

Université Pierre et Marie Curie – Sorbonne Universités

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

**VÉRIFICATION DE METHODE DE LA**  
**CONCENTRATION DES SPERMATOZOÏDES**  
**HUMAINS**

PINTO Rachel

2015-2016

## **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**

Rachel PINTO

Technicienne de laboratoire – Référente Qualité

Laboratoire Bio+

1 Bis Rue Thénard

89100 SENS

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord l'ensemble des intervenants du DU pour la qualité de leur enseignement, et pour nous avoir transmis leurs expériences et connaissances.

Je souhaite également remercier la direction du laboratoire Bio+ qui m'a permis d'accéder à cette formation.

Je remercie enfin mes collègues pour leur aide et leur participation active dans notre démarche qualité.

## SOMMAIRE

Glossaire .....	6
<b>1. Introduction .....</b>	<b>7</b>
1.1 Présentation du laboratoire .....	7
1.2 Démarche qualité .....	7
1.3 Intérêts et objectifs du mémoire .....	8
1.3.1 Exigences normatives .....	8
1.3.2 Application pour le service de spermologie .....	9
1.3.3 Intérêts de l'examen.....	9
1.3.4 Principe de la mesure de la concentration en spermatozoïdes .....	9
1.4 Mise en place de l'étude .....	11
1.5 Limites de l'étude .....	12
<b>2. Matériel et Méthode.....</b>	<b>12</b>
2.1 Matériel et réactifs utilisés.....	12
2.2 Description de la méthode .....	12
2.3 Maîtrise des risques .....	14
2.4 Evaluation des performances de la méthode .....	16
2.4.1 Répétabilité .....	16
2.4.2 Fidélité intermédiaire .....	17
2.4.3 Variabilité inter-opérateur .....	18
2.4.4 Justesse.....	19
2.4.5 Exactitude .....	19
2.4.6 Incertitudes .....	20
2.4.7 Etendue de mesure .....	20
2.4.8 Comparaison de méthode .....	21
2.4.9 Contamination.....	21
2.4.10 Intervalle de référence .....	22
<b>3. Conclusion .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Références .....</b>	<b>24</b>
<b>5. Annexes .....</b>	<b>25</b>

## GLOSSAIRE

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillances, de leurs Effets et de leur Criticité

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

CIQ : Contrôle Interne de la Qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CV : Coefficient de Variation

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PSM : Poste de Sécurité microbiologique

SFBC : Société Française de Biologie Clinique

SMQ : Système de Management de la Qualité

WHO : World Health Organization

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 PRESENTATION DU LABORATOIRE

Le laboratoire BIO+ apparaît en 2008 et résulte de la réunion de 4 laboratoires de Sens et Montereau :

- Site Thénard - Biologie du sperme, AMP, Pré/Post Analytique
- Site Garibaldi - Plateau technique de « première intention »
- Site Faïencerie - Pré/Post Analytique
- Site Surville - Pré/Post Analytique

La société emploie une cinquantaine de collaborateurs, travaille pour des cliniques et pour l'industrie.

Le laboratoire offre un service d'urgence 24h/24 et 7 jours/7.

BIO+ appartient au groupement MEDIBIOLAB comprenant 4 sociétés : MEDIBIO, BIO+, MEDI+ et MEDICABIO.

Ce groupement est constitué de deux plateaux techniques de « seconde intention » dont les fonctions sont les suivantes :

- Réaliser les analyses
- Centraliser et réaliser le tri des échantillons envoyés par les sites pré/post analytiques qui lui sont rattachés
- Préparer les échantillons nécessaires à la réalisation des analyses spécialisées que le groupement transfère au LBM BPR

Il comporte également quatre plateaux techniques de « première intention » dont les fonctions sont les suivantes :

- Réaliser les analyses
- Préparer les échantillons nécessaires à la réalisation des analyses spécialisées que le groupement transfère au LBM BPR

## 1.2 DEMARCHE QUALITE

- Le site Garibaldi de la société BIO+ est accrédité COFRAC depuis 2011. Aujourd'hui, la totalité du plateau technique est accrédité (Hématologie, Hémostase, Immunohématologie, Biochimie et Immunochimie).

Les phases pré et post analytiques du LBM BIO+ sont accréditées par le COFRAC depuis le 1<sup>er</sup> juillet 2011 selon la norme NF EN ISO 15189.

- Le système de management de la qualité (SMQ) mis en place au sein du laboratoire concerne l'ensemble de ses unités fonctionnelles. L'organisation du système qualité est définie dans le manuel qualité du laboratoire.
- Conformément à la Norme EN ISO 15189 [1], le LBM BIO+ met en place une approche processus de son système de management de la qualité (Cf Annexe I).
- La politique qualité du LBM BIO+ a toujours été la satisfaction de ses patients, des prescripteurs et des administrations avec lesquelles il collabore, par la transmission de résultats d'analyses fiables dans les délais les plus brefs compatibles avec les techniques mises en œuvre.

Cette politique qualité est signée par les directeurs de BIO+ puis est affichée sur les 4 sites de façon accessible pour l'ensemble du personnel et à la demande des clients.

- Le système documentaire est géré via le logiciel KALILAB. Il est régulièrement mis à jour.
- Chaque société du groupement MEDIBIOLAB comporte actuellement son propre système de management de la qualité.

Depuis mai 2016, un groupe de personnes (Biologistes et Techniciens responsables de la qualité) est nommé afin d'harmoniser les différents SMQ de chaque société dans le but d'en obtenir un unique et harmonieux.

## 1.3 INTERETS ET OBJECTIFS DU MEMOIRE

### 1.3.1 Exigences normatives

Le laboratoire étant accrédité selon la NF EN ISO 15189, se doit de répondre à des obligations concernant la vérification et la validation des procédures analytiques :

- § 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. »
- § 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.

Afin de répondre à ces exigences, le COFRAC met à disposition le SH GTA 04 [2] « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale » qui propose différents moyens pour répondre aux critères de validation.

### **1.3.2 Application pour le service de spermiologie**

Le service de spermiologie est le seul service au sein du LBM Bio+ à ne pas être accrédité. Il a donc pour objectif d'entrer dans la démarche d'accréditation.

Deux dossiers ont déjà été envoyés dans la famille suivante, selon le SH-INF-50 [3] :

- Biologie de la Reproduction, spermiologie diagnostique (SPERMIOBM) : vitalité et mobilité des spermatozoïdes humains.

A ce jour, ces paramètres ne sont toujours pas évalués par le COFRAC.

La concentration des spermatozoïdes humains correspond à la même famille.

La méthode utilisée par le laboratoire s'inscrit dans une portée A de type quantitatif. Elle correspond à ce qui est inscrit dans le manuel de l'OMS [4].

Le sujet du mémoire est donc consacré à la vérification de méthode pour la détermination de la concentration des spermatozoïdes humains afin de satisfaire aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 [1].

### **1.3.3 Intérêts de l'examen**

Le spermogramme est l'un des examens réalisés lors de l'exploration de l'infertilité masculine. Il fait partie des premiers examens pratiqués dans le bilan de stérilité d'un couple. Il permet d'orienter un couple, si cela est nécessaire, dans un parcours d'AMP.

Le spermogramme est composé de plusieurs tests : volume, pH, viscosité, numération, concentration, mobilité et morphologie des spermatozoïdes (spermocytogramme).

### **1.3.4 Principe de la mesure de la concentration en spermatozoïdes**

Avant tout recueil, le laboratoire doit s'assurer que le patient ait bien respecté un délai d'abstinence sexuelle compris entre deux et sept jours (délai préconisé par l'OMS [4]). Le recueil est obtenu par masturbation.

Après recueil, le prélèvement est laissé au repos le temps de la liquéfaction. Après homogénéisation du prélèvement, une dilution de l'échantillon est effectuée.

La détermination de la concentration en spermatozoïdes est une méthode manuelle. Nous utilisons une lame KOVA® Glasstic Slide 10 comme chambre de comptage. Celle-ci correspond aux chambres recommandées par le manuel de l'OMS [4].

Pour chaque numération, l'OMS recommande de réaliser deux fois la même dilution en prélevant le sperme à différents endroits dans le réceptacle. Une fois les deux concentrations déterminées, il faut vérifier si la différence entre les deux comptes est acceptable. Pour faire cette vérification, nous utilisons 2 tables différentes. La principale est celle présente dans le manuel de l'OMS [4] (Table 1). Pour cette table, il n'est pas possible de vérifier la différence si la somme des comptes est inférieure à 35 millions de spermatozoïdes/ml. Si la somme est inférieure à 35, nous utilisons la table présente dans un autre référentiel [5] (Table 2).

Si la différence est acceptable, c'est la moyenne des deux comptes qui est rendue comme résultat. Dans le cas contraire, nous recommençons l'opération jusqu'à l'obtention de 2 comptes avec différence acceptable.

Le calcul s'effectue selon la formule : Numération (spz / ml) =  $N \times 10^4 \times F$

N = nombre de spermatozoïdes dans 1 carré de 16 petits carrés.

**Table A7.1** Acceptable differences between two replicate counts for a given sum

Sum	Difference*	Sum	Difference*	Sum	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 rounded 95% confidence interval.

F = facteur de dilution.

Table 1 : Différences acceptables entre deux numérations de spermatozoïdes pour une somme donnée (WHO) [4].

**Table A7.3**

SUM	LIMIT	SUM	LIMIT
969-1000	61	376-395	38
938-968	60	357-375	37
907-937	59	338-356	36
876-906	58	319-337	35
846-875	57	301-318	34
817-845	56	284-300	33
788-816	55	267-283	32
760-787	54	251-266	31
732-759	53	235-250	30
704-731	52	219-234	29
678-703	51	206-218	28
651-677	50	190-205	27
625-650	49	176-189	26
600-624	48	163-175	25
576-599	47	150-162	24
551-575	46	138-149	23
528-550	45	126-137	22
504-527	44	115-125	21
482-503	43	105-114	20
460-481	42	94-104	19
438-459	41	85-93	18
417-437	40	76-84	17
396-416	39	67-75	16
		59-66	15
		52-58	14
		44-51	13
		38-43	12
		32-37	11
		27-31	10
		22-26	9
		17-21	8
		13-16	7
		10-12	6
		7-9	5
		5-6	4
		3-4	3
		2	2
		1	1
		0	0

Table 2 : Différences acceptables entre 2 comptes de répliques pour une somme donnée

#### 1.4 MISE EN PLACE DE L'ETUDE

La réalisation du dossier de vérification de méthode s'est organisée de la façon suivante :

- Prise en compte de la bibliographie existante :
  - WHO, 5<sup>ème</sup> édition [4]
  - Cahier de formation n°42 BIOFORMA exploration de la fonction de la reproduction versant masculin [6].
- Rédaction et mise à jour des documents : prise en compte du double comptage puis de la différence acceptable que nous ne faisons pas auparavant.
- Référencement du matériel et des réactifs utilisés
- Réalisation des essais de vérification
- Exploitation des résultats

- Rédaction du rapport de vérification de méthode

## 1.5 LIMITES DE L'ETUDE

Les principales difficultés rencontrées lors de cette étude ont été :

- Difficulté d'obtenir l'échantillon. Il s'agit d'un échantillon « précieux ».
- Durée de conservation des échantillons très courte.
- Trois à quatre recueils de sperme par semaine donc étude assez longue pour avoir le nombre de résultats adéquat.

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2.1 MATERIEL ET REACTIFS UTILISES

Une dilution est effectuée afin de déterminer la concentration en spermatozoïdes. Cette manipulation est effectuée sous hotte, comme l'ensemble des autres paramètres du spermogramme.

Nous avons ensuite besoin de ce matériel :

- Réceptacle type Recisperme®
- Pipettes graduées
- Pointes
- Lame KOVA® Glasstic Slide 10 Hycor ame Kova Slide
- Microscope
- Eau formolée

### 2.2 DESCRIPTION DE LA METHODE

Examen de Biologie Médicale
Concentration des spermatozoïdes humains

La méthode utilisée au laboratoire est la méthode décrite dans le référentiel [4]. La validation de la méthode consistera donc à une vérification de méthode en portée A.

PROCESSUS SIMPLE
Portée A

**Sous-domaine** : Biologie de la Reproduction  
**Sous-famille** : Spermologie diagnostique (SPERMIOBM)

ELEMENTS A VERIFIER	VERIFICATION
Répétabilité	OUI
Fidélité intermédiaire	OUI
Variabilité Inter-opérateurs	OUI
Justesse	NON
Exactitude	OUI
Sensibilité et spécificité analytique	NON
Incertitudes	NON
Etendue de mesure	OUI
Comparaison de méthodes	NON
Interférences	NON
Contamination	OUI
Robustesse et fiabilité des réactifs	NON
Intervalle de référence	OUI

Description de la méthode
<b>Analyte/Mesurande</b> : Spermatozoïdes
<b>Principe de la mesure</b> : Méthode manuelle de type quantitatif portée A par étude de la concentration des spermatozoïdes
<b>Type d'échantillon primaire</b> : Sperme frais
<b>Type de récipient</b> : Récipient de recueil de sperme, stérile, en plastique non toxique
<b>Prétraitement de l'échantillon</b> : dilution
<b>Unités</b> : millions de spermatozoïdes / ml
<b>Critères d'interprétation</b> : $< 15 \times 10^6$ spermatozoïdes / ml ou $< 39 \times 10^6$ spermatozoïdes / éjaculat → Oligospermie $> 100 \times 10^6$ spermatozoïdes / ml → Polyzoospermie 0 spermatozoïdes / ml → Azoospermie
<b>Marquage CE</b> : Oui
<b>Codage CNQ</b> : Non codé par l'ANSM
<b>Equipement</b> : Méthode manuelle, pas d'automate

<b>Référence du réactif</b> : Formol ref: O50593 COOPER
<b>Matériau d'étalonnage (références)/ raccordement métrologique</b> : Aucun
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs</b> : Aucun

### 2.3 MAITRISE DES RISQUES

Une analyse des risques est faite afin de mettre en évidence les points critiques de la méthode devant être maîtrisés afin d'assurer la qualité des résultats.

Celle-ci est faite selon la méthode des 5M ou méthode d'Ishikawa. Les différentes causes d'un problème sont classées en 5 grandes familles : les **5M**

- Matière : matières premières, consommables utilisés...
- Milieu : lieu de travail, conservation des échantillons et réactifs...
- Matériel : équipements
- Méthode : procédures
- Main d'œuvre : ressources humaines, qualification du personnel

Cette méthode des 5M nous permet ensuite de remplir un formulaire de type AMDEC. Celui-ci nous permet de recenser les défaillances potentielles, d'en rechercher les causes puis d'en évaluer la criticité.

MAITRISE DES RISQUES				
5M	Points critiques	Echelle de criticité	Eléments à maîtriser	Modalités de maîtrise
<b>Matière</b> (échantillon)	Identitovigilance	C	Formation du personnel Identification du récipient et contrôle d'identité	IT-MU4-001-04 « Manuel de prélèvement » PG-MU0-033-03 « Identito-Vigilance »
	Accueil Préparation du patient	B	Formation du personnel Information des patients Préconisations de prélèvements	IT-MU4-001-04 « Manuel de prélèvement » IT-B16-040-01 « Fiche de modalité de recueil du sperme » DE-B16-027-07 « Préconisations patients pour le recueil de sperme »
	Contrôle de qualité de l'échantillon Type de contenant, nature et volume de l'échantillon	A	Modalités de recueil Choix des récipients Contrôle de l'échantillon à réception	IT-MU4-001-04 « Manuel de prélèvement » DE-B16-027-01 « Préconisations patients pour le recueil de sperme » Utilisation de réceptacles conformes marquage CE directive 98/79/CE
	Conservation des échantillons	B	Gestion logistique (transport), conservation avant analyse	MT-B16-001-06 « Spermogramme – Spermocytogramme »

<b>Milieu</b>	Condition de conservation des échantillons	B	Formation du personnel Maîtrise de la conservation de l'échantillon Suivi des enceintes thermostatées et des conditions ambiantes Sondes reliées au logiciel VIGITEMP	MT-B16-001-06 « Spermogramme – Spermocytogramme » PG-MU0-013-06 « Surveillance des conditions ambiantes IT-MU0-002-03 « Technique de remplacement en cas de panne du système de surveillance VIGITEMP » PG-MU0-015-06 « Suivi métrologique des équipements Cartographie tous les 5 ans des enceintes thermostatées par un prestataire accrédité
	Conditions de conservation et d'utilisation es réactifs	B	Formation du personnel Diffusion des fiches techniques fournisseur	PG-MU0-021-04 « Gestion du matériel, des réactifs et des consommables »
<b>Matériel (équipement)</b>	Matériel opérationnel  Vérification initiale des performances et surveillance de leur maintien  Contamination	B	Vérification/validation des méthodes  Maintenance du matériel  Politique de suivi des CIQ et des EEQ  Métrologie des équipements	PG-MU0-007-06 « Vérification-Validation des méthodes » PG-MU0-014-06 « Maintenance des équipements » PG-MU0-035-07 « Contrôles internes de la qualité » PG-MU0-036-06 « Evaluation externe de la qualité » PG-MU0-015-06 « Suivi métrologique des équipements » IT-MU0-002-03 « technique de remplacement en cas de panne du système de surveillance VIGITEMP »
<b>Matériel (réactifs)</b>	Réactifs, consommables  Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks	B	Approbation du fournisseur  Gestion des stocks  Gestion des commandes	PG-MU1-001-06 « Evaluation et sélection des fournisseurs » PG-MU0-009-06 « Achats » PG-MU0-016-07 « Gestion des stocks » PG-MU0-021-04 « Gestion du matériel, des réactifs et des consommables » PG-MU0-010-06 « Contrôles à réception »
<b>Méthode</b>	Limites de la méthode	A	Suivi des performances de la méthode	PG-MU0-007-06 « Vérification-Validation des méthodes » PG-MU0-036-06 « Evaluation Externe de la Qualité »
	Causes d'incertitudes de mesure	A	Formation du personnel  Lecture manuelle	PG-MU0-039-07 « Formation » PG-MU0-036-06 « Qualification – Habilitation » MT-B16-001-06 « Spermogramme –

				Spermocytogramme »
<b>Main d'œuvre</b>	Compétences et maintien de compétences du personnel	B	Formation / Habilitation du personnel Plan de formation  Validation Biologique / Interprétation  Double saisie	PG-MU0-039-07 « Formation PG-MU0-036-06 « Qualification – Habilitation » PG-MU0-086-02 « Validation Biologique » IT-MU0-011-07 « Gestion du SIL Histone en technique » DE-B16-013-03 « Fiche d'interprétation des spermogrammes »

## 2.4 EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Selon le SH GTA 04, le laboratoire doit établir les critères de performance de sa méthode. Il les compare aux données de référence dont il dispose et conclut quant à l'acceptabilité de sa méthode en fonction de ses besoins vis-à-vis du critère testé.

Nous avons donc réalisé différents essais afin de pouvoir évaluer le plus grand nombre de critères possible.

### 2.4.1 Répétabilité

#### ❖ Définition

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactifs) pour l'analyte concerné.

Il est recommandé que ce calcul soit effectué pour chaque analyte à mesurer et à plusieurs niveaux de concentration [2].

#### ❖ Résultats

La répétabilité de la méthode est évaluée sur 2 échantillons ayant 2 niveaux différents : une valeur basse et une valeur haute. Cf annexe II

Le CV de référence est calculé à partir du RICOS [7].

Selon la SFBC, le CV limite de répétabilité est calculé à partir de la valeur du CV limite donné pour l'évaluation de la reproductibilité, en appliquant la formule :

reproductibilité = répétabilité x 1.33 soit répétabilité = reproductibilité/1.33, CV  
répétabilité = CV reproductibilité x 0.75 [8].

REPETABILITE :						
		Applicable: O		Non applicable (justifier):		N
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV(%) de référence	Conclusion
					RICOS	
TH194067	30	19,893	1,156	5,81%	10,08%	CONFORME
TH204079	30	120,027	3,579	2,98%	10,08%	CONFORME

❖ Conclusion :

CV répétabilité conformes aux CV niveau "acceptable" du RICOS (fait sur 30 lectures de suite par le même opérateur). Conforme aux exigences du laboratoire. Apte à l'utilisation prévue.

#### 2.4.2 Fidélité intermédiaire

❖ Définition :

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... Il permet de paramétrer les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aides à la décision [2].

❖ Résultats :

FIDELITE INTERMEDIAIRE :						
		Applicable: O		Non applicable (justifier):		N
Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>2</sup>	Ecart-type	CV (%)	CV(%) limite	Conclusion
					RICOS	

TH194067	30	19,523	1,374	7,04%	13,40%	CONFORME
TH204079	30	120,377	2,681	2,23%	13,40%	CONFORME

La fidélité intermédiaire de la méthode est évaluée sur 2 échantillons ayant 2 niveaux différents : une valeur basse et une valeur haute et par des opérateurs différents pour chaque échantillon. Cf annexe III

❖ Conclusion:

CV fidélité intermédiaire conformes aux CV niveau "acceptable" du RICOS (fait sur 30 lectures par 3 opérateurs). Conforme aux exigences du laboratoire. Apte à l'utilisation prévue.

### 2.4.3 Variabilité inter-opérateur

❖ Définition :

La variabilité inter-opérateur constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur la vérification de la compétence des opérateurs (habilitation) [2].

❖ Résultats :

Comparaison sur 20 comptes de la concentration par 4 opérateurs habilités. Il s'agit de 20 patients différents et d'une lecture en aveugle par les 4 opérateurs.

Pour déterminer les différences acceptables, nous avons pris la somme des 2 valeurs les plus faibles afin d'obtenir la plus petite différence possible. Nous avons ensuite pris la différence des 2 valeurs les plus éloignées. Cf annexe IV

<b>VARIABILITE INTER-OPERATEURS :</b>	
Applicable: O      Non applicable: N	
<b>Opérateur évalué 1:</b> <b>COUTAREL Céline</b>	Comparaison sur 20 comptes de la concentration par 4 opérateurs habilités. Il s'agit de 20 patients différents et d'une lecture en aveugle par les 4 opérateurs. Les 20 résultats ont des différences acceptables en prenant pour référence les critères faisant référence en spermologie (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th edition - 2010).
<b>Opérateur évalué 2:</b> <b>PINTO Rachel</b>	
<b>Opérateur évalué 3:</b> <b>DELAUNAY Emmanuelle</b>	
<b>Opérateur évalué 4:</b> <b>DEHENRY Jacques</b>	

❖ Conclusion :

Absence de variabilité inter-opérateur significative. Résultats conformes aux exigences de l'OMS 2010 et à celles du laboratoire. Apte à l'utilisation prévue.

#### 2.4.4 Justesse

❖ Définition :

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).

Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilées à la « valeur vraie ». L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplé à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ) [2].

❖ Conclusion :

Pour notre cas, l'évaluation de la justesse n'est pas effectuée car les CIQ ne sont pas encore en place au laboratoire. Il n'existe pas de programme de CIQ externalisé.

#### 2.4.5 Exactitude

❖ Définition :

L'exactitude est définie comme l'écart de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. L'exactitude devrait être vérifiée à partir d'étalons primaires, de matériaux de références certifiés ou de méthodes de références traçables au SI ou à des étalons internationaux. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité [2].

❖ Résultats :

Exactitude estimée à l'aide des derniers EEQ réalisés par le laboratoire. Celles-ci sont réalisées chez Biologie prospective. Cf annexe V

<b>EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels: EEQ/CQN) :</b>							
<b>Contrôles quantitatifs: O</b>				<b>Contrôles qualitatifs: N</b>			
Echantillons	Valeurs labo <sup>4</sup>	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%)/ groupe de pairs	Biais (%)/ moyenne générale	Biais limite (%)	Conclusion
						RICOS	

NUM.SPZ.2017-1A	61,000	70,000	67,000	-12,86%	-8,96%	15,60%	CONFORME
NUM.SPZ.2016-2A	38,200	44,000	39,000	-13,18%	-2,05%	15,60%	CONFORME
NUM.SPZ.2016-1A	11,960	14,100	13,400	-15,18%	-10,75%	15,60%	CONFORME

❖ Conclusion :

Biais/moyenne générales conformes aux biais limite du RICOS. Conforme aux exigences du laboratoire. Apte à l'utilisation prévue.

## 2.4.6 Incertitudes

❖ Définition :

La norme NF EN ISO 15189 précise que « 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 ». De plus, les composantes d'incertitude de la phase analytique pour chaque mesurande doivent être établis. Un calcul d'incertitude doit en outre être déterminé pour les paramètres quantitatifs [2].

❖ Résultats :

Le laboratoire utilise la méthode décrite dans le SH GTA 14 [2] : méthode « CIQ/EEQ ».

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

$u(C)$  : Incertitude

$u^2(\text{CIQ})$  : variance (carré de l'écart type) de l'ensemble des résultats du CIQ

$u^2(\text{EEQ})$  : variance liée à la justesse (bias)

Les CIQ ne sont pour l'instant pas en place au laboratoire. Il n'existe pas de CIQ fournisseur. Je ne peux donc pas évaluer les incertitudes de mesure pour le moment.

## 2.4.7 Etendue de mesure

❖ Définition :

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité [2]

❖ Résultat :

Il n'est pas retrouvé dans le manuel de l'OMS [4] de valeur exacte indiquant la limite de détection. Lorsqu'un échantillon à une très faible concentration en spermatozoïdes, l'ensemble de l'éjaculat est centrifugé. Le culot est ensuite lu. Nous pouvons considérer que la limite de détection est d'un spermatozoïde visible sur l'ensemble du culot de centrifugation.

Lors de ce cas de figure, le risque d'erreur de la quantification est important. C'est pour cela que l'OMS recommande de rendre une concentration  $< 56\ 000$  spermatozoïdes / ml ce qui correspond à la limite de quantification.

Il n'est pas retrouvé dans le manuel de l'OMS une valeur correspondant à la limite supérieure de linéarité.

#### 2.4.8 Comparaison de méthode

❖ Définition :

Il s'agit de comparer les résultats provenant de deux méthodes différentes.

❖ Résultat :

La technique utilisée est une technique manuelle. Il n'y a donc pas d'automate et une seule méthode est utilisée au laboratoire. La comparaison de méthode n'est donc pas justifiée dans ce cas.

#### 2.4.9 Contamination

❖ Définition :

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors des manipulations. On peut identifier les contamination inter échantillon et la contamination inter-réactif [2].

❖ Résultat :

Il ne peut y avoir de contamination inter-réactif lors de notre manipulation. Pour cette technique, un seul réactif est utilisé et le matériel est à usage unique (cône de pipetage, tube de dilution).

Le risque de contamination inter-échantillon est très faible puis chaque sperme est traité de manière isolée. Le matériel est à usage unique hormis les cellules de comptage Kova Slide. Pour maîtriser le risque concernant la cellule de comptage, nous rayons le compartiment utilisé au marqueur. De ce fait, une lecture au microscope n'est plus possible ensuite.

#### 2.4.10 Intervalle de référence

❖ Définition :

Le laboratoire se doit de définir les intervalles de références biologique ou les valeurs de décision clinique, documenter la base des intervalles de référence ou valeurs de décision et communiquer ces informations aux utilisateurs [1].

❖ Résultat :

Le laboratoire utilise l'intervalle de référence définie par le référentiel [4].

Selon l'OMS, la limite de référence inférieure pour la concentration de sperme est de 15 millions de spermatozoïdes/ml. La limite de référence inférieure pour le nombre total de spermatozoïdes est de 39 millions de spermatozoïdes par éjaculat.

### 3. CONCLUSION

Tout le travail effectué sur ce dossier de vérification de méthode m'a permis de mettre en pratique ce qui m'a été enseigné lors de cette année de formation.

Grâce à ce travail, nous avons pu créer et modifier nos documents afin qu'ils répondent correctement aux exigences de la norme [1] ainsi que de nos référentiels qui sont le manuel de l'OMS [4] et le cahier de Bioforma [6]. Notre manière de compter en a donc été modifiée. Nous avons instauré le double comptage ainsi que la vérification de la différence acceptable. Lors d'un audit blanc, nous avons pu faire ressortir l'absence de CIQ. Malheureusement, par faute de temps, la mise en place de ceux-ci n'a pu être réalisée. Il s'agira de notre prochain travail sur ce dossier. Il est urgent qu'ils soient mis en place afin de pouvoir proposer un dossier complet au COFRAC.

Le reste de la méthode est validée par le biologiste responsable. L'ensemble des critères de performance évalués sont conformes aux exigences du laboratoire.

La réalisation de la fidélité intermédiaire, de la variabilité inter-opérateurs puis des EEQ, nous a permis d'assurer le maintien des compétences des biologistes et techniciens habilités au poste. Nous ajouterons à ces critères la réalisation des CIQ une fois ceux-ci mis en place. Cette étude nous a également permis de mettre en place un planning d'audits internes réalisés par un biologiste d'un autre site du groupement.

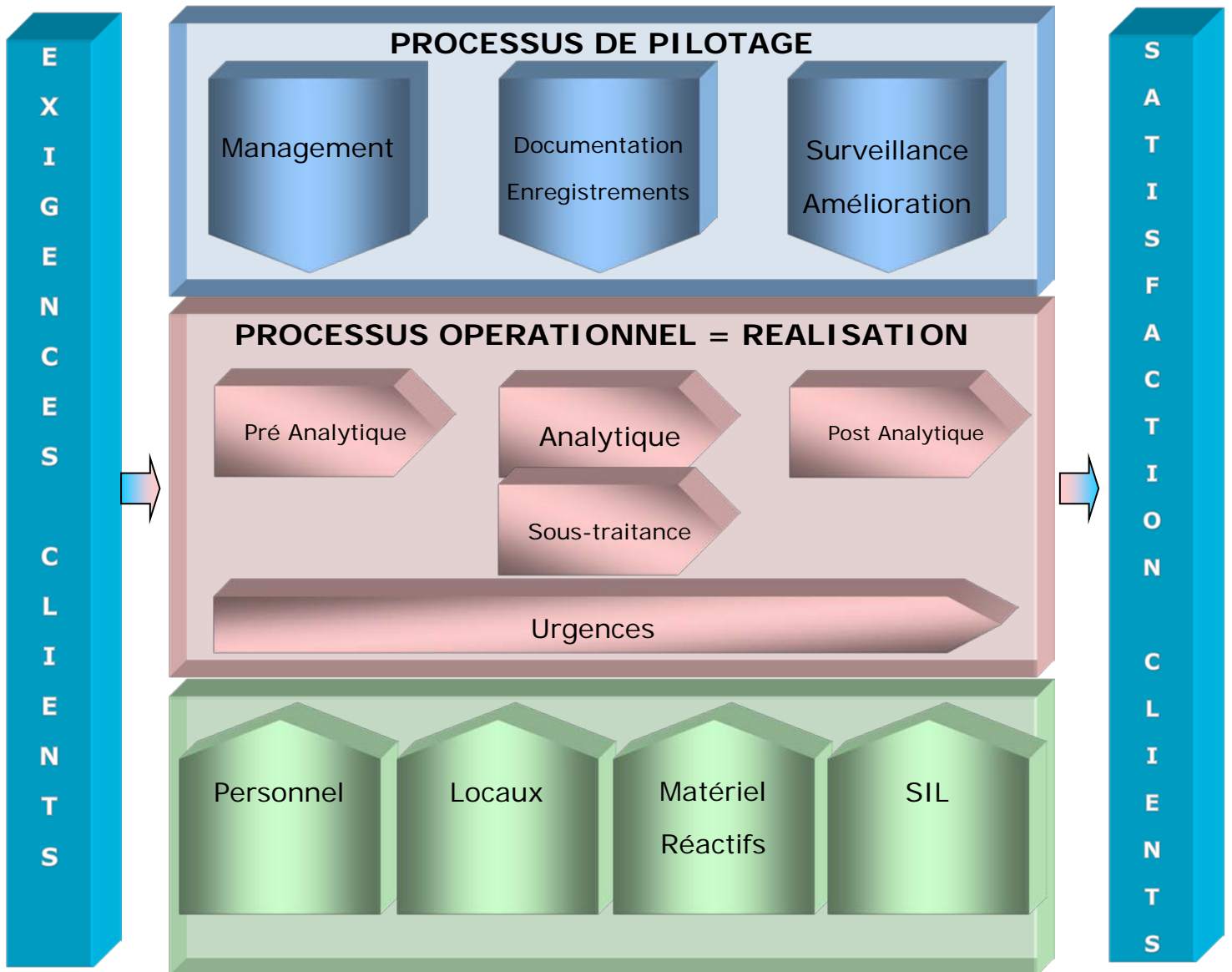
## 4. REFERENCES

1. Norme NF EN ISO 15189, AFNOR, décembre 2012
2. SH GTA 04 Guide Technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicales, Révision 01, COFRAC
3. SH INF 50 Portées-type d'accréditation, Révision 02, COFRAC
4. World Health Organization: laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition, 2010
5. A Practical guide to basic laboratory andrology, Lars Björndahl et al. Avril 2010
6. Exploration de la fonction de la reproduction versant masculin. Cahier de formation BIOFORMA n°42, 2009.
7. Desirable Biological Variation Database Specifications, Docteur Carmen RICOS, 2014
8. Groupe de travail SFBC « Normes de validation du protocole de validation de techniques », Analyses de Biologie Médicale : spécification et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques, SFBC, Ann Biol Clin, vol 57, n°6 novembre-décembre 1999
9. SH GTA 14 Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, Révision 00, COFRAC

## 5. ANNEXES

ANNEXE I : Cartographie des Processus .....	26
ANNEXE II : Répétabilité .....	27
ANNEXE III : Fidélité intermédiaire.....	28
ANNEXE IV : Variabilité inter-opérateurs .....	29
ANNEXE V : Exactitude .....	30

## ANNEXE I : Cartographie des Processus



## **ANNEXE II : Répétabilité**

**Dossier de vérification de méthode quantitative  
Evaluation des performances de la méthode**

	<b>Mesurande:</b>	<b>Spermatozoïdes</b>	
	<b>Test:</b>	<b>Répétabilité</b>	
	<b>Unité:</b>	<b>millions spermatozoïdes / ml</b>	
<b>Tableau de calcul simplifié (CV, écart type, moyenne connus)</b>			
<b>Type et référence des échantillons utilisés:</b>	<b>Niveau bas</b>	<b>Niveau haut</b>	
<b>Date de réalisation:</b>	12/07/2016	22/07/2016	
<b>Opérateur</b>	COUTAREL Céline	COUTAREL Céline	
<b>Nombre de répétitions</b>	30	30	
<b>Moyenne</b>	<b>19,893</b>	<b>120,027</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>5,81%</b>	<b>2,98%</b>	
<b>Ecart type</b>	<b>1,156</b>	<b>3,579</b>	
<b>CV Fournisseur</b>			
<b>CV limite</b>	<b>10,08%</b>	<b>10,08%</b>	
<b>Références utilisées</b>	<b>RICOS</b>		
<b>Conformité</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	
<b>Tableau de calcul</b>			
<b>Type et référence des échantillons utilisés:</b>	<b>TH194067</b>	<b>TH204079</b>	
<b>Date de réalisation:</b>	12/07/2016	22/07/2016	
<b>Opérateur</b>	COUTAREL Céline	COUTAREL Céline	
<b>Valeurs:</b>	1	18,3	123,4
	2	21,1	117,8
	3	19,8	118,6
	4	20,7	121,6
	5	18,5	124,2
	6	18,9	116,5
	7	19,1	117,7
	8	18,7	125,1
	9	21,4	121,1
	10	20,8	115,6
	11	17,8	114,9
	12	22,4	119,5
	13	19,5	122,6
	14	18,6	115,9
	15	19,4	124,3
	16	21,2	121,6
	17	20,4	117,9
	18	18,7	118,4
	19	20,3	126,3
	20	21,4	119,1
	21	19,5	115,5
	22	22,0	118,7
	23	19,4	116,8
	24	18,9	123,5
	25	19,6	125,4
	26	20,3	114,8
	27	20,7	118,6
	28	19,4	116,8
	29	20,5	124,9
	30	19,5	123,7
<b>Nombre de répétitions</b>	30	30	
<b>Moyenne</b>	<b>19,893</b>	<b>120,027</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>5,81%</b>	<b>2,98%</b>	
<b>Ecart type</b>	<b>1,156</b>	<b>3,579</b>	
<b>CV Fournisseur</b>			
<b>CV limite</b>	<b>10,08%</b>	<b>10,08%</b>	
<b>Références utilisées</b>	<b>RICOS</b>		
<b>Conformité</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	

**ANNEXE III : Fidélité intermédiaire**

Dossier de vérification de méthode quantitative Evaluation des performances de la méthode			
	Mesurande:	Spermatozoïdes	
	Test:	Fidélité intermédiaire	
	Unité:	millions spermatozoïdes / ml	
Tableau de calcul simplifié (CV, écart type, moyenne connus)			
Type et référence des échantillons utilisés:	Niveau bas	Niveau haut	
Date de réalisation:	12/07/2016	22/07/2016	
Opérateur	COUTAREL Céline PINTO Rachel DEHENRY Jacques	COUTAREL Céline DELAUNAY Emmanuelle DEHENRY Jacques	
Nombre de répétitions	30	30	
Moyenne	19,523	120,377	
CV(%)	7,04%	2,23%	
Ecart type	1,374	2,681	
CV Fournisseur			
CV limite	13,40%	13,40%	
Références utilisées	RICOS		
Conformité	OUI	OUI	
Tableau de calcul			
Type et référence des échantillons utilisés:	TH194067	TH204079	
Date de réalisation:	12/07/2016	22/07/2016	
Opérateur	COUTAREL Céline PINTO Rachel DEHENRY Jacques	COUTAREL Céline DELAUNAY Emmanuelle DEHENRY Jacques	
Valeurs:	1	18,3	117,8
	2	20,7	124,2
	3	19,1	121,1
	4	21,4	122,6
	5	18,6	117,9
	6	21,2	119,1
	7	18,7	118,7
	8	21,4	125,4
	9	19,6	118,6
	10	19,4	124,9
	11	18,1	121,7
	12	22,3	119,6
	13	20,7	120,3
	14	18,6	119,0
	15	17,9	117,6
	16	20,3	118,4
	17	20,8	117,2
	18	17,4	120,8
	19	19,6	121,8
	20	18,2	124,5
	21	21,0	123,4
	22	18,6	120,7
	23	17,9	118,5
	24	21,4	120,3
	25	17,9	116,3
	26	18,5	115,8
	27	18,9	119,6
	28	19,2	121,8
	29	21,3	125,0
	30	18,7	118,7
Nombre de répétitions	30	30	
Moyenne	19,523	120,377	
CV(%)	7,04%	2,23%	
Ecart type	1,374	2,681	
CV Fournisseur			
CV limite	13,40%	13,40%	
Références utilisées	RICOS		
Conformité	OUI	OUI	

#### ANNEXE IV : Variabilité inter-opérateurs

VARIABILITE INTE-OPERATEURS							
Tableau de calcul							
Opérateur		COUTAREL Céline	DELAUNAY Emmanuel	PINTO Rachel	DEHENRY Jacques	Différence acceptable	Conformité
Valeurs:	1	18,3	21,4	19,6	19,2	12	OUI
	2	20,7	18,2	21,8	25,7	12	OUI
	3	119,1	112,4	109,7	131,7	29	OUI
	4	68,2	58,6	79,3	64,3	22	OUI
	5	75,6	86,8	74,3	64,2	23	OUI
	6	108,4	118,4	114,6	115,7	29	OUI
	7	120,8	108,5	117,3	127,9	29	OUI
	8	42,5	47,5	54,1	50,4	19	OUI
	9	36,4	32,1	28,3	25,8	14	OUI
	10	51,7	54,7	62,2	61,0	20	OUI
	11	59,2	49,6	55,3	65,8	20	OUI
	12	32,4	38,9	26,3	35,6	15	OUI
	13	36,2	26,9	33,2	41,2	16	OUI
	14	57,3	66,4	71,0	63,3	21	OUI
	15	44,9	49,2	32,2	45,3	17	OUI
	16	63,2	65,3	74,3	59,9	22	OUI
	17	94,5	84,8	92,1	99,3	26	OUI
	18	66,5	57,2	52,7	60,5	20	OUI
	19	75,1	62,2	78,6	64,2	22	OUI
	20	129,2	147,8	139,1	142,6	33	OUI

## ANNEXE V : Exactitude

Dossier de vérification de méthode quantitative Evaluation des performances de la méthode			
	<b>Mesurande:</b>	<b>Spermatozoïdes</b>	
	<b>Test:</b>	<b>Approche de l'exactitude par les EEQ ponctuels</b>	
	<b>Unité:</b>	<b>millions spermatozoïdes / ml</b>	
<b>Type et référence des échantillons utilisés:</b>	<b>NUM.SPZ.2017-1A</b>	<b>NUM.SPZ.2016-2A</b>	<b>NUM.SPZ.2016-1A</b>
<b>Date de l'EEQ:</b>	31/01/2017	101/10/2016	25/01/2016
<b>Valeur Labo</b>	61,000	38,200	11,960
<b>Cible groupe de pairs</b>	70,000	44,000	14,100
<b>Moyenne toutes techniques</b>	67,000	39,000	13,400
<b>Biais par rapport aux pairs</b>	<b>-12,86%</b>	<b>-13,18%</b>	<b>-15,18%</b>
<b>Biais toutes techniques</b>	<b>-8,96%</b>	<b>-2,05%</b>	<b>-10,75%</b>
<b>Biais (%) limite</b>	<b>15,600%</b>	<b>15,600%</b>	<b>15,600%</b>
<b>Références utilisées</b>	<b>RICOS</b>		
<b>Conformité / Pairs</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>
<b>Conformité / toutes techniques</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>

## RESUME

Le laboratoire Bio+ est accrédité depuis 2011 selon la norme NF EN ISO 15189. Celle-ci stipule que le laboratoire doit valider les procédures analytiques afin de confirmer que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites.

L'ensemble du plateau technique, le pré-analytique et le post analytique sont concernés par cette accréditation.

Ce mémoire traite de la vérification de méthode de la concentration de spermatozoïdes humains. Ce thème a été choisi afin d'étendre notre portée d'accréditation en y incluant au fur et à mesure les examens de spermologie.

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes aidés du document SH GTA 04 fourni par le COFRAC. Nous avons ainsi réalisé une maîtrise des risques et effectué différents essais afin d'évaluer les performances de la méthode. Les critères retenus pour l'évaluation sont : la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la variabilité inter-opérateur, l'exactitude, l'étendue de mesure, la contamination et l'intervalle de références.

Grâce à cette étude, nous avons pu améliorer notre façon de réaliser l'examen comme par exemple en y incluant le double comptage avec vérification des différences acceptables.

Par faute de temps, nous n'avons malheureusement pas pu mettre en œuvre tous les critères souhaités afin de pouvoir présenter le dossier au COFRAC. Effectivement, les CIQ ne sont toujours pas mis en place pour cette analyse. Ceux-ci seront programmés avant la fin de l'année.

Tous les essais réalisés lors de cette étude se sont révélés conformes aux exigences du laboratoire. Notre méthode pour la mesure de la concentration en spermatozoïdes du sperme humain est par conséquent validée.