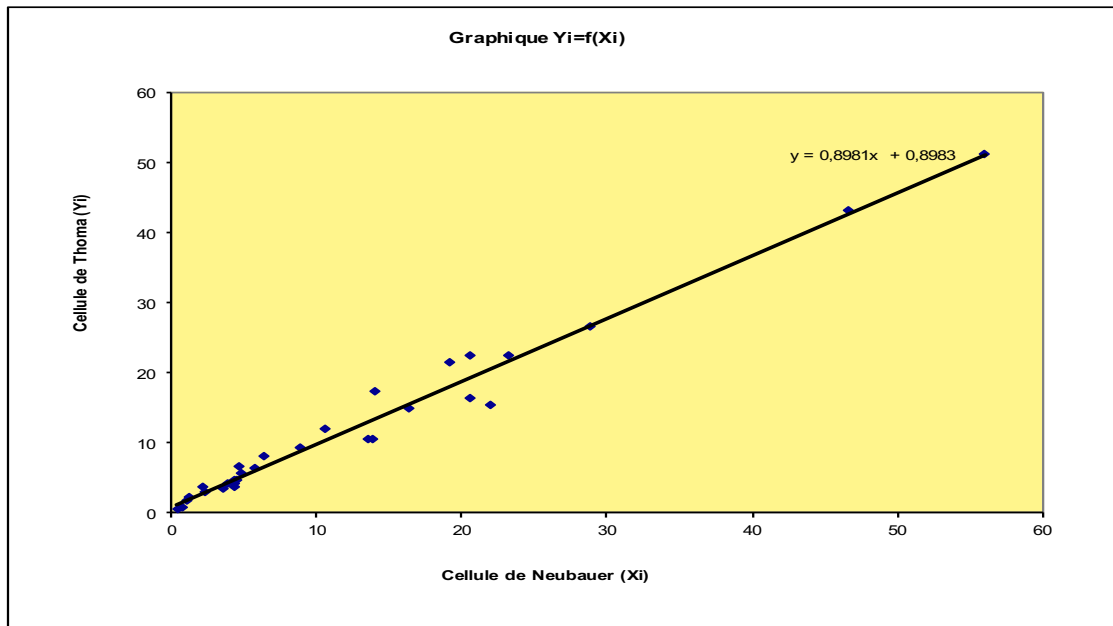
INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation)				
Méthodologie choisie: <input type="checkbox"/> analyse des risques <input checked="" type="checkbox"/> calcul				
	Incertitudes calculées			Exigences de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	CIQ + EEQ			SH-GTA-014
Quantification de l'incertitude Niveau 1	7,6 +/-	2,72	Millions/mL	NA
Quantification de l'incertitude Niveau 2	16,07 +/-	6,82	Millions/mL	NA
Quantification de l'incertitude Niveau 3	28,39 +/-	4,05	Millions/mL	NA

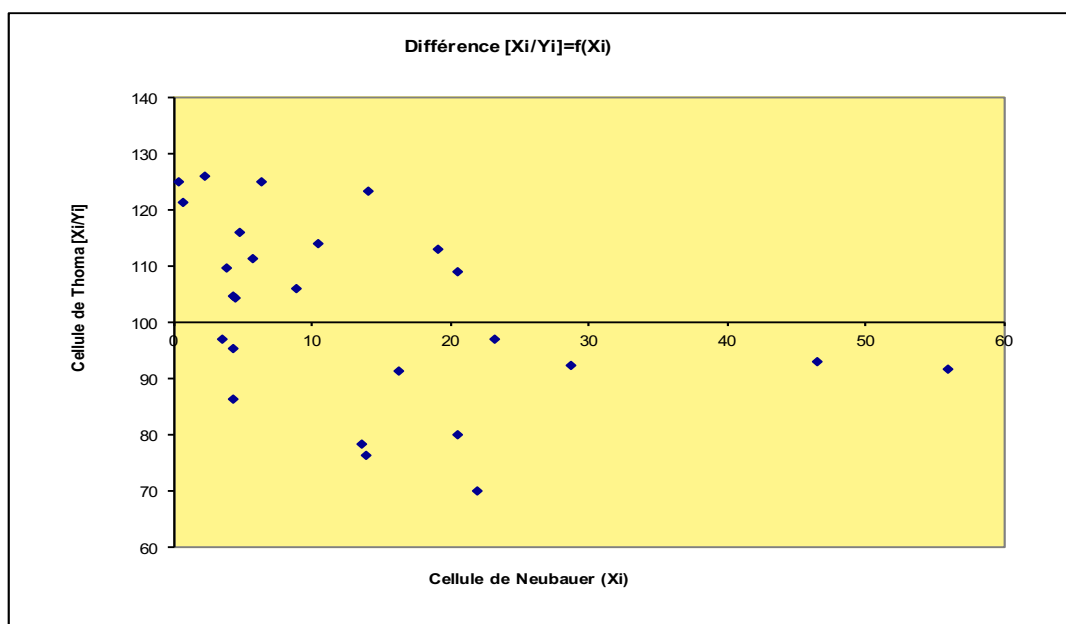
Tableau 4 : résultats de l'étude des incertitudes de mesure

F) Comparaison de méthodes

Selon l'O.M.S., la chambre de comptage recommandée est la cellule de Neubauer. Or, dans notre laboratoire, nous utilisons la cellule de Thoma. Nous avons donc réalisé une comparaison de méthodes entre ces deux cellules de comptage.

Nous avons analysé 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré. Ces échantillons ont été analysés par les deux techniques (cellule de Neubauer et cellule de Thoma). Nous avons ensuite établi les graphiques des différences $(x_i - y_i)$ fonction de x_i et (y_i / x_i) fonction de x_i (avec y_i : concentration obtenue avec la cellule de Thoma et x_i : concentration obtenue avec la cellule de Neubauer). Les limites retenues sont reportées sur le graphique $(x_i - y_i)$ fonction de x_i .





L'utilisation de la cellule de Thoma est donc conforme. Son utilisation est comparable à la cellule de Neubauer, méthode de référence définie par l'O.M.S.

L'ensemble des résultats est détaillé dans l'annexe IV.

Une seconde comparaison de méthodes a été réalisée initialement. En effet, nous ne réalisons pas les dilutions spécifiées par l'O.M.S. pour la détermination de la concentration des spermatozoïdes. Nous effectuons une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ systématiquement.

Nous avons donc comparé la dilution systématique au $1/10^{\text{ème}}$ aux dilutions recommandées par l'O.M.S. (cf page 16). Nous nous sommes rendu compte que la détermination de la concentration des spermatozoïdes n'était pas assez précise pour les patients présentant une oligospermie. La dilution au $1/10^{\text{ème}}$ ne nous permettait pas de compter un nombre suffisant de spermatozoïdes, aussi de fortes hétérogénéités intra et inter individuelle ont été observées.

Cette validation de méthode nous a donc sensibilisés à l'importance de compter un nombre suffisant de spermatozoïdes afin d'obtenir une erreur acceptable sur l'estimation de la concentration des spermatozoïdes. Elle nous a permis d'abandonner notre dilution systématique au $1/10^{\text{ème}}$ et d'adopter les dilutions recommandées par l'O.M.S.

G) Etendue de mesure

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité.

Selon le "Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. : World Health Organization; 2010", la limite de détection est de un spermatozoïde par éjaculat. La limite de quantification est de 250 000 spermatozoïdes par millilitre (erreur maximale acceptable = 20 %).

H) Intervalle de référence

Le laboratoire doit, selon le paragraphe 5.5.2 de la norme NF EN ISO 15 189, « définir les intervalles de référence biologique ou les valeurs de décision clinique, documenter la base des intervalles de référence ou valeurs de décision et communiquer ces informations aux utilisateurs ».

Après avoir effectué une revue de la littérature, nous avons pris comme référence le "Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. : World Health Organization ; 2010 ». Selon l'O.M.S., la limite basse de référence pour la concentration des spermatozoïdes est de 15 millions/mL. La limite basse de référence pour la numération totale des spermatozoïdes est de 39 millions par éjaculat.

Il n'existe pas de limite supérieure de référence.

I) Autres critères de performance

- Interférence : il n'y a pas d'interférence décrite pour notre méthode de détermination de la concentration des spermatozoïdes.
- Contamination : tous les prélèvements sont traités indépendamment les uns des autres. Il n'y a pas de contamination inter échantillon ou inter réactif.

Les autres critères de performance suivants n'ont pas été vérifiés :

- Spécificité et sensibilité analytique : non applicable, méthode quantitative et non qualitative.
- Stabilité et robustesse des réactifs : non applicable, lecture au microscope.

J) Stratégie de passage des contrôles internes de qualité

La stratégie adoptée pour le passage des C.Q.I. et des E.E.Q. est détaillée dans le mode opératoire 9060-MO-224.

Un contrôle interne de qualité est mis en place une fois par trimestre au laboratoire de spermologie. L'ensemble du personnel habilité réalise les paramètres demandés (numération, mobilité, vitalité et morphologie des spermatozoïdes). Un prélèvement de sperme frais est choisi au hasard au laboratoire de spermologie (NB : volume minimum du prélèvement de 3 millilitres pour que l'ensemble du personnel puisse réaliser les différents examens).

Chaque opérateur transmet ses résultats au biologiste. Parmi les possibilités existantes, le choix a été fait de garder la moyenne des résultats comme valeur cible. Le biologiste vérifie que l'ensemble des résultats rendus est compris dans l'intervalle : moyenne +/- deux écarts types (zone acceptable). Le bilan est tracé sur un imprimé spécifique et transmis à l'ensemble des opérateurs.

En cas de résultat non conforme à l'écart toléré, un entretien avec le ou les opérateurs concernés est réalisé pour déterminer dans quelles conditions l'examen a été réalisé. En fonction de la conclusion de cet entretien, une formation théorique et/ou pratique est organisée. L'efficacité de cette formation sera validée par un nouveau contrôle interne de qualité.

Le laboratoire de biologie de la reproduction est inscrit au programme d'E.E.Q. Biologie Prospective. Deux E.E.Q. concernant la détermination de la concentration des spermatozoïdes sont réalisées chaque année.

Révision du mode opératoire

Suite à notre étude bibliographique et suite à la comparaison de méthodes entre la dilution systématique au 1/10^{ème} et les dilutions recommandées par l'O.M.S., une mise à jour du mode opératoire a été réalisée.

Les trois changements majeurs ont été :

- Adaptation de la dilution en fonction du nombre de spermatozoïdes observés à l'examen direct au grossissement x400 (cf page 16).
- Réalisation simultanée de deux dilutions identiques. Lecture d'un dépôt de chaque dilution et acceptation du résultat en fonction du tableau des différences acceptables entre deux comptes fourni par l'O.M.S. (cf page 17). Auparavant, deux comptes étaient effectués sur une seule dilution.
- Détermination du nombre minimum de spermatozoïdes à compter afin d'obtenir une précision acceptable.

Le mode opératoire révisé concernant la numération des spermatozoïdes est présenté en annexe V.

Conclusion

Ce travail m'a permis de mettre en pratique les enseignements dispensés tout au long de l'année universitaire.

La validation de méthode portant sur la détermination de la concentration des spermatozoïdes a été réalisée. Elle était nécessaire pour connaître les performances et les limites de cette méthode. La méthode est répétable, reproductible et exacte. Les comparaisons de méthodes nous ont permis de valider l'utilisation de la cellule de Thoma pour la détermination de la concentration des spermatozoïdes et également, remettre en cause notre dilution systématique au $1/10^{\text{ème}}$. Nous avons réadapté les dilutions à effectuer et nous avons également défini un nombre minimum de spermatozoïdes à compter afin d'obtenir une erreur acceptable sur l'estimation de la concentration des spermatozoïdes. Cette validation de méthode nous a permis de revoir notre mode opératoire afin de rendre des résultats plus fiables pour nos patients.

L'accréditation des L.B.M. est une démarche comportant de nombreuses contraintes mais elle permet de prouver la fiabilité des résultats rendus, et donc d'améliorer la prise en charge des patients.

Bibliographie

1. Norme NF EN ISO 15 189, version 2012.
2. SH GTA 01 : Guide technique d'accréditation en biologie médicale, rev 01, 04/2015.
3. SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, rev 01, 04/2015.
4. SH GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, rev 00, 10/2011.
5. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. : World Health Organization ; 2010.
6. Exploration de la fonction de reproduction versant masculin. Cahier de formation Bioforma numéro 42, 2002.
7. A. Vassault and *al.* Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Annales de Biologie Clinique. 1999 ; 57(6) : 685-95.
8. Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013.
9. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010.
10. Manuel Qualité du laboratoire de biologie médicale du C.H.U. de Nantes.
11. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> : Mise à jour 2014 de l'article : Ricos and *al.* Current databases on biologic variation : pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999 ; 59 : 491-500.

Annexes

Annexe I : Analyse de risques.....	32
Annexe II : Répétabilité.....	33
Annexe III : Reproductibilité.....	34
Annexe IV : Comparaison de méthodes.....	35
Annexe V : Mode opératoire de la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat.....	36

Annexe I : Analyse de risques

5M	Points critiques	Echelles de criticité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise / Documents (procédures, modes opératoires...)
Matière (échantillon)	Identité	10	Identification de l'échantillon	Accueil du patient et prise en charge du prélèvement (9060-MO-005 et 9060-MO-141)
	Préparation du patient	7	Respect des consignes de prélèvement.	Accueil du patient (9060-MO-005)
	Type de contenants	5	Formation du personnel d'accueil	Accueil du patient (9060-MO-005)
	Nature et volume de l'échantillon	2	Sperme	Examen macroscopique de l'éjaculat (9060-MO-006)
	Délai et température avant traitement analytique	10	Liquéfaction, homogénéisation	Examen macroscopique de l'éjaculat (9060-MO-006)
	Prétraitement: centrifugation,...	10	Liquéfaction, homogénéisation	Examen macroscopique de l'éjaculat (9060-MO-006)
	Interférences		NA	NA
Milieu	Conditions de conservation et d'utilisation des échantillons		NA	NA.
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs	2	Conservation des réactifs	Préparation du diluant pour la numération des spermatozoïdes (9060-MO-023)
	Exigences environnementales		NA	NA
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau		NA	NA
	Surveillance des dérives	10	Pipettes	Gestion métrologique des pipettes (9060-MO-112)
	Contamination		NA	NA
	Informatique embarquée		NA	NA
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	2	Conservation des réactifs	Préparation du diluant pour la numération des spermatozoïdes (9060-MO-023)
	Gestion des stocks	5	Gestion du stock de formaldéhyde	NA
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	5	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks	Préparation du diluant pour la numération des spermatozoïdes (9060-MO-023)
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences...)	2	NA	Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva : World Health Organization; 2010.
	Causes d'incertitude de mesure	2	Calcul des incertitudes de mesures	Suivi des EEQ et CQI
Main d'œuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel	10	Formation et évaluation des compétences du personnel	Gestion des habilitations du personnel de Biologie et Médecine de la Reproduction (9060-MO-276)

Annexe II : Répétabilité

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Unité	Millions/mL	Millions/mL	Millions/mL
Date	01/07/16	22/07/16	18/07/16
N° de lot contrôle	NA	NA	NA
N° de lot réactif	NA	NA	NA
Opérateur	JMG	JMG	JMG
1	6,8	14,2	27,2
2	7,2	14,4	27,2
3	7,2	14,4	24,0
4	7,4	14,4	31,2
5	7,4	14,4	35,6
6	7,4	14,6	31,6
7	7,4	14,8	36,4
8	7,5	14,8	29,6
9	7,5	15,0	28,8
10	7,5	15,2	30,0
11	7,6	15,2	28,0
12	7,8	15,2	32,4
13	7,8	15,4	27,2
14	7,8	15,6	26,8
15	8,0	15,6	28,8
16	8,0	15,8	28,8
17	8,0	16,0	27,2
18	8,0	16,4	27,6
19	8,1	16,4	33,6
20	8,2	16,4	33,0
21	8,4	16,8	29,4
22	8,4	17,0	30,2
23	8,6	17,2	27,0
24	8,6	17,4	28,8
25	8,8	17,6	27,4
26	8,8	17,9	33,3
27	8,8	18,4	29,8
28	8,9	18,5	27,9
29	9,6	18,8	28,8
30	9,8	19,0	29,3

Annexe III : Reproductibilité

		Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Unité		Millions/mL	Millions/mL	Millions/mL
N°lot de contrôle		NA	NA	NA
N° de lot réactif - Date - opérateur - niveau 1	N° de lot réactif- Date - opérateur - niveau 2	N° de lot réactif - Date - opérateur - niveau 3		
NA-01/07/2016 matin-JMG	NA-22/07/2016 matin-JMG	NA-18/07/2016 matin-JMG	8,0	27,0
NA-01/07/2016 matin-DJ	NA-22/07/2016 matin-DJ	NA-18/07/2016 matin-DJ	8,4	31,2
		NA-18/07/2016 matin-MLC		26,6
NA-01/07/2016 matin-AH	NA-22/07/2016 matin-AH	NA-18/07/2016 matin-AH	7,6	16,4
NA-01/07/2016 matin-CS	NA-22/07/2016 matin-CS	NA-18/07/2016 matin-CS	8,0	15,1
NA-01/07/2016 matin-JL	NA-22/07/2016 matin-JL	NA-18/07/2016 matin-JL	7,1	16,1
NA-01/07/2016 matin-AR	NA-22/07/2016 matin-AR	NA-18/07/2016 matin-AR	7,2	18,3
NA-01/07/2016 matin-JF	NA-22/07/2016 matin-JF		6,8	15,7
NA-01/07/2016 AM-JMG	NA-22/07/2016 AM-JMG	NA-18/07/2016 AM-JMG	7,4	15,8
NA-01/07/2016 AM-DJ	NA-22/07/2016 AM-DJ	NA-18/07/2016 AM-DJ	8,2	17,0
		NA-18/07/2016 AM-MLC		26,4
NA-01/07/2016 AM-AH	NA-22/07/2016 AM-AH	NA-18/07/2016 AM-AH	8,0	15,8
NA-01/07/2016 AM-CS	NA-22/07/2016 AM-CS	NA-18/07/2016 AM-CS	8,1	15,9
NA-01/07/2016 AM-JL	NA-22/07/2016 AM-JL	NA-18/07/2016 AM-JL	7,4	14,8
NA-01/07/2016 AM-AR	NA-22/07/2016 AM-AR	NA-18/07/2016 AM-AR	6,9	16,4
NA-01/07/2016 AM-JF	NA-22/07/2016 AM-JF		7,4	15,0

Annexe IV : Comparaison de méthodes

Série X Méthode référence	Série Y Méthode à valider	Moyenne (X_i ; Y_i)	Différences [$X_i - Y_i$]	Rapport (Y_i / X_i) %
0,4	0,5	0,5	-0,1	125
0,7	0,8	0,7	-0,1	121
1,1	1,8	1,4	-0,7	164
1,2	2,4	1,8	-1,1	193
2,2	3,7	2,9	-1,5	170
2,3	2,9	2,6	-0,6	126
3,6	3,5	3,6	0,1	97
3,8	4,2	4,0	-0,4	110
4,4	3,8	4,1	0,6	86
4,4	4,6	4,5	-0,2	105
4,4	4,2	4,3	0,2	95
4,5	4,7	4,6	-0,2	104
4,6	6,6	5,6	-2,0	143
4,8	5,6	5,2	-0,8	116
5,8	6,4	6,1	-0,7	111
6,4	8,0	7,2	-1,6	125
8,9	9,4	9,1	-0,5	106
10,5	12,0	11,3	-1,5	114
13,6	10,6	12,1	3,0	78
13,9	10,6	12,3	3,3	76
14,0	17,3	15,7	-3,3	123
16,3	14,9	15,6	1,4	91
19,1	21,6	20,4	-2,5	113
20,5	16,4	18,5	4,1	80
20,6	22,4	21,5	-1,9	109
21,9	15,4	18,6	6,6	70
23,3	22,6	22,9	0,7	97
28,8	26,6	27,7	2,2	92
46,6	43,3	45,0	3,3	93
56,0	51,3	53,6	4,8	92

Annexe V : Mode opératoire de la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat

	MODE OPERATOIRE	Diffusion par :	
	Détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat	PHU 05 – Biologie de la Reproduction	9060-MO-010
	Processus : OPC-Organisation de la prise en charge du patient/Elaboration et prescription du programme de soins	Page 1 / 3	V. 02

1. OBJECTIFS

Ce mode opératoire décrit la marche à suivre pour déterminer la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Le(s) secteur(s) concerné(s) est(sont) :

PHU 05 – Femme, Enfant, Adolescent/Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction/Biologie

Ce mode opératoire s'adresse aux biologistes, internes et techniciens de laboratoire de spermologie et de Fécondation *in vitro*.

3. DESCRIPTION

La technique décrite a été établie à partir des recommandations de l'O.M.S. (Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva : World Health Organization ; 2010) et des résultats obtenus lors de la validation de méthode dans le cadre de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15 189.

3.1. Matériel et produits nécessaires :

- hématimètre (cellule de Thoma)
- pipette automatique 200 µL, 1000 µL
- pipette à déplacement positif 100 µL
- diluant (contenant du formaldéhyde)
- tube non stérile de 5mL

3.2. Dilution :

Pour effectuer une numération précise, un nombre minimum de spermatozoïdes doit être compté. La dilution de sperme requise est évaluée à partir d'une préparation de sperme non diluée, entre lame et lamelle à l'objectif x400. Le tableau ci-dessous indique la dilution requise en fonction du nombre de spermatozoïdes estimé par champ et des exemples de volumes de sperme et de diluant à pipeter. Les volumes pipetés sont à adapter à chaque patient en fonction du volume de sperme disponible.

Nombre de spermatozoïdes par champ (x 400)	Dilution requise	Sperme (µL)	Formaldéhyde (µL)
> 101	1:20 (1+19)	50	950
16-100	1:5 (1+4)	100	400
< 16	1:2 (1+1)	100	100

Dans le cas de sperme très visqueux, l'opérateur peut avoir du mal à pipeter le sperme avec une pipette classique. Une pipette à déplacement positif est alors disponible pour effectuer la dilution. Le volume pipeté est de 100 µL. L'opérateur adapte le volume de diluant en fonction de la dilution souhaitée (exemple : 1900 µL de diluant pour une dilution au 1 :20).

Réaliser **systématiquement** 2 dilutions pour permettre 2 lectures par le même opérateur.

3.3 Numération des spermatozoïdes

- Placer une lamelle spécifique sur la cellule de Thoma en la faisant adhérer sur les côtés grâce à de l'eau ou de l'alcool.
- Vortexer la dilution de sperme juste avant le dépôt.
- Introduire 1 goutte d'environ 10 µL dans l'hématimètre.
- Laisser reposer 4 mn.
- Pour les 2 dilutions, compter au moins 200 spermatozoïdes sur 1, 2 ou 4 colonnes au grossissement x400.
- Calculer la somme et la différence entre les 2 comptes.
- En fonction du tableau ci-dessous, déterminer l'acceptabilité de la différence calculée.
- Si la différence est acceptable, calculer la concentration de spermatozoïdes par mL en fonction de la dilution réalisée (voir annexe).
- Si la différence est trop importante, préparer 2 nouvelles dilutions et procéder à 2 nouveaux comptes.

Table 2.5 Acceptable differences between two counts for a given sum: low concentrations

Sum	Acceptable difference*	Sum	Acceptable difference*	Sum	Acceptable difference*
35-40	12	144-156	24	329-346	36
41-47	13	157-169	25	347-366	37
48-54	14	170-182	26	367-385	38
55-62	15	183-196	27	386-406	39
63-70	16	197-211	28	407-426	40
71-79	17	212-226	29	427-448	41
80-89	18	227-242	30	449-470	42
90-98	19	243-258	31	471-492	43
99-109	20	259-274	32	493-515	44
110-120	21	275-292	33	516-538	45
121-131	22	293-309	34	539-562	46
132-143	23	310-328	35	563-587	47

*Based on the rounded 95% confidence interval.

Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed.

Geneva : World Health Organization ; 2010

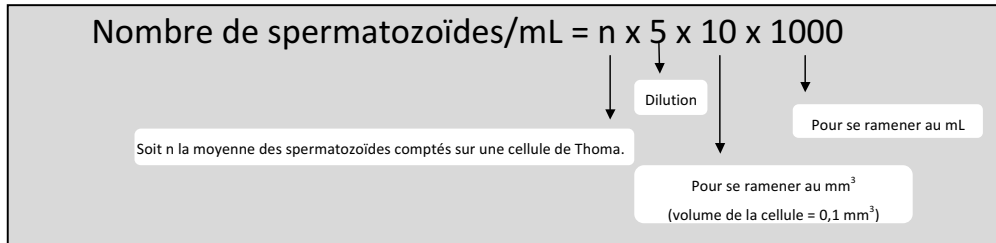
La limite de quantification est fixée à 250 000 spz /mL (erreur maximale acceptable = 20%).

Si le somme des deux comptes est inférieur à 25 spermatozoïdes, l'erreur sur l'estimation de la concentration des spermatozoïdes est supérieure à 20 %. Elle n'est donc pas considérée comme acceptable.

La concentration rendue est : < 250 000 spz /mL.

3.5 ANNEXE :

Exemple : détermination de la concentration des spermatozoïdes après une dilution au 1/5^{ème}



Résumé

Le spermogramme est un examen réalisé en première intention dans l'exploration des couples infertiles. L'objectif est de proposer aux patients un examen participant au bilan d'infertilité du couple et de proposer, si nécessaire, une prise en charge adaptée ou d'assurer le suivi d'un patient en parcours d'assistance médicale à la procréation.

Dans le cadre de l'accréditation, la validation de méthode est une exigence forte de la norme NF EN ISO 15 189, permettant une bonne connaissance des performances et des limites de la méthode utilisée. Ce mémoire présente la méthodologie et les résultats obtenus lors de la validation de méthode de la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans un éjaculat.

La validation de méthode a été réalisée en se basant sur différents référentiels : le SH GTA 01 (Guide technique d'accréditation en biologie médicale), le SH GTA 04 (Guide technique d'accréditation de vérification / validation des méthodes en biologie médicale), le SH GTA 14 (Incertitude de mesure) et le Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva : World Health Organization ; 2010.

Parallèlement, une analyse de risques a été menée afin d'identifier les points critiques de cette méthode et de mettre en œuvre des actions correctives et/ou préventives pour les maîtriser.

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale est une démarche comportant de nombreuses contraintes mais permettant de prouver la fiabilité des résultats rendus, et donc d'améliorer la prise en charge des patients. Cette validation de méthode nous a permis de revoir notre mode opératoire afin de rendre des résultats plus fiables pour nos patients.