

Université Pierre et Marie Curie -
Sorbonne Universités

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

VALIDATION D'UNE METHODE DE PORTEE B
Application à la concentration des spermatozoïdes dans le
secteur Spermiologie au Laboratoire de Biologie de la
Reproduction du centre hospitalo-universitaire d'Amiens.

PUY Vincent
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 les auteurs.

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

AUTEUR

PUY Vincent

Interne en Biologie médicale

Laboratoire de Biologie de la Reproduction
Centre hospitalo-universitaire d'Amiens
80054 AMIENS Cedex 1

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Docteur Naïma MANSOURI pour son soutien, sa patience et tous les échanges constructifs que nous avons pu avoir dans la mise en place de l'assurance qualité dans le service.

Je remercie le Professeur H. COPIN pour m'avoir donné l'opportunité de suivre la formation du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale ».

Je remercie vivement Madame le Docteur Valérie ADJIDE, responsable de l'assurance qualité du Laboratoire, ainsi que Monsieur Pierre LAFOY, ingénieur qualité, pour leur disponibilité et leurs conseils précieux.

Je remercie aussi les docteurs Madame ROSE et Madame LEMAIRE-HURTEL pour leurs avis et conseils.

Enfin et surtout, un grand merci aux technicien(nes) et mon co-interne du service qui ont tous participé à ce travail.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	6
1. INTRODUCTION	7
1.1. Présentation de la structure	7
1.2. Politique qualité et avancement dans la démarche d'accréditation	7
1.2.1. La politique qualité du Laboratoire	7
1.2.2. L'Accréditation	7
1.2.3. Etat de l'avancement vers l'accréditation dans le secteur d'AMP	8
1.3. Validation d'une méthode quantitative de portée B	9
1.3.1. Information normative	9
1.3.2. Intérêts et objectifs de l'étude	10
1.3.3. Problématique et limites de l'étude	11
2. METHODOLOGIE	11
2.1. Contexte de la méthode	11
2.1.1. Intérêt clinique	11
2.1.2. Principe de la mesure de la concentration en spermatozoïdes	11
2.1.3. Matériel	14
2.2. Protocole de validation de méthode	14
2.2.1 Maîtrise des risques	14
2.2.2 Evaluation de la performance et choix des critères d'acceptabilité	15
3. RESULTATS, ANALYSE ET INTERPRETATION	16
3.1. Maîtrise des risques	16
3.2. Evaluation expérimentale des critères de performance	20
3.2.1. Evaluation de la fidélité	20
3.2.1.1. Répétabilité	21
3.2.1.2. Fidélité intermédiaire	21
3.2.2 Variabilité inter-opérateurs	22
3.2.3. Evaluation de l'exactitude	23
3.2.4. Estimation de l'incertitude de mesure	23
3.2.5. Comparaison de méthode	26
3.2.6. Etendue de mesure	28
3.2.7. Autres critères de performance	29
4. CONCLUSION	29
5. BIBLIOGRAPHIE	30
6. ANNEXES	31

GLOSSAIRE

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

AMDEC : Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité

BDR : Biologie de la Reproduction

CBH : Centre de Biologie Humaine

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation

CV : Coefficient de Variation

DU : Diplôme Universitaire

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

ET : Ecart-Type

GTA : Guide Technique d'Accréditation

HPST : Hôpital, Patients, Santé et Territoires

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

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RAQ : Responsable Assurance Qualité

WHO : World Health Organization

§ : paragraphe

1. INTRODUCTION

1.1. Présentation de la structure

Avant 2012, le laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Amiens Picardie était composé de nombreux secteurs indépendants correspondant aux différentes disciplines de la biologie situés sur l'ensemble des quatre sites du CHU. Par la suite ces secteurs ont commencé leur regroupement sur le site de l'hôpital Sud pour former le Centre de Biologie Humaine (CBH). Le CBH dispose d'une plateforme commune robotisée qui assure les analyses depuis la phase pré-analytique jusqu'au rendu des analyses biologiques de grande routine dans des délais courts et maîtrisés en lien avec un Centre de Ressources Biologiques. Cette plateforme commune permet une mutualisation des compétences et des techniques et, localisée au cœur du centre de biologie, contribue à l'amélioration du potentiel de la recherche au CHU. Le regroupement de tous les secteurs est opérationnel depuis fin 2014. De plus, la fusion du laboratoire du Centre Hospitalier de Doullens, situé à 40 kms au Nord d'Amiens, avec le laboratoire du CHU est effective depuis le dernier trimestre 2014 ce qui a pour conséquence de faire du laboratoire du CHU Amiens Picardie un laboratoire dit multi sites. Les deux établissements ont par ailleurs une direction commune.

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

1.2.1. La politique qualité du Laboratoire

Le Laboratoire du CHU d'Amiens développe et met en œuvre une politique qualité ayant pour objet d'améliorer la prise en charge des clients (patients, prescripteurs) et d'être à leur écoute afin de mieux répondre à leurs besoins (cf. annexe I). La direction du laboratoire s'est engagée dans ce sens (cf. annexe II).

1.2.2. L'Accréditation

Après la publication de la loi HPST (Hôpital, Patients, Santé et Territoires) le 21 juillet 2009, l'ordonnance d'application du 13 janvier 2010 relative à la réforme de la biologie médicale en France rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) publics et privés selon la norme internationale NF EN ISO 15189 (dernière version parue en décembre 2012) « Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence » [1]. Cette accréditation est délivrée par le COmité FRançais

d'ACcréditation (COFRAC). Les LBM, publics et privés, doivent être accrédités au 1^{er} novembre 2020 sur la totalité de leurs activités et à hauteur de 50% en 2016, 70% en 2018.

En ce qui concerne l'engagement dans les démarches d'accréditation, le premier pas, pour le pôle de Biologie, Pharmacie et Santé des Populations, a été fait par le laboratoire d'hygiène du CHU qui, depuis sa création en 1985 au sein du laboratoire de bactériologie, a toujours eu comme exigence principale la satisfaction de ses clients. En effet, le laboratoire d'hygiène réalise, depuis plusieurs années, les analyses en respectant les normes techniques lorsqu'elles existent. Il a entamé, depuis l'année 2010, une démarche qualité en vue d'une accréditation par le COFRAC selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour les prélèvements et analyses d'eaux pour la recherche et le dénombrement de *Legionella sp* et de *Legionella pneumophila*. Cette accréditation, obtenue le 1^{er} avril 2012, a été depuis à chaque fois maintenue et étendue à la recherche et l'identification de certains micro-organismes dans les eaux froides.

Ainsi, cette expérience a ouvert la voie à l'engagement d'autres secteurs comme celui de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) dans la démarche d'accréditation selon, cette fois, la norme NF EN ISO 15189. Le dépôt de demande d'accréditation partielle a été faite le 31 octobre 2012 pour un nombre limité d'exams. Après une visite d'évaluation initiale en février 2014, l'accréditation a été obtenue le 1^{er} novembre 2014 (Voie A).

1.2.3. Etat de l'avancement vers l'accréditation dans le secteur d'AMP

Le Laboratoire a demandé l'extension de son accréditation initiale pour les lignes de portée d'accréditation SP1, pour le spermogramme, et AP3 pour le recueil des complexes cumulo-ovocytaires pour le secteur d'AMP selon le document SH INF 50 du COFRAC [2]. En ce qui concerne le spermogramme, sa validation de méthode a été établit comme un processus complexe composé de 4 sous-processus (concentration en spermatozoïdes, mobilité des spermatozoïdes, viscosité et volume du sperme).

Interne médecin biologiste en cours de spécialisation en Biologie de la reproduction, je participe à la mise en place de l'assurance qualité dans le secteur de l'AMP. J'ai pu assister aux différents audits internes ainsi qu'à la visite du COFRAC qui s'est déroulée entre le 23 et le 25 février 2016. Celle-ci a conclu à un total de 13 écarts (dont 8 critiques) soumis à des preuves complémentaires pour septembre 2016. La validation de méthode du spermogramme a fait l'objet d'un écart critique (cf. annexe III). Mon rôle aura été de reprendre avec l'équipe du secteur d'AMP la validation/vérification de méthode du spermogramme en nous aidant du rapport d'expertise (cf. annexe IV). Dans ce mémoire, j'ai décidé de présenter la validation d'un sous-processus de portée B à savoir la concentration des spermatozoïdes dans le sperme éjaculé.

1.3. Validation d'une méthode quantitative de portée B

1.3.1. Information normative

Les exigences organisationnelles et techniques pour la réalisation d'examens de biologie médicale sont mentionnées dans le document SH REF 02 [3]. Celui-ci précise et complète les dispositions législatives et réglementaires applicables relatives à la qualité des pratiques en biologie médicale ainsi que les exigences normatives du COFRAC.

Les types de portée d'accréditation et leurs modalités d'évaluation par le COFRAC pour les examens de biologie médicale sont présentés dans le document SH REF 08 [4].

Dans la norme NF EN ISO 15189, la validation est abordée aux paragraphes :

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

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

- § 5.5.1.2 : « *Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement.* » ; « *La vérification indépendante menée par le laboratoire doit confirmer, par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les performances annoncées pour la procédure analytique ont été satisfaites. Les performances annoncées pour la procédure analytique confirmées pendant le processus de vérification doivent être appropriées à l'utilisation prévue des résultats d'examen. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification et enregistrer les résultats obtenus.* »

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

Le guide technique SH GTA 04 [5] explicite les exigences des paragraphes 5.3 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15189 concernant la vérification sur site/validation des méthodes en

biologie médicale, en se fondant sur les bonnes pratiques dans ce domaine et les performances communément observées et acceptées (état de l'art).

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

- du **type de flexibilité** :

* Méthode « fournisseur » (portée flexible standard A), dite adoptée, avec uniquement une vérification de performances sur site,

* Méthode adaptée ou développée en interne (portée flexible étendue B), avec une validation de méthode.

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

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

Notre travail porte sur une méthode quantitative utilisant un système analytique avec marquage CE (lame de Kova) adapté par rapport aux référentiels (cellules de Malassez ou de Neubauer) [6,7]. Il s'agit donc d'une validation de méthode de portée B.

La validation de la concentration en spermatozoïde est un sous processus du processus complexe « spermogramme » que j'ai reprise suite à la visite du COFRAC en début de cette année 2016 en m'appuyant sur le document SH GTA 04 [5], la procédure du Laboratoire et la fiche-type SH FORM 43 [8].

1.3.2. Intérêts et objectifs de l'étude

L'objectif principal de ce travail était d'améliorer l'assurance qualité dans le secteur d'AMP. La concentration en spermatozoïdes du sperme éjaculé est un sous processus du processus complexe spermogramme. La fiche d'écart critique (cf. annexe III) et le rapport d'expertise de l'auditeur du COFRAC ont pointé le manque d'éléments de justification voir l'absence de certains critères de performance pourtant indispensables comme le calcul des incertitudes de mesure (cf. annexe IV). L'objectif a donc été de répondre aux exigences de l'Accréditation pour la concentration des spermatozoïdes et d'améliorer notre démarche qualité. Nous avons donc repris l'analyse des risques ainsi que chacun des critères de performance relatifs à une validation de méthode quantitative de portée B.

1.3.3. Problématique et limites de l'étude

Nous avons été confrontés au manque de données bibliographiques relatives aux critères de performance. Seule la table Ricos donne des objectifs concernant le spermogramme mais ceux-ci ne sont extraits que d'un article et ne sont pas donnés par niveau de valeurs, diminuant donc fortement leur pertinence. Pour certains sous-processus (mobilité, vitalité) ces objectifs théoriques ne sont d'ailleurs pas tenus, mais dans tous les cas nous avons privilégié l'intérêt clinique dans l'analyse des limites d'acceptabilité.

2. METHODOLOGIE

2.1. Contexte de la méthode

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

2.1.1. Intérêt clinique

Le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat et la concentration en spermatozoïdes sont corrélés au taux de grossesse [9]. C'est est une caractéristique physique cruciale évaluée lors de l'examen du sperme en routine. Elle permet de définir l'oligospermie qui correspond à une concentration inférieure à 15 millions de spermatozoïdes selon l'OMS. Confirmée à 3 mois, cette diminution engendre la réalisation d'un bilan andrologique diagnostique variable selon le degré d'oligospermie (bilan hormonal, échographie testiculaire, caryotype si < 10 millions/mL, recherche de la micro-délétion du chromosome Y en cas d'azoospermie..). De plus la concentration en spermatozoïdes associée à la mobilité permet d'orienter le choix de la technique d'AMP la plus adaptée (insémination intra-utérine, fécondation in vitro classique ou avec micro-injection).

2.1.2. Principe de la mesure de la concentration en spermatozoïdes

Il s'agit d'une méthode manuelle utilisant la cellule de Kova comme chambre de comptage des spermatozoïdes. Le principe de sa mesure est décrit dans la fiche analyse du spermogramme de notre Laboratoire. Le choix de la dilution du sperme est adapté à l'évaluation initiale au microscope (cf. table 1). Si le nombre de spermatozoïdes semble faible (entre 8 et 400 spermatozoïdes au grossissement 20 ou 40) lors de l'observation

microscopique initiale, on effectuera une dilution moindre ($1/10^{\text{ème}}$, $1/5^{\text{ème}}$, $1/2$), au contraire la dilution sera plus forte si le nombre de spermatozoïdes semble très élevé ($1/20^{\text{ème}}$, $1/40^{\text{ème}}$, plus rarement $1/80^{\text{ème}}$).

Nb. de spermatozoïdes (x 20)	Nb. de spermatozoïdes (x 40)	Dilution requis	Sperme (µl)	Milieu de dilution (µl)
> 100	> 400	1 : 20	50	950
16-100	64-400	1 : 5	50	200
2-15	8-60	1 : 2	50	50
<2	<8	1 : 2	50	50

Table 1 : Dilutions requises pour calculer la concentration spermatique (OMS 2010).

Détermination de la concentration des spermatozoïdes :

- 1- Préparer le volume nécessaire de solution de dilution dans deux tubes coniques identifiés au nom du patient.
- 2- Déposer à l'aide de la pipette à déplacement positif 50 µL de sperme bien homogénéisé dans chaque tube contenant la solution de dilution.
- 3- Bien homogénéiser.
- 4- Prélever 20µl de chaque préparation et déposez le par capillarité dans une chambre de la cellule Kova.
- 5- Laisser reposer 5 minutes.
- 6- Observer au microscope l'ensemble de la chambre afin de vérifier si la répartition des spermatozoïdes est homogène.
- 7- Compter les spermatozoïdes à l'objectif x40.
- 8- Ne compter que les spermatozoïdes à l'intérieur des petits carrés
- 9- Compter 200 spermatozoïdes sur la première préparation. (Retenez le nombre de carreaux comptés)
- 10- Compter le même nombre de carreau sur la deuxième préparation.
- 11- Faites la somme.
- 12- Déterminer l'acceptabilité de la différence entre les décomptes (cf. table 2).

Si la différence est acceptable calculez la concentration sinon reprendre à l'étape 1.

Calcul :

$$\begin{aligned} \text{Nombre de spermatozoïdes par } \mu\text{L} &= n \times 81 \times 1.1 \times \text{dilution} \\ &= n \times 90 \times \text{dilution} \end{aligned}$$

n = nombre moyen de spermatozoïdes par petit carré.

81 = nombre de petits carrés pour une cupule.

1.1 = facteur tenant compte des spermatozoïdes sur les traits de la grille.

Multiplier le résultat par 1000 pour obtenir le résultat en millions de spermatozoïdes par mL.

Pour les faibles concentrations : compter les deux chambres, diviser par 2, multiplier par la dilution.

somme	Différence acceptable	somme	Différence acceptable
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

Table 2: Acceptabilité des différences de 2 numérations en spermatozoïdes d'un même échantillon de sperme pour une somme donnée (WHO,2010).

Cas particulier : des spermatozoïdes à très faibles concentrations

- 1- En l'absence de spermatozoïdes à l'examen direct, une analyse du culot de centrifugation doit être réalisée afin d'éliminer une cryptozoospermie et d'affirmer l'absence totale de spermatozoïdes (azoospermie).

Pour cela, il faut :

- Procéder à une centrifugation de l'ensemble de l'éjaculat dans plusieurs tubes pendant 15 minutes à 3000g. Oter le surnageant, laisser environ 50µl de plasma séminal et remettre le culot en suspension.
- Déposer ensuite deux aliquotes de 10µl de la préparation entre lame et lamelle et observer au grossissement $\times 40$.
- Lire la lame en se déplaçant alternativement selon un axe X/Y en zig zag.

En présence de spermatozoïdes, on parle de cryptozoospermie. En l'absence de spermatozoïdes, cela suggère une azoospermie à confirmer après un délai de 3 mois.

2- Si lors de l'examen initial et lors de l'observation au grossissement 400 moins de 4 spermatozoïdes sont observés par champs on peut conclure à moins de 2 millions de spermatozoïdes /mL.

2.1.3. Matériel

La manipulation du sperme avant décompte est réalisée sous hotte et la détermination de la concentration en spermatozoïdes requiert le matériel suivant :

- Réceptacle de recueil de sperme stérile (Ref. CEB-CLINISPERM)
- Microscope optique : Nikon Eclipse 50i (Ref : 2008.11.580/00)
- Lame de 10 cellules Kova® Glasstic® Slide (Ref : 87144 F)
- Micropipettes
- Micropipette à déplacement positif
- Cônes stériles
- Liquide de dilution MARCANO®, Ral Diagnostics (Ref. 310520-0125)

2.2. Protocole de validation de méthode

Il s'agit d'une méthode quantitative de portée B puisque la lame de Kova, utilisée comme chambre de comptage, ne constitue pas le support de référence contrairement à la cellule de Malassez ou de Neubauer. Nous avons utilisé le protocole de vérification/validation de méthode du Laboratoire.

2.2.1 Maîtrise des risques

C'est une étape essentielle en spermologie puisque le spermogramme est une analyse non automatisée pour laquelle beaucoup de paramètres extérieurs peuvent avoir un impact plus ou moins critique, notamment au niveau pré-analytique.

La gestion des risques consiste en lister les facteurs d'influence, d'évaluer leur criticité puis de mettre en place des moyens de maîtrise pour chacun de ces risques.

Pour lister les risques, nous avons utilisé le diagramme des 5 M : Matières, Matériel, Main d'œuvre, Milieu, Méthodes. La réalisation du diagramme d'Ishikawa nous a ainsi aidé à identifier les principaux facteurs d'influence susceptibles d'introduire une variation significative sur le résultat (cf. schéma 1).

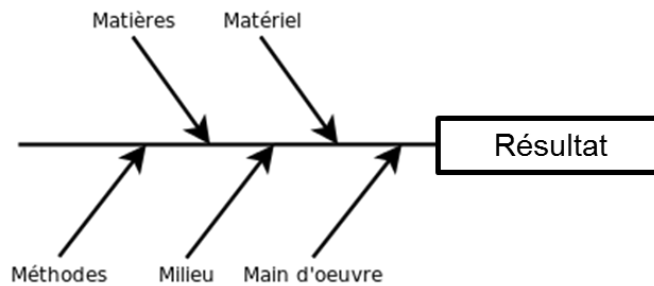


Schéma 1 : Diagramme d'Ishikawa

Après recueil des points critiques grâce au diagramme d'Ishikawa, nous avons évalué la criticité de chaque paramètre par la méthode d'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité (AMDEC).

Enfin nous avons réfléchi aux moyens de maîtrise de chaque point critique afin d'assurer une bonne gestion de ceux-ci.

2.2.2 Evaluation des performances et choix des critères d'acceptabilité

Le choix des critères d'acceptabilité associés à une méthode doit se faire préalablement à l'étude de vérification/validation. Il doit refléter l'état de l'art et surtout la pertinence clinique. Il doit aussi s'appuyer sur des recommandations de sociétés savantes ou de groupes de travail, sur des publications scientifiques, sur les résultats des contrôles externes de qualité. Le référentiel retenu par la biologiste responsable du service est la table de Ricos et al. (cf. table 3) ainsi que les Evaluations Externes de la Qualité (EEQ).

Spermogramme	CVw	CVg	I (%)	B (%)	TE (%)
Concentration	26.8	56.4	13.4	15.6	37.7
Morphologie	19.6	44	9.8	12	28.2
Mobilité progressive	15.2	32.8	7.6	9	21.6
Mobilité totale	18.4	29.8	9.2	8.8	23.9
vitalité	10.3	25.8	5.2	6.9	15.4

Table 3: Objectifs de performance pour le spermogramme selon la table Ricos et al..

Abbreviations : CVw = within-subject biologic variation ; CVg = between-subject biologic variation ; I = desirable specification for imprecision ; B = desirable specification for inaccuracy ; TE = desirable specification for allowable total error.

Cependant, ces objectifs ne sont pas élaborés par niveaux de valeurs et chaque critère de performance a avant tout été interprété par rapport à la pertinence clinique de l'examen.

3. RESULTATS, ANALYSE ET INTERPRETATION

3.1. Maîtrise des risques

La concentration en spermatozoïdes est l'un des sous-processus du processus complexe spermogramme. Les sous-processus partagent des risques communs que nous avons présentés dans un tableau de maîtrise des risques général. Puis, pour chaque sous processus, les spécificités sont explicités dans un tableau de maîtrise dédié.

Tableau général de maîtrise des risques :

5M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maitrise
Matière : Sperme éjaculé	Identité	5	. Formation du personnel	* Identitovigilance (<u>CHU-MO0232</u>) * Formation (<u>CHU-FO1486</u> , <u>CHU-FP0096</u>) et habilitation (<u>CHU-FO1010</u>) du personnel * Accueil du patient (<u>CHU-MO0230</u>) * Procédure en cas de non-conformité (<u>CHUPROC0371</u>)
	Préparation du patient & modalités de recueil	4	. Délai d'abstinence 2 à 7 j : - Si inférieur, risque de perturbation de la numération et du volume (augmentation de 0.4 mL et de 87 millions de spermatozoïdes toutes les 24h [10]) - si >7 j risque d'asthénospermie, nécrospermie . Caractère complet du recueil . Cas particuliers de recueil de sperme (préservatif ; vibromassage ; électrostimulation)	* Formation (<u>CHU-FO1486</u>) et habilitation (<u>CHU-FO1010</u>) * <u>Manuel de prélèvement</u> * Accueil du patient (<u>CHU-MO0230</u>) * Cas particuliers de recueil de sperme (<u>CHU-MO0231</u>) * Traçabilité sur les feuilles de paillasse

5M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
	Délai avant analyse	3	Formation du personnel (si > 1h risque d'asthénospermie, nécrospermie...)	- Formation (CHU-FO1486 , CHU-MO0231) et habilitation (CHU-FO1010) - Délai d'analyse :
	Prétraitement	3	Liquéfaction Homogénéisation	* Fiche poste de travail (CHU-FP0067) * Fiche analyse (CHU-FAN0131) avec traçabilité heures de prélèvement et d'analyse * Feuilles de paillasse
	Interférences	2	Traitements Contexte clinique	Renseignement de la fiche de travail (CHU-MO0261)
Milieu	Conditions de conservation des échantillons	3	Température	Sonde d'ambiance (Ref. CYT BIO-0852)
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs	2		Sonde d'ambiance (Ref. CYT BIO-0852) Fiches fournisseurs
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	2	Hotte PSM Organisation des locaux	Hygiène et prévention des risques (CHUPROC0373) Entretien équipement (CHU-MO0027 , CHU-MO0032) Salle dédiée
Matériel	Réceptacle (flacon, préservatif)	2	Intégrité Type de stérilisation	Procédure achat (CHUPROC0381) Matériel à usage unique

5M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
	Surveillance des dérives	2	Périodicité des maintenances Métrologie des pipettes Maintenance du microscope optique	Maintenance annuelle (<u>CHU-MO0229</u> , <u>CHUPROC0381</u>) Respect des recommandations d'utilisation du fournisseur.
	Gestion des stocks	2	Acceptation à réception des réactifs	Procédure de gestion des stocks (<u>CHU-PROC0381</u>)
Méthode	Existence de la fiche analyse	3	Gestion documentaire	Fiche analyse spermogramme (<u>CHU-FAN0131</u>)
	Causes d'incertitude de mesure	3	Respect du protocole analytique Analyse des faibles numérations	Fiche analyse spermogramme (<u>CHU-FAN0131</u>) Calcul des incertitudes de mesure
Main d'œuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel	3	Formation Habilitation Maintien des compétences Périmètre de responsabilité	- Formation (<u>CHU-FO1486</u> , <u>CHU-MO0231</u>) et habilitation (<u>CHU-FO1010</u>) - Passage régulier à la paillasse de spermologie - Participation aux CIQ et aux EEQ - Fiche poste de travail (<u>CHU-FP0067</u>)

5M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maitrise
	Retranscription des résultats	3	Saisie manuelle et informatique des résultats Validation Edition des compte-rendus	<ul style="list-style-type: none"> - Formation (CHU-FO1486, CHU-MO0231) et habilitation (CHU-FO1010) - Vérification de la retranscription par le biologiste avant validation avec traçabilité sur les feuilles de pailasse - Traçabilité des vérifications des enregistrements informatiques (CHU-PROC0372)
	Exposition accidentelle du personnel	2	Risque d'incidents ou d'accidents liés à la manipulation de produits biologiques ou toxiques	Fiche de sécurité Formation à l'exposition au sang ou produits biologiques.

Tableau de maîtrise des risques spécifique au sous-processus concentration en spermatozoïdes :

5M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maitrise
Matière	Imprécision sur faibles numérations	2	Calcul de la concentration pour les faibles numérations. Imprécision de l'évaluation en cas d'oligospermie / cryptozoospermie.	- Formation (CHU-FO1486 , CHU-FP0096) et habilitation (CHU-FO1010) du personnel - Fiche analyse spermogramme (CHU-FAN0131)
Milieu	Cf. tableau de maîtrise des risques commun du processus complexe.			
Matériel	Cellule Kova	3	Cellule de Kova déjà utilisée	Cellule à usage unique.
Méthode	Dilution du sperme	2	Dilution du sperme non adaptée	- Formation (CHU-FO1486 , CHU-FP0096) et habilitation (CHU-FO1010) du personnel - Fiche analyse spermogramme (CHU-FAN0131)
	Remplissage cellule de Kova	2	Dépôt d'un volume insuffisant dans la cellule	
Main d'œuvre	Cf. tableau de maîtrise des risques commun du processus complexe.			

3.2. Evaluation expérimentale des critères de performance

3.2.1. Evaluation de la fidélité

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

3.2.1.1. Répétabilité

Cette évaluation a pour objet de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement du système analytique.

Pour évaluer la répétabilité de la méthode, nous avons choisi 2 niveaux de concentration en spermatozoïdes : numération faible (niveau 1, < 15 millions de spermatozoïdes/mL) et numération normale (niveau 2, > 15 millions de spermatozoïdes/mL). Pour chaque niveau, la numération a été quantifiée 30 fois dans les mêmes conditions standardisées : même jour, même horaire, même opérateur, même réceptacle (même lot), même lot de lames de Kova..

Les résultats rangés dans un tableau Excell ont permis de calculer les moyennes, ET et CV de répétabilité pour les 30 valeurs et de confronter le CV obtenu au CV acceptable défini précédemment (cf. annexe V).

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) de la table RICOS × 0.75	Conclusion
Niveau 1	30	12.37	0.55	4.41	NA	10	Conforme
Niveau 2	30	134.52	5.1	3.79	NA	10	Conforme

Les CV de la répétabilité sont acceptables par rapport à la référence RICOS ainsi qu'à la pertinence clinique.

Conclusion : La méthode est répétable.

3.2.1.2. Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

Elle consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes afin de prendre en compte toutes les sources de dispersion aléatoire : cellule de Kova, réceptacle, opérateur, température, etc. En effet, ces facteurs peuvent être des données variables, correspondant à une activité normale du Laboratoire. Le délai avant analyse impacte la mesure. C'est pourquoi l'étude de notre reproductibilité n'a pas pu se faire sur une période longue.

Les conditions du test ont été les suivantes : même microscope, même lot de réceptacle, mêmes micropipettes, opérateurs différents. Pour évaluer la reproductibilité de la méthode, nous avons choisi 2 niveaux de concentration (< 15 millions/ml et > 15 millions/ml).

Les résultats rangés dans un tableau Excell ont permis de calculer les moyennes, ET et CV de reproductibilité pour les 5 valeurs (cf. annexe VI).

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) de la table RICOS	Conclusion
1	5	10.8	0.79	7.38	NA	13.4	Conforme
2	5	135.4	7.57	5.59	NA	13.4	Conforme

Les CV de la répétabilité sont acceptables par rapport à la référence Ricos ainsi qu'à la pertinence clinique.

Conclusion : La méthode est reproductible.

3.2.2. Variabilité inter-opérateurs

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées comme c'est le cas pour la concentration en spermatozoïdes.

Evaluation selon le Z-score			Evaluation par chaque opérateur d'une numération basse (<15.10 ⁶ /ml) et haute (>15.10 ⁶ /ml) comparée à la valeur cible EEQ. <u>Critère d'interprétation pour opérateurs</u> : Numération des spermatozoïdes en aveugle. Comparaison à la valeur cible sur le Z-score.
Niveau	Bas	Haut	
Opérateur évalué 1	-0.89	1.35	
Opérateur évalué 2	0.16	0.98	
Opérateur évalué 3	0.37	1.16	
Opérateur évalué 4	-0.66	1.47	

Il n'existe pas de référent en termes d'opérateur pour cette technique manuelle. C'est pourquoi l'utilisation de la valeur de référence d'EEQ nationaux (Biologie prospective, 2015-2A valeur haute / 2016-1A valeur basse) a été choisie comme valeur cible. Les 4 opérateurs prévus satisfont aux critères de concentration des spermatozoïdes.

Conclusion : La variabilité statistique effectuée à l'aide des opérateurs vs EEQ montre une bonne homogénéité des opérateurs concernant les valeurs basses et hautes.

3.2.3. Evaluation de l'exactitude

Elle s'établit à partir des résultats d'EEQ (analysés une seule fois) en comparant la valeur trouvée à la valeur cible attendue (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs), assimilée à la valeur « vraie » (v) de l'échantillon testé. L'écart observé quantifie l'inexactitude.

$$\text{Inexactitude (\%)} = 100 \times \frac{x-v}{v}$$

Avec x = valeur trouvée pour l'EEQ. Ces valeurs permettront un calcul d'une valeur moyenne et de sa dispersion nécessaire pour le calcul d'incertitude.

Niveau	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite	Conclusion
Niveau 1	5.4	6.2	6	12.9	10	NA	Conforme
Niveau 2	30.5	21.1	18	44.5	69.4	NA	Conforme

Conclusion : il n'existe pas de biais référence établi par niveau. Aucun des biais n'a d'impact clinique.

3.2.4. Estimation de l'incertitude de mesure

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

« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée... » ; « ...doit définir les exigences de performances pour l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure, et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure » ; « Le laboratoire doit tenir compte de l'incertitude de mesure lors de l'interprétation des grandeurs mesurées. »

Cette étape comprend à la fois l'étude de risques (consistant à lister les paramètres d'influence et les moyens de maîtrise associés) et l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses. L'incertitude de mesure de la concentration en spermatozoïdes peut être calculée par la méthode Contrôle Interne de Qualité (CIQ)/EEQ d'après le document SH GTA 14. La méthode « CIQ/EEQ » exploite et combine les résultats des contrôles internes de qualité et des données d'évaluations externes de la qualité. Il s'agit d'une approche pragmatique ne nécessitant pas de travaux supplémentaires que les CIQ et EEQ déjà

réalisés. Cette approche présente la difficulté de ne pas prendre en compte les phases pré-analytiques, de ne pas permettre de connaître la contribution de chaque facteur d'influence. De plus, elle nécessite d'avoir un nombre d'essais inter-laboratoires suffisant pour avoir une estimation valable de la composante de justesse et que les données des CIQ et CEQ prennent en compte un maximum de facteurs susceptibles d'intervenir comme composante d'incertitude (lot de réactifs, lot d'étalons, conditions ambiantes, opérateurs, maintenance des instruments, ...).

Exploitation des CIQ :

Elle permet d'évaluer la reproductibilité interne donc de quantifier la composante de fidélité. Il faut idéalement exploiter au moins une trentaine de valeurs par niveau de concentration ($n > 30$) sur une période longue.

Calculer l'écart type des CIQ, donc de la fidélité intermédiaire ($u(\text{CIQ})$), et la moyenne ($m(\text{CIQ})$), des résultats des CIQ.

Exploitation des EEQ :

Permet de quantifier la composante de justesse, c'est-à-dire le biais : différence entre la moyenne des résultats et une valeur de référence pertinente (résultat du groupe de pairs ou de l'ensemble des participants).

Calculer les erreurs de justesse E_i : $E_i = (X_{\text{lab}} - X_{\text{ref}})_i$

$i = 1 \dots n$, n étant le nombre total de EEQ exploitées

X_{lab} : résultat du laboratoire

X_{ref} : valeur assignée de la comparaison

E : écart entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée

Soit n le nombre de comparaisons étudiées, la moyenne de l'écart est :

$$\bar{E} = \frac{\sum (X_{\text{lab}} - X_{\text{ref}})_i}{n}$$

Avec l'écart-type des écarts :

$$\hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n-1}}$$

L'incertitude évaluée à partir des évaluations externes est obtenue à partir de la valeur absolue de l'écart moyen associé de la loi de distribution uniforme (on divise la demi-étendue par racine de 3) et de l'écart-type des écarts précédemment calculé. La formule de calcul est la suivante :

$$u(EEQ) = \sqrt{\left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

On obtient l'incertitude combinée :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

$$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

Avec C : concentration en spermatozoïdes (en millions/mL).

L'incertitude élargie U est obtenue en multipliant u(C) par le coefficient k (k=2).

Les résultats du calcul de l'incertitude sont exprimés de la façon suivante :

C±U (k=2) en millions de spermatozoïdes par mL.

Référence (Ricos)	U = 37.7 %
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : Niveau bas	2.78 ± 0.44 millions Spz / mL
Quantification de l'incertitude (niveau 2) : Niveau haut	27.1 ± 2.48 millions Spz / mL
Interprétation	Conforme

Conclusion : L'évaluation des EEQ n'est disponible que depuis le deuxième semestre 2015 pour la concentration des spermatozoïdes avec seulement 1 valeur par niveau ne nous permettant pas, pour le moment, d'évaluer la justesse liée à la variance. Il n'existe pas de CIQ externalisé pour évaluer cette justesse. Notre incertitude repose donc sur l'évaluation à partir des CIQ. Pour le niveau bas, l'incertitude élargie (k=2) est de 15.9%. Pour le niveau haut, elle est égale à 9.2%.

Bien que l'objectif RICOS ne tienne pas compte de la notion de « niveaux » de valeurs nous sommes donc conformes à une erreur totale de 37.7% sous réserve de l'évaluation de la justesse. Notre analyse des risques et les moyens de maîtrise mis en œuvre permettent également d'éviter d'éventuelles erreurs. Cette incertitude sera réévaluée annuellement et tiendra compte de la justesse dès lors qu'un nombre suffisant d'EEQ sera disponible.

3.2.5. Comparaison de méthode

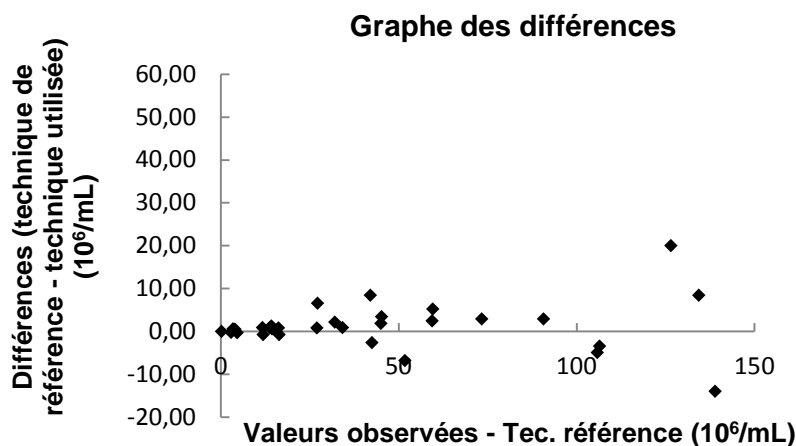
Les essais de corrélation en statistiques, par régression linéaire, sont prévus pour des variables indépendantes. Or, les variables ne sont pas indépendantes lors d'une validation de technique. Cette dépendance explique les valeurs de « r », coefficient de régression, trouvées qui exceptionnellement permettront de mettre en évidence une différence significative.

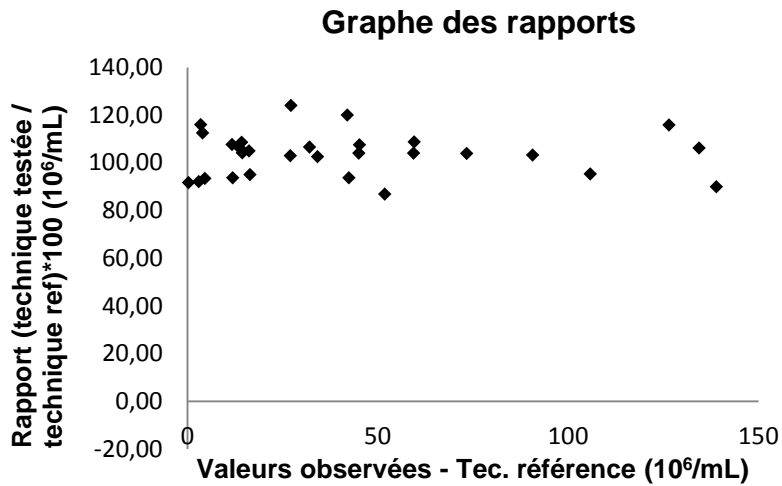
Il faut donc accorder une valeur particulière aux graphiques des différences réalisés après le calcul des différences des couples x_i (méthode A) - y_i (méthode B) en fonction de x_i et celui des rapports y_i/x_i établi en fonction de x_i . Sur ces graphes sont reportées les limites de discordance retenues en valeur absolue ou relative respectivement.

Nous avons comparé la détermination de la concentration en spermatozoïdes par cellule de Kova à une méthode de référence (cellule de Malassez selon Bioforma) sur 30 mesures dans un intervalle de 0.22 à 154 millions de spermatozoïdes /mL couvrant l'étendue de mesure pertinente. L'objectif fixé de concordance des méthodes étaient notamment graphique avec une discordance acceptée par la biologiste responsable de 2 millions maximum sous 20 millions de spermatozoïdes par mL de sperme.

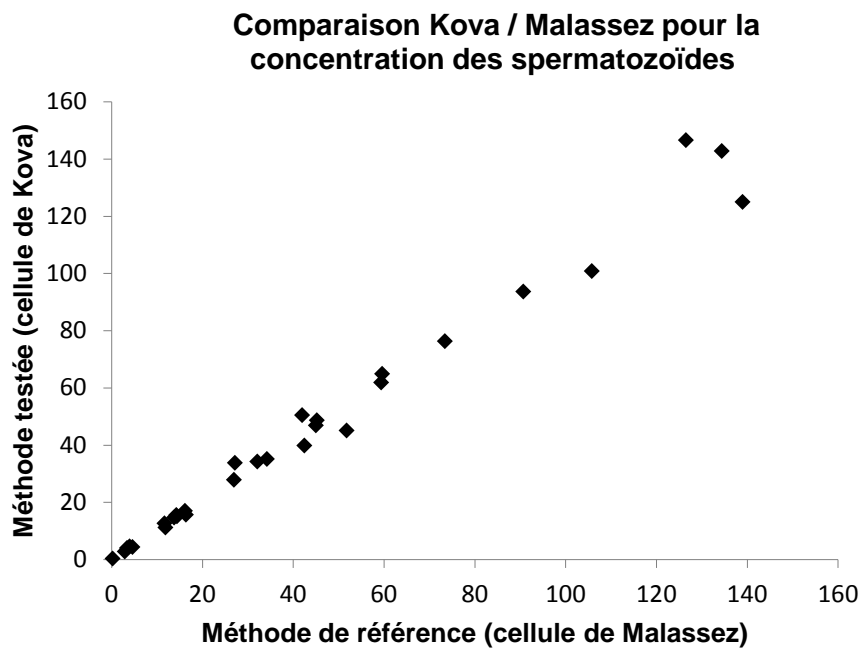
L'exploitation des résultats a été réalisée à 2 niveaux :

- Analyse des résultats individuels par le graphe des différences et le graphe des rapports.





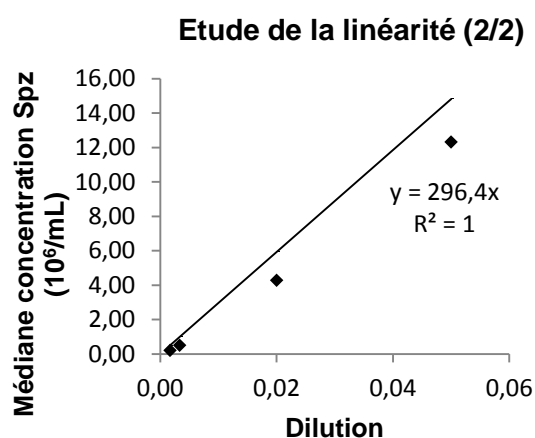
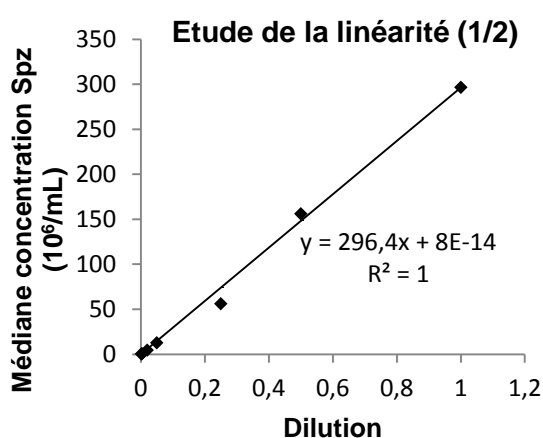
- Analyse des résultats globaux par régression linéaire (droite des moindres rectangles) avec une équation $y = 1.03x - 0.26$



Conclusion : Les graphes des différences et rapports montrent une bonne comparabilité des résultats entre les 2 méthodes. Les écarts les plus importants sont observés pour des valeurs supérieures à 100 millions de spermatozoïdes par mL, ce qui n'a aucun impact clinique pour le patient et pour le couple. Les résultats obtenus entre les deux méthodes sont concordants.

3.2.6. Etendue de mesure

Il s'agit de déterminer l'intervalle de mesure et les limites de linéarité qui définissent l'intervalle de mesure à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fiabilité. Pour obtenir une gamme de différents niveaux de concentration, il est possible d'utiliser des échantillons de concentration très élevée ou à défaut des échantillons de contrôle de concentration élevée, destinés à être dilués avec des échantillons de valeurs basses ou, si cela n'est pas possible, avec le diluant le plus adapté. Il est à noter que chaque dilution doit être indépendante. On ne doit pas utiliser de dilutions « en cascade ». Ceci permet d'éviter tout défaut de justesse qui surviendrait après une erreur dès la première dilution et permet d'obtenir des points répartis également sur toute la gamme de mesure. Chaque point de dilution est à analyser en triple au moins. La médiane de chaque point sert à l'interprétation. Cette vérification permet de rappeler les limites (supérieures et inférieures) au-delà desquelles l'extrapolation des résultats est illicite. Les résultats sont reportés sur un graphique $y_i = f(x_i)$ où y_i représente la médiane des valeurs observées pour chaque dilution et x_i la dilution. L'examen visuel de cette relation permet une appréciation déjà satisfaisante des limites de linéarité de la technique étudiée.



Conclusion : La linéarité dans un intervalle de mesure étendue (0.21 à 296.4 millions de spermatozoïdes par mL) est satisfaisante. La linéarité suffit à l'étude de l'étendue de mesure. La limite de quantification ne présente pas d'intérêt clinique. De plus, selon nos référentiels (WHO 2010 et Bioforma N°42), si l'opérateur retrouve moins de 4 spermatozoïdes par champ, on conclut à une concentration inférieure à 1.10^6 spermatozoïdes/mL. En l'absence de spermatozoïde à l'examen direct, une centrifugation et un étalement du culot sur lame sont réalisés en vue d'un examen au microscope pour confirmation plus sensible.

3.2.7. Autres critères de performance

Le GTA 04 [5] mentionne les critères de performance devant être réalisés dans le cadre d'une validation de méthode quantitative de portée B. Cependant certains de ces critères n'ont pas été jugés adaptés à notre validation de la méthode. Ainsi, pour les études des interférences et de la contamination, il n'existe pas de composé dont la présence est susceptible d'entraîner un résultat inexact (WHO, 2010). Les échantillons sont analysés séparément avec du matériel à usage unique et chaque échantillon est analysé séparément. Pour la robustesse, aucun spermatozoïde n'est mobile après utilisation de la solution de dilution de Marcano[®] qui est conservée dans les conditions fournisseur. Nous assurons une maîtrise des risques qui assure la réalisation de la méthode dans les mêmes conditions. Pour l'intervalle de référence, nous avons jugé suffisant de nous appuyer sur les références bibliographiques à savoir 15 à 200 millions de spermatozoïdes/mL (OMS, 2010). Enfin, la spécificité et la sensibilité sont non adaptés dans le cas d'une méthode quantitative.

4. CONCLUSION

La méthode La détermination de la concentration en spermatozoïdes du sperme éjaculé, méthode quantitative de portée B est validée par la biologiste responsable. Bien que nous ne disposions pas de références bibliographiques pertinentes relatives aux critères de performance, nous avons pu établir un plan expérimental. Celui-ci a permis de conclure que les CV de répétabilité et de reproductibilité sont acceptables, et que les incertitudes sont cliniquement négligeables. Une étude des risques nous a permis d'exposer toutes les erreurs pouvant intervenir et notre façon de les maîtriser. Ce travail a également contribué à former puis habilitier l'ensemble des techniciens, des internes et des biologistes du service à la détermination de la concentration en spermatozoïdes. Ainsi, nous avons établi que la formation se réalise par la lecture des documents qualifiés (fiche formation, fiche analyse), l'observation de 10 analyses de sperme, et l'habilitation par 10 spermogrammes réalisés en double d'un opérateur habilité. Le maintien des compétences de chaque opérateur habilité est assuré par la réalisation régulière de CIQ, par le suivi de la variabilité inter-opérateurs tous les 3 mois et par la réalisation des EEQ. Nos références que sont le manuel de l'OMS de 2010 [6] et le cahier de Bioforma [7] nous ont aussi aidé à rédiger la fiche analyse spermogramme mais ne développent pas suffisamment l'interprétation des résultats selon la pertinence clinique. Il serait intéressant qu'un collègue de spécialiste de l'AMP puisse déterminer des limites acceptables valables par technique. Enfin, ce travail s'inscrit dans la demande d'accréditation du processus spermogramme et nous espérons que les réponses fournies au Cofrac début septembre 2016 seront jugées satisfaisantes.

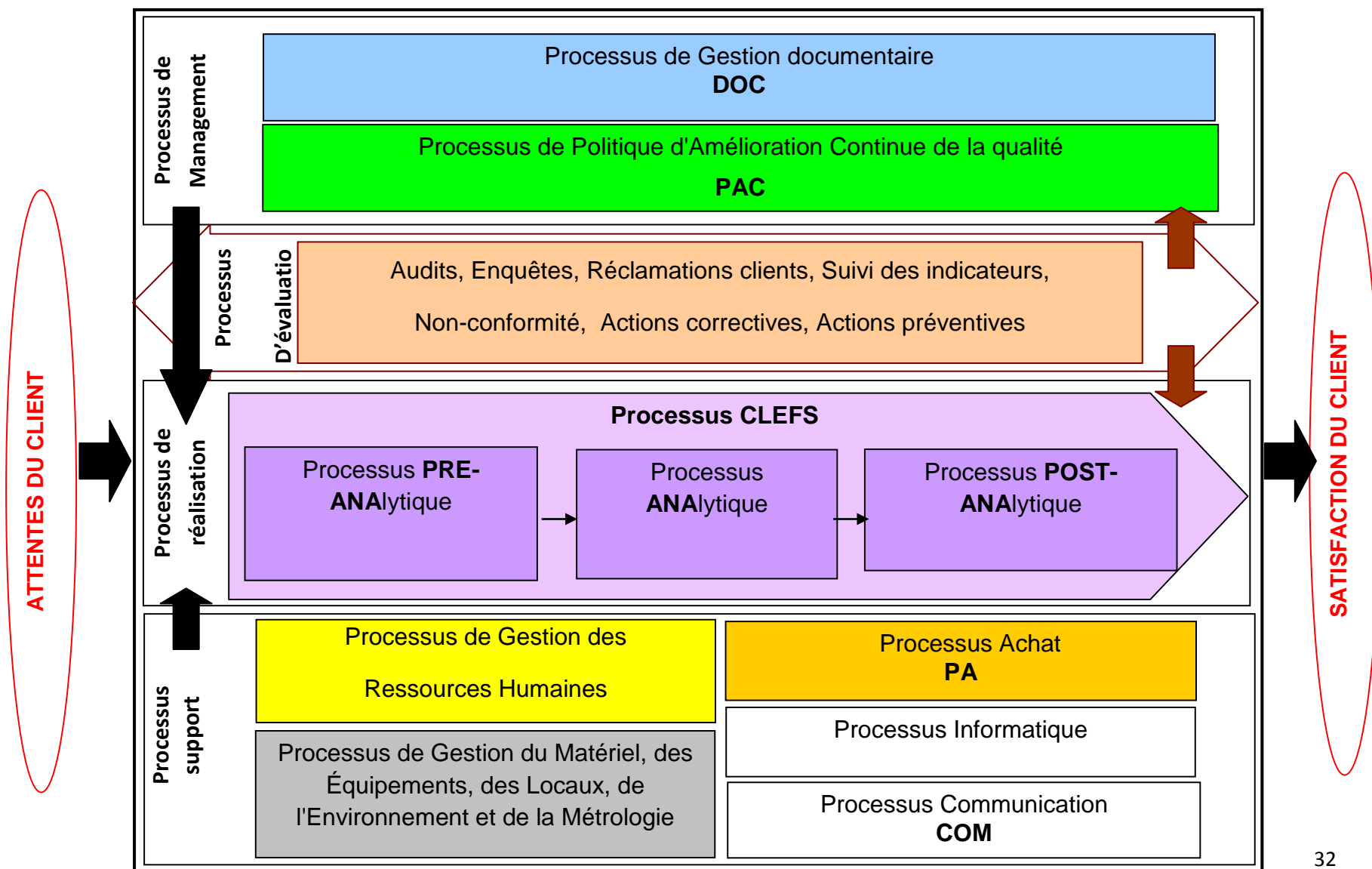
5. BIBLIOGRAPHIE

1. *NF EN ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence.* AFNOR, 2012.
2. *SH INF 50. Portées-types d'accréditation.* COFRAC, 2016.
3. *SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.* COFRAC, 2013.
4. *SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation.* COFRAC, 2010.
5. *SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale.* COFRAC, 2011.
6. World Health Organization WHO. *Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen.* Cambridge University Press, UK. (2010) (5th edition).
7. *Cahier de formation biologie médicale n°42. Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin.* Bioforma, 2009.
8. *SH FORM 43. Fiche Type Quantitatif.* COFRAC, 2011.
9. Zinaman MJ et al.. *Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples.* J Androl. 2000 Jan-Feb ; 21(1):145-53.
10. Guerrin JF et al.. *Apport diagnostique démontré et effets négatifs éventuels des méthodes explorant les facteurs masculins de la fertilité.* Contracept.Fertil.Sex, 1992.

6. ANNEXES

Annexe I : Cartographie des processus	32
Annexe II : Lettre d'engagement Qualité de la direction du Laboratoire	33
Annexe III : Rapport d'évaluation lié à la validation de méthode du spermogramme	34
Annexe IV : Rapport d'expertise du sous-processus « concentration en spermatozoïdes »	35
Annexe V : Données de l'étude de la répétabilité	38
Annexe VI : Données de l'étude de la fidélité intermédiaire	40
Annexe VII : Données de la comparaison de méthode	40
Annexe VIII : Données de l'étude de linéarité	41

Annexe I



Annexe II

3.1 Déclaration de politique qualité et engagement de la direction du laboratoire

La direction du laboratoire du CHU Amiens Picardie et la direction générale s'engagent à mettre en œuvre les moyens humains et matériels nécessaires pour permettre au laboratoire de toujours rendre un service de qualité.

Cette exigence passe par :

- une qualité toujours croissante des prestations du laboratoire avec l'utilisation d'appareils et équipements performants
- la mise en place d'un système de management de la qualité, soutenue par les acteurs, biologistes, techniciens de laboratoire médical et autres collaborateurs qui s'engagent à appliquer des procédures cohérentes et régulièrement révisées.

Afin de se maintenir dans ce processus d'amélioration continue de la qualité, le laboratoire exige et met en œuvre des outils permettant à tout le personnel de se familiariser avec la documentation qualité et d'appliquer les dispositions prises.

De ce fait, la démarche qualité du laboratoire est coordonnée par une responsable assurance qualité (RAQ), suppléée par une RAQ-adjointe.

L'engagement d'amélioration continue et maîtrisée du service rendu par le laboratoire du CHU Amiens Picardie est fondé sur le respect des bonnes pratiques, de l'éthique, et de la confidentialité liés à la profession. Les attentes et problèmes des clients (patients, prescripteurs et correspondants) sont identifiés par l'étude des enquêtes de satisfaction et des réclamations. Cette démarche nous permet d'une part d'essayer de satisfaire au mieux les attentes de nos clients et d'autre part d'optimiser nos méthodes de travail.

Afin de faire reconnaître ses compétences techniques, le chef du pôle "Biologie, Pharmacie et Santé des populations", responsable du laboratoire y compris du site de Doullens, les chefs de pôle "Imagerie" et "Femme, Couple, Enfant", responsables de secteurs du laboratoire en leur pôle et la direction s'engagent à accréditer progressivement les activités du laboratoire selon les référentiels :

- ✓ NF EN ISO 15189 Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence.
- ✓ NF EN ISO/CEI 17025 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- ✓ NF EN ISO 22870 Analyses de biologie délocalisées (ADB) - Exigences concernant la qualité et la compétence.

Cet engagement dans les démarches d'accréditation s'est traduit le 1^{er} avril 2012 par l'obtention, confirmée et étendue, par le secteur d'hygiène du laboratoire, de l'accréditation par le COFRAC, selon la norme NF EN ISO/CEI 17025, concernant les prélèvements et analyses d'eaux pour la recherche et le dénombrement des Légionelles. Cette expérience a ouvert la voie à l'engagement d'autres secteurs dans la démarche d'accréditation obligatoire selon, cette fois, la norme NF EN ISO 15189. La visite d'accréditation initiale a été réalisée en février 2014 pour un nombre restreint d'examen de biologie. L'accréditation a été obtenue au 1^{er} novembre 2014 et le déploiement de la démarche est prévu pour l'ensemble des examens de biologie avant 2019.

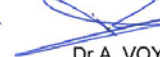
Dans ce cadre, la politique qualité du laboratoire est centrée sur 3 axes :

- Maîtriser le processus analytique (phases pré-analytique, analytique et post-analytique)
- Satisfaire ses clients
- Respecter les échéances réglementaires.

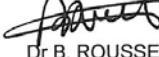
Le laboratoire s'engage à présenter régulièrement aux instances (CME, Direction) un état d'avancement de la démarche notamment au travers de l'évolution de ses indicateurs.

La direction du laboratoire et la direction générale s'engagent pour que les objectifs fixés soient atteints.

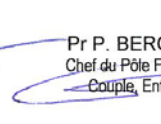

Dr C.C. ADJIDE
Responsable du
Laboratoire d'Hygiène


Dr A. VOYER
Pour les biologistes
RAQ adjointe


Dr V. ADJIDE
Responsable Assurance
Qualité


Dr B. ROUSSEL
Chef du Pôle Biologie Pharmacie
et Santé des Populations


Pr T. YZET
Chef du Pôle Imagerie


Pr P. BERQUIN
Chef du Pôle Femme,
Couple, Enfant


Pr J.P. CANARELLI
Président de CME


Mr T. GIRACCA
Directeur CH Doullens


Mme K. BARRO
Directrice adjointe
Direction Qualité-Risques et Usagers

Annexe III

Rapport d'évaluation : Ecart critique lié à la validation de méthode du spermogramme

FICHE D'ECART N° 64

CRITIQUE

NON CRITIQUE

N° d'accréditation ou de projet : 8-3290

C O F R A C	DOMAINE(S) : Biologie Médicale – Biologie de la reproduction		LIEU(X) DE CONSTAT (si évaluation multi sites) : CBH CHU AMIENS PICARDIE	
	ECART AUX EXIGENCES DE ⁽¹⁾ : NF EN 15189 v2012		PARAGRAPHE(S) DU REFERENTIEL : 5.5.1.4	
	<i>(1) Indiquer au regard de quel référentiel (norme, programme, etc.) porte l'écart</i>			
	CONCERNE : LES DISPOSITIONS <input type="checkbox"/> L'APPLICATION <input checked="" type="checkbox"/>		CONCERNE UNE DEMANDE D'EXTENSION <input checked="" type="checkbox"/>	
	<p>Constat(s) :</p> <p>Les éléments de validation/vérification de méthode du spermogramme demandés en expertise n'ont pu être observés lors de l'évaluation.</p> <p>Conséquence avérée : Performances non évaluées</p> <p>Risque induit : Utilisation d'une méthode non vérifiée/validée</p>			
EVALUATEUR : xxx		DATE : 25/02/2016	SIGNATURE * :	
O E C	ACCORD DE L'ORGANISME		OUI <input type="checkbox"/>	NON <input type="checkbox"/>
	COMMENTAIRES EVENTUELS :			
	REPRESENTANT DE L'ORGANISME :		DATE : 25/02/2016	SIGNATURE * :

O E C	PLAN D' ACTIONS DECIDE		
	ANALYSE DE L'ETENDUE DE L'ECART (antériorité - prestations et clients -...) Cet écart concerne le spermogramme.		
	ANALYSE DES CAUSES ET DE LA NECESSITE DE METTRE EN PLACE DES ACTIONS POUR EVITER LA REPRODUCTION DE L'ECART Des compléments au dossier de validation/vérification de méthodes ont été apportés mais n'étaient pas suffisants.		
	ACTIONS DECIDEES POUR MAITRISER LA SITUATION CONSTATEE Finaliser le travail commencé sur les éléments demandés en expertise.		Délai(s) de mise en œuvre : 25/05/2016
	REPRESENTANT DE L'ORGANISME : COPIN H.	DATE : 07/03/2016	SIGNATURE* : VALIDATION E-MAIL

Annexe IV

SOUS-PROCESSUS 1 :

Les éléments de justifications de portée B ne sont pas suffisants. Les modifications apportées par rapport au manuel de référence (Laboratory Manual for the examination and processing of human semen) ne sont pas indiquées.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Satisfaisant

La référence et le type de réceptacle ne sont pas indiqués.
Les modalités de comptages (simple ou double) ne sont pas indiquées.

MISE EN ŒUVRE

Satisfaisant

Les versions des procédures utilisées ne sont pas indiquées.

MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée, Points critiques à maîtriser, Modalités de maîtrise

Satisfaisant

L'échelle de criticité de certains risques sera appréciée au regard des solutions de maîtrise observée lors de l'évaluation :

Exemples :

Délai d'abstinence - Criticité 2

Recommandations données pour le recueil (perte d'une fraction lors du recueil) - Criticité 2

Renseignements cliniques (Prise de médicaments, ...) – Non indiqué

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Répétabilité, Fidélité intermédiaire, Variabilité inter-opérateurs, Justesse, Exactitude, Sensibilité et spécificité analytique

Non satisfaisant

Le nombre de tests pour la répétabilité (N=10) et la reproductibilité (N=4) apparaissent insuffisants (sous réserve de dispositions spécifiques argumentées dans la procédure de validation de méthode qui sera observée lors de l'évaluation), d'autant que les résultats de CV observés ne reflètent pas les tendances attendues :

. CV répétabilité sont plus élevés dans les zones de concentrations fortes

. CV reproductibilité (opérateurs différents) plus faibles que répétabilité (même opérateur)

INCERTITUDES Niveaux, Choix du mode de calcul, Interprétation
Non satisfaisant
L'incertitude n'est pas estimée malgré la présence de données disponibles.

LIMITE DE QUANTIFICATION, ETENDUE DE MESURE (indispensable en portée B et si pertinente en portée A)
Non satisfaisante
Non réalisée malgré portée B

COMPARAISON DE METHODES (entre analyseurs en miroir, avec ancienne méthode, avec EBMD, ...)
Non satisfaisant
L'intervalle choisi par le laboratoire ne couvre pas le domaine observé pour les patients avec des troubles de la fertilité mais exclusivement la zone de « normalité ».
Le nombre de valeur apparait faible (sous réserve de dispositions spécifiques argumentées dans la procédure de validation de méthode qui sera observée lors de l'évaluation).
Les résultats de la droite de régression montre une pente de 1,15 et une ordonnée à l'origine de 7,2. Le laboratoire statue sur le coefficient de corrélation et non la pente.

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

CONTAMINATION (indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)
Non Satisfaisant
Préciser les éléments de justification

ROBUSTESSE ET STABILITE DES REACTIFS (indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)
Non satisfaisant
Préciser les éléments de justification

INTERVALLE DE REFERENCE (indispensable en portée B)
Non satisfaisant
Préciser les éléments de justification.

DECLARATION D'APTITUDE DE LA METHODE (Fonction du signataire – date d'utilisation)
Satisfaisant

CONCLUSIONS D'EXPERTISE SUR LES DOSSIERS DE VERIFICATION/VALIDATION DE METHODES, ET/OU LES PROCEDURES DE VERIFICATION/VALIDATION DE METHODES, DE GESTION DE LA PORTEE FLEXIBLE ET DE STRATEGIE DE PASSAGE DES CONTROLES

*Document(s) ne satisfaisant pas complètement aux exigences de l'accréditation (à justifier par l'évaluateur). **Les points suivants seront corrigés en vue de l'évaluation sur site :***

- . Evaluation de performances de la méthode (Cf commentaires ci-dessus)
- . Incertitude (Cf commentaires ci-dessus)
- . Limite de quantification, étendue de mesure (Cf commentaires ci-dessus)
- . Comparaison de méthode (Cf commentaires ci-dessus)
- . Contamination (Cf commentaires ci-dessus)
- . Robustesse et stabilité des réactifs (Cf commentaires ci-dessus)
- . Intervalle de référence (Cf commentaires ci-dessus)

INFORMATION AU LABORATOIRE
<p>LE LABORATOIRE DEVRA REpondre AUX REMARQUES PREcISEES CI-DESSUS LORS DE L'EVALUATION SUR SITE POUR SATISFAIRE AUX EXIGENCES D'ACCREDITATION. IL DEVRA, LE CAS ECHEANT, COMPLETER SA DOCUMENTATION (DOSSIERS DE VERIFICATION/VALIDATION DE METHODES CORRESPONDANT AUX EXAMENS DE SA PORTEE D'ACCREDITATION, PROCEDURES DE GESTION DE LA PORTEE FLEXIBLE, DE GESTION DES CONTROLES, D'HABILITATION DES PERSONNELS , ...) EN TENANT COMPTE DE CES REMARQUES. CECI SERA VERIFIE LORS DE L'EVALUATION.</p> <p>LES POINTS NON CORRIGES SONT CONSIDERES COMME UN NON RESPECT DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET FERONT L'OBJET D'ECART LORS DE L'EVALUATION SUR SITE.</p>

Annexe V

Donnée de l'étude de la répétabilité

Echantillon Niveau 1 (< 15.10⁶/ml) : N° travail 160545

Analyse	Facteur Dilution	Nb spz	Nb de carreaux	C1	Nb spz	Nb de carreaux	C2	Moyenne
1	10	118	9	11,8	126	9	12,6	12,2
2	10	135	9	13,5	128	9	12,8	13,2
3	10	139	9	13,9	132	9	13,2	13,6
4	10	137	9	13,7	130	9	13	13,4
5	10	117	9	11,7	126	9	12,6	12,2
6	10	129	9	12,9	121	9	12,1	12,5
7	10	131	9	13,1	122	9	12,2	12,7
8	10	118	9	11,8	128	9	12,8	12,3
9	10	128	9	12,8	118	9	11,8	12,3
10	10	124	9	12,4	121	9	12,1	12,3
11	10	111	9	11,1	122	9	12,2	11,7
12	10	129	9	12,9	128	9	12,8	12,9
13	10	128	9	12,8	118	9	11,8	12,3
14	10	134	9	13,4	124	9	12,4	12,9
15	10	133	9	13,3	127	9	12,7	13,0
16	10	116	9	11,6	115	9	11,5	11,6
17	10	119	9	11,9	121	9	12,1	12,0
18	10	129	9	12,9	123	9	12,3	12,6
19	10	128	9	12,8	132	9	13,2	13,0
20	10	115	9	11,5	110	9	11	11,3
21	10	113	9	11,3	132	9	13,2	12,25
22	10	117	9	11,7	120	9	12	11,85
23	10	124	9	12,4	125	9	12,5	12,45
24	10	130	9	13	122	9	12,2	12,6
25	10	112	9	11,2	117	9	11,7	11,45
26	10	120	9	12	125	9	12,5	12,25
27	10	121	9	12,1	130	9	13	12,55
28	10	114	9	11,4	128	9	12,8	12,1
29	10	111	9	11,1	129	9	12,9	12
30	10	117	9	11,7	125	9	12,5	12,1

La différence acceptable pour une somme des 2 numérations comprise entre 225 et 271 est de 29 à 32 spermatozoïdes d'écart. Cet écart maximal est respecté pour chacune des analyses de l'échantillon.

Echantillon Niveau 2 (> 15.10⁶/ml) : N° travail 160685

Analyse	Facteur Dilution	Nb spz	Nb de carreaux	C1	Nb spz	Nb de carreaux	C2	Moyenne
1	80	118	6	141,6	121	6	145,2	143,4
2	80	112	6	134,4	119	6	142,8	138,6
3	80	104	6	124,8	114	6	136,8	130,8
4	80	107	6	128,4	100	6	120	124,2
5	80	111	6	133,2	112	6	134,4	133,8
6	80	110	6	132	105	6	126	129
7	80	117	6	140,4	109	6	130,8	135,6
8	80	115	6	138	111	6	133,2	135,6
9	80	115	6	138	122	6	146,4	142,2
10	80	109	6	130,8	111	6	133,2	132,1
11	80	113	6	135,6	118	6	141,6	138,6
12	80	108	6	129,6	117	6	140,4	135
13	80	109	6	130,8	119	6	142,8	136,8
14	80	114	6	136,8	108	6	129,6	133,2
15	80	113	6	135,6	103	6	123,6	129,6
16	80	107	6	128,4	111	6	133,2	130,8
17	80	114	6	136,8	118	6	141,6	139,2
18	80	104	6	124,8	109	6	130,8	127,8
19	80	111	6	133,2	115	6	138	135,6
20	80	110	6	132	117	6	140,4	136,2
21	80	111	6	133,2	118	6	141,6	137,4
22	80	121	6	145,2	116	6	139,2	142,2
23	80	102	6	122,4	108	6	129,6	126
24	80	110	6	132	103	6	123,6	127,8
25	80	115	6	138	117	6	140,4	139,2
26	80	117	6	140,4	118	6	141,6	141
27	80	115	6	138	107	6	128,4	133,2
28	80	106	6	127,2	109	6	130,8	129
29	80	117	6	140,4	111	6	133,2	136,8
30	80	111	6	133,2	111	6	133,2	133,2

La différence acceptable pour une somme des 2 numérations comprise entre 207 et 239 est de 28 à 30 spermatozoïdes (WHO, 2010). Cet écart maximal est respecté pour chacune des analyses de l'échantillon.

Annexe VI

Données de l'étude de la fidélité intermédiaire

Echantillon Niveau 1 (< 15.10⁶/ml) : N° travail 160363

Echantillon Niveau 2 (> 15.10⁶/ml) : N° travail 160347

Opérateur (initiales)	DC	EL	PDP	VP	NBM
Echantillon (niveau 1) (10 ⁶ /ml)	10.8	11	10.3	12	9.9
Opérateur (nom-prénom)	DC	EL	PDP	VP	NBM
Echantillon (niveau 2) (10 ⁶ /ml)	143	139	130	125	140

Annexe VII

Données de la comparaison de méthode

Echantillon n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration mesurée par cellule de Kova (10 ⁶ /ml)	64.8	33.75	15.5	50.4	2.7	4	125	146.5	4.5	14.6
Concentration mesurée par cellule de Malassez (10 ⁶ /ml)	59.6	27.2	14.27	42	2.93	3.45	139	126.5	4	13.75
Echantillon n°	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Concentration mesurée par cellule de Kova (10 ⁶ /ml)	39.8	15.6	61.8	27.8	12.6	17	76.3	35.1	93.6	34.2
Concentration mesurée par cellule de Malassez (10 ⁶ /ml)	42.45	16.4	59.4	27	11.7	16.2	73.4	34.2	90.7	32.1
Echantillon n°	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Concentration mesurée par cellule de Kova (10 ⁶ /ml)	46.8	142.8	103	0.22	48.6	45	11.15	4.3	100.8	15
Concentration mesurée par cellule de Malassez (10 ⁶ /ml)	45	134.4	106.5	0.24	45.2	51.8	11.9	4.6	105.8	14.4

Annexe VIII
Données de l'étude de linéarité

Dilution	Valeurs	Médiane	Ecart-type	Moyenne	CV (%)
1:1	308,4	296,4	10,25	297,60	3,45
	296,4				
	288,00				
1:2	141,60	156,00	11,10	153,68	7,22
	163,44				
	156,00				
1:4	54,00	56,03	1,91	55,95	3,42
	56,03				
	57,82				
1:20	12,20	12,33	1,29	13,01	9,93
	14,50				
	12,33				
1:50	4,29	4,29	0,42	4,35	9,73
	3,96				
	4,80				
1:300	0,50	0,502	0,10	0,52	19,15
	0,42				
	0,62				
1:600	0,23	0,21	0,01	0,21	4,34
	0,21				
	0,21				

RESUME

Après une visite d'évaluation initiale en février 2014, l'accréditation selon la norme internationale NF EN ISO 15189 a été obtenue le 1er novembre 2014 pour le Centre de Biologie Humaine (CBH), Laboratoire du centre hospitalo-universitaire d'Amiens. Le Laboratoire a demandé l'extension de son accréditation initiale pour les lignes de portée d'accréditation SP1, pour le spermogramme, et AP3 pour le recueil des complexes cumulo-ovocytaires en ce qui concerne le secteur d'Assistance médicale à la procréation selon le document SH INF 50 du COFRAC. En ce qui concerne le spermogramme, sa validation de méthode consiste en un processus complexe composé de 4 sous-processus (concentration en spermatozoïdes, mobilité des spermatozoïdes, viscosité et volume du sperme).

Interne médecin biologiste en cours de spécialisation en Biologie de la reproduction, je participe à la mise en place de l'assurance qualité dans le secteur de l'Assistance Médicale à la Procréation. J'ai pu assister aux différents audits internes ainsi qu'à la visite du COFRAC qui s'est déroulée entre le 23 et le 25 février 2016. L'objectif de mon travail a été de répondre à l'écart critique concernant la validation de méthode du spermogramme. Ce mémoire présente la validation d'un sous processus de portée B à savoir la concentration des spermatozoïdes dans le sperme éjaculé.

Conformément au document SH GTA 04, nous avons réalisé une maîtrise des risques et déterminé, après étude bibliographique, les critères de performances de la méthode selon leur pertinence clinique : fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) ; variabilité inter-opérateurs ; exactitude ; incertitude de mesure ; comparaison de méthode et étendue de mesure.

Ainsi, il a été conclu que notre méthode est valide pour la mesure de la concentration en spermatozoïdes du sperme éjaculé et apte à être utilisée dans notre Laboratoire. Les preuves dont fait partie le dossier de validation de méthode du spermogramme ont été fournies début septembre au COFRAC et nous espérons obtenir l'extension de l'accréditation initiale escomptée.