

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. DE MEDECINE D'AMIENS

ANNEE 2016

Thèse 2017 - 155

MEMOIRE POUR LE

DIPLOME D'ETUDES DE BIOLOGIE MEDICALE

OPTION SPECIALISE EN BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

**MISE EN PLACE DE LA DEMARCHE QUALITE SELON LA NORME
NF EN ISO 15189 EN SPERMIOLOGIE DIAGNOSTIQUE DANS LE
SERVICE DE MEDECINE ET BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DU
CHU D'AMIENS**

Présentée et soutenue publiquement

le mardi 28 février 2017

par Monsieur Vincent PUY

né le 19 octobre 1987 à Roubaix (59)

Président du jury: Monsieur le Professeur des Universités Henri Copin

Membres du jury: Monsieur le Professeur des Universités Saïd Kamel

Madame le Maître de Conférences des Universités Aviva Devaux

Monsieur le Maître de Conférences des Universités Moncef Benkhalifa

Madame le Docteur Valérie Adjidé

Directrice de thèse: Madame le Docteur Naïma Belhadri-Mansouri

REMERCIEMENTS

A Monsieur le « Président » Henri COPIN, Professeur des universités, praticien hospitalier, de me faire l'honneur de « présider » cette thèse. Des chants de la Marseillaise dans l'amphithéâtre de première année à ce jour, je vous remercie pour vos enseignements, votre soutien et votre bienveillance tout au long de mes études.

A Madame Naïma BELHADRI-MANSOURI, praticien hospitalier, d'avoir accepté de diriger ce travail. Je vous remercie pour votre soutien et tous les échanges constructifs que nous avons pu avoir dans la mise en place de l'assurance qualité dans le service.

A Monsieur le Professeur Saïd KAMEL, Professeur des universités, praticien hospitalier, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse mais aussi de m'avoir permis de suivre un parcours en Master.

A Monsieur Moncef BENKHALIFA, Maître de conférences des universités, praticien hospitalier, responsable du secteur d'AMP, de me faire l'honneur de juger ce travail et d'avoir participer à l'amélioration de ce mémoire. Je vous remercie particulièrement pour votre confiance, vos conseils et la dynamique de recherche.

A Madame Aviva DEVAUX, Maître de conférences des universités, praticien hospitalier, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse mais également pour les heures passées dans la rédaction des projets de recherche (AOL quand tu nous tiens).

A Madame Valérie ADJIDE, responsable de l'assurance qualité du Laboratoire, praticien hospitalier, d'avoir accepté de juger mon travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et vos réponses à mes trop nombreuses questions.

A Madame ROSE et Madame LEMAIRE-HURTEL, praticiens hospitaliers, ainsi que Monsieur Pierre LAFOY, ingénieur qualité, pour leurs avis et conseils concernant ce travail.

A tout le service d'AMP, merci pour ces années d'internat :

Aux secrétaires Dany (« first lady »), Diane, Marie : c'est un plaisir de travailler avec vous au quotidien;

A toute la belle équipe de technicien(nes) Elodie, Florence, Ingrid, Séverine, David. Votre travail et votre conscience professionnelle sont pour moi source d'inspiration. Promis, un jour, je collerai les étiquettes des paillettes dans le bon sens (☺)

A l'équipe de choc de Gynécologues : Emmanuelle, Florence, Mélyne, Rosalie, Frédéric, Caroline, Clémence. C'est un plaisir de travailler avec vous.

Au Professeur Jérôme AUSSEIL pour l'encadrement de mon master 2 Recherche et pour tout ce que vous m'avez donné l'occasion de découvrir. Je vous remercie pour votre bienveillance, votre patience et vos précieux conseils. J'espère avoir la chance de continuer à avoir des projets communs car c'est un vrai plaisir de travailler ensemble.

A Madame Cathy GOMILA (mon « maître Jedi »), technicienne de laboratoire et toute l'équipe du Professeur Ausseil (Walaa, Christele, Ahmed, Eric, Thomas, Nicolas..) pour les bons moments passés ensemble.

Aux co-internes (sauf une ☺) qui m'ont accompagné au cours de ces années : merci pour tous les bons moments partagés ensemble.

A tous mes amis.

A ma famille, pour m'avoir supporté toutes ces années, je vous aime :

A mes grands-parents : papy Jacques, mamie Monique et à la mémoire de papy Pierrot et de mamie Denise,

A ma sœur Marielle et mon frère Laurent,

A ma tante Véronique,

A mon parrain Yves,

A mes parents (les meilleurs !) : merci pour la relecture consciencieuse de ce mémoire.

A Pauline Moity, ma chérie contre vents et marées, je t'aime.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE.....	6
1. INTRODUCTION.....	7
1.1. Généralités.....	7
1.1.1. Historique.....	7
1.1.2. Accréditation : reconnaissance de la compétence du Laboratoire.....	13
1.1.3. Les référentiels.....	14
1.2. Politique qualité et avancement dans la démarche d'accréditation.....	15
1.2.1. La politique qualité du Laboratoire.....	16
1.2.2. L'accréditation du Laboratoire.....	16
1.2.3. Accréditation des activités en biologie de la reproduction.....	16
1.3. Intérêts et objectifs de l'étude.....	17
2. METHODOLOGIE.....	18
2.1. Mesure de la concentration en spermatozoïdes.....	18
2.1.1. Matériel.....	18
2.1.2. Méthode.....	18
2.2. Validation de méthode : information normative.....	21
2.3. Validation d'une méthode quantitative de portée B.....	22
2.3.1. Choix des référentiels.....	23
2.3.2. Maîtrise des risques.....	23
2.3.3. Evaluation de la performance et choix des critères d'acceptabilité.....	23
3. RESULTATS, ANALYSE ET INTERPRETATION.....	24
3.1. Maîtrise des risques.....	24
3.2. Evaluation expérimentale des critères de performance.....	30
3.2.1. Evaluation de la fidélité.....	30
3.2.2. Variabilité inter-opérateurs.....	31
3.2.3. Evaluation de l'exactitude.....	32
3.2.4. Estimation de l'incertitude de mesure.....	33
3.2.5. Comparaison de méthode.....	36
3.2.6. Etendue de mesure.....	38
3.2.7. Autres critères de performance.....	39
4. CONCLUSION.....	40
5. BIBLIOGRAPHIE.....	41
6. ANNEXES.....	44

GLOSSAIRE

- AMP : Assistance Médicale à la Procréation
- AMDEC : Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité
- ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
- BDR : Biologie De la Reproduction
- CBH : Centre de Biologie Humaine
- CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
- CIQ : Contrôle Interne de Qualité
- CNQ : Contrôle National de Qualité
- COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation
- CV : Coefficient de Variation
- DU : Diplôme Universitaire
- EEQ : Evaluation Externe de la Qualité
- ET : Ecart-Type
- GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale
- GTA : Guide Technique d'Accréditation
- HAS : Haute Autorité de Santé
- HPST : Hôpital, Patients, Santé et Territoires
- IGAS : Inspection Générale des Affaires Sociales
- ISO : International Organization for Standardization
- JCAHO : Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations
- JUSE : Union of Japanese Scientists and Engineers
- LBM : Laboratoire de Biologie Médicale
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PDCA : Plan, Do, Check, Act
- PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
- RAQ : Responsable Assurance Qualité
- REF : document de Référence
- SROS : Schéma Régional d'Organisation des Soins
- WHO : World Health Organization
- § : paragraphe

1. INTRODUCTION

1.1. Généralités

1.1.1. Historique

La qualité est une notion ancienne dont on retrouve la trace dès les premières préoccupations de l'homme (Tableau 1) [1].

1792-1750 av. JC	Selon le code du roi Hammurabi, la mauvaise qualité d'un travail peut être sanctionnée. Ainsi, si « <i>un médecin pratique une grande incision avec un bistouri et tue son malade, ou s'il ouvre une taie avec un bistouri, et perd l'œil, on lui coupera les mains.</i> »
XV ^e siècle av. JC	Les Égyptiens pratiquaient le contrôle du travail des tailleurs de pierre par des inspecteurs indépendants
IV ^e siècle av. JC	Les Grecs seraient à l'origine des premiers textes visant à normaliser les processus de la qualité : une stèle décrivant les spécifications techniques relatives à la production de chevilles en bronze a été retrouvée dans le Péloponnèse.
XII ^e siècle	Les anglais inventèrent la méthode d'échantillonnage pour contrôler le titre et le poids des monnaies
Au début de la Renaissance	Les commandes passées par les Mécènes aux artistes étaient accompagnées de « <i>cahiers des charges</i> », très détaillés, que ces artistes devaient suivre sous peine de ne pas être payés.
XVII ^e siècle (période préindustrielle)	Jean-Baptiste Colbert, secrétaire d'État de Louis XIV, fit une déclaration qui reste d'actualité : « <i>Si nos fabriques imposent, à force de soin, la qualité supérieure de nos produits, les étrangers trouveront avantage à se fournir en France...</i> ».

Tableau 1 : Historique de la qualité avant la révolution industrielle

Même si la qualité est une notion ancienne, le concept actuel de qualité est apparu récemment avec le passage de la production artisanale vers la production de masse, au début de l'ère industrielle moderne [2].

1900-1950 : L'émergence du contrôle qualité : une origine industrielle

Au début du vingtième siècle, la production de masse avec Frederick W. Taylor puis Henry Ford voient l'apparition d'un nouveau métier : l'inspecteur du contrôle de la qualité du produit en fin de chaîne. C'est le précurseur du qualitatifien.

En 1916, selon Henri Fayol, « administrer, c'est prévoir, organiser, coordonner et contrôler » [3]. Ce concept intéresse les industriels comme Walter A. Shewhart qui veulent l'appliquer afin de diminuer les coûts de production. Le but était donc d'intégrer la qualité dès la phase initiale et de ne plus se contenter de constater le niveau de conformité en bout de chaîne.

Années 50, 60 et 70 : les concepts de qualité totale et d'assurance qualité, l'influence japonaise :

Au lendemain de la seconde guerre mondiale, le Japon dépourvu de ressources naturelles, doit relever un défi important de reconstruction. Pour ce faire les japonais, par l'intermédiaire de l'« Union of Japanese Scientists and Engineers » (JUSE), invitent des experts américains de la qualité comme W. Edwards Deming puis Joseph Juran, ou encore Armand V. Feigenbaum. W. Edwards Deming recommande l'implication de l'ensemble du personnel de l'entreprise, incluant processus et management dans le système organisationnel de production. Il introduit un important outil de la qualité, la roue de Deming ou PDCA (Figure 1) [4]. C'est une méthode de maîtrise des processus basée sur un cycle dynamique et itératif :

- Planifier, préparer, définir (Plan)
- Faire, mettre en œuvre (Do)
- Vérifier, analyser, contrôler, évaluer (Check)
- Agir, améliorer, décider (Act).

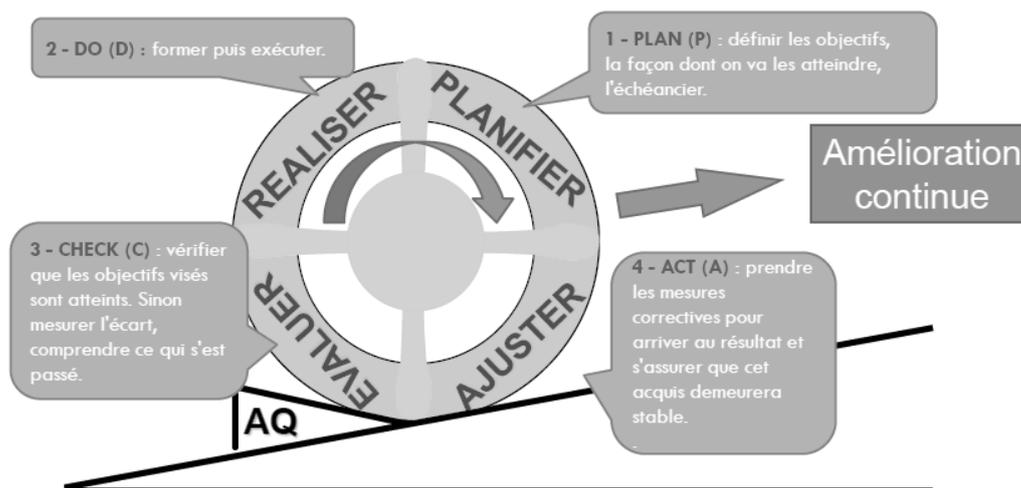


Figure 1 : Roue de Deming : cycle PDCA principe de l'amélioration continue

Après les années 60, le professeur Kaoru Ishikawa, diffuse ce courant de pensée en refusant l'idée que le management concerne uniquement les ingénieurs et propose d'intégrer aussi les ouvriers. Il fonde les cercles de la qualité, petits groupes de travail visant

l'amélioration continue de la qualité dans leur secteur d'entreprise. En 1962, il décrit les outils de la qualité dont le plus connu est le diagramme cause-effet, appelé aussi diagramme d'Ishikawa, en forme d'arête de poisson, permettant de repérer les dysfonctionnements avant d'essayer de les résoudre (Figure 2) [5].

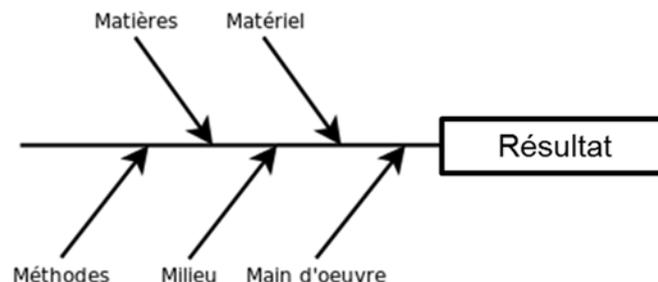


Figure 2: Schéma du diagramme d'Ishikawa

Les années 60, 70, 80 en Occident : généralisation de la qualité totale.

A partir des années soixante-dix, les industriels occidentaux vont s'initier aux démarches de type « assurance qualité » et « qualité totale ». D'une démarche curative, qui consistait à régler les problèmes après leur apparition, on passe à une approche préventive de la gestion de la qualité. Philip B. Crosby, dans le cadre des programmes spatiaux Apollo, développe le concept du « zéro défaut » et voit la qualité comme une « conformité à des exigences ». Assurer la qualité consiste « à définir et à mettre en œuvre de façon systématique les dispositions nécessaires pour fonder la confiance par la preuve, tant de façon interne à l'entreprise qu'à l'égard des clients » [2].

Dans les années quatre-vingt, les pays industrialisés participent à la rédaction de normes internationales pour l'assurance de la qualité au sein de l'organisation internationale de normalisation (ISO). ISO n'est pas un sigle mais un nom dérivé du grec ἴσος, signifiant "égal" symbolisant à l'échelle mondiale l'harmonisation des normes industrielles pré-existantes. La norme ISO9000 traite du management de la qualité et définit :

- la **qualité** comme « l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences ».

- le **système de management de la qualité** comme un « système de management permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité ».

- l'**assurance qualité** (ISO9000/2000) comme une « partie du management de la qualité visant à apporter la confiance que les exigences relatives à la qualité sont satisfaites ».

La qualité a donc évolué à travers les âges (Figure 3). Dans les premières années de la qualité, les entreprises faisaient de la qualité en mettant en place des contrôles a posteriori par des inspecteurs. Pour vendre des produits conformes à un cahier des charges, il fallait éliminer tous ceux qui ne respectaient pas cette conformité.

Quelques années plus tard, le concept de qualité s'est transformé en « assurance qualité ». Cela suppose une maîtrise de tous les éléments qui composent les procédés de fabrication et de pouvoir en apporter la preuve.

Plus tard une autre évolution du concept de qualité fait son apparition, il s'agit du management de la qualité qui, à son tour, chasse l'assurance de la qualité. Satisfaction non seulement dans la qualité des produits mais aussi dans toutes les ressources de l'organisation : les clients, les fournisseurs, les actionnaires, les salariés et la société en général.

Aux Etats-Unis, la seconde moitié du XXème siècle marque la transition du système qualité au monde de la santé avec notamment la création de la Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations (JCAHO). En France, il faudra attendre le début des années 2000 et le développement de la certification des établissements de santé visant à améliorer la qualité et la sécurité des soins. Sa mise en place est aujourd'hui placée sous la responsabilité de la Haute Autorité de Santé (HAS).

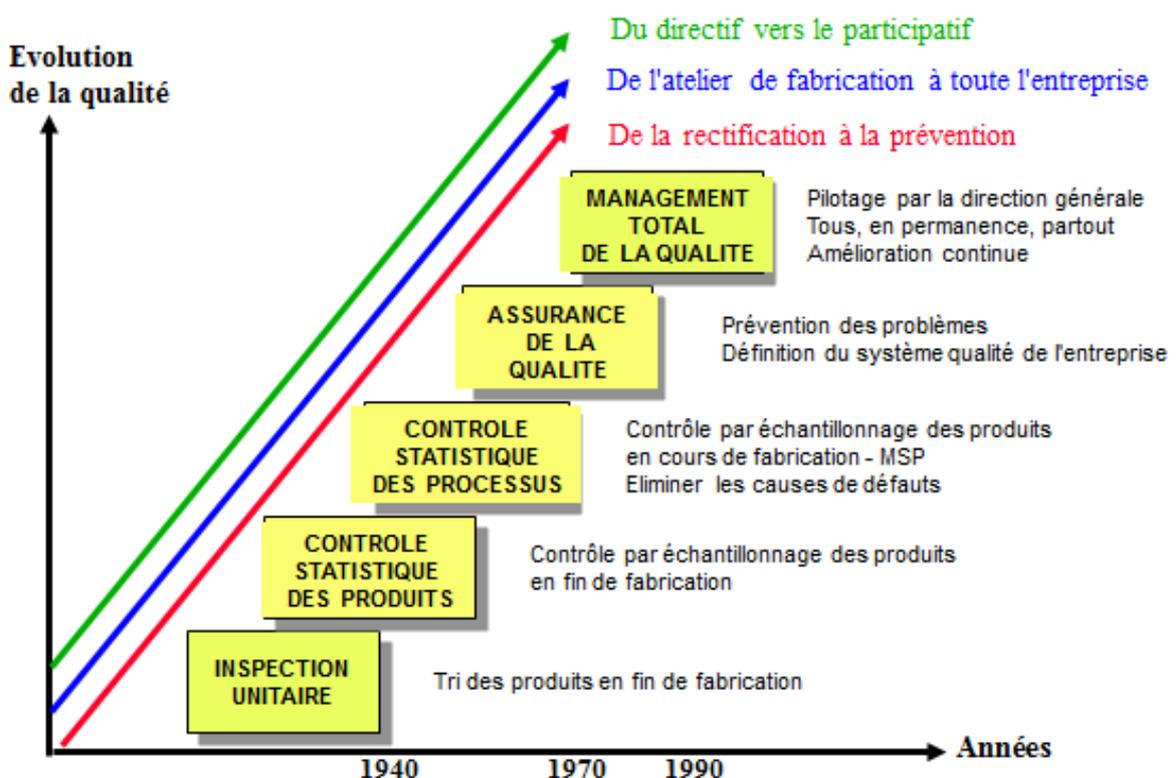


Figure 3: Evolution du concept de la qualité

Avant la réforme de la biologie médicale :

La qualité des soins a toujours été un élément majeur dans le domaine de la santé. Elle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme le moyen de « *garantir, à chaque individu, un ensemble d'actes diagnostiques et thérapeutiques qui assureront le meilleur résultat en terme de santé, de meilleur coût, au moindre risque et pour la plus grande satisfaction en terme de procédures, de résultats et de contacts humains à l'intérieur du système de soins* ».

Pour s'assurer du bon service rendu, le monde hospitalier introduit de nouvelles démarches de gestion et d'amélioration de la qualité, dont les normes ISO 9000 représentent une des sources d'inspiration. La biologie médicale, n'échappe donc pas à cette dynamique :

- le contrôle national de qualité (**CNQ**) : la loi N° 75-626 du 11 juillet 1975 a rendu obligatoire la participation des LBM à un « *Contrôle National de Qualité* ».

- le **contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale** :

Ses modalités étaient fixées par le décret 83-104 du 15 février 1983 puis il fut introduit dans le code de la santé publique. Son usage fut très limité faute de référentiel.

- le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (**GBEA**) :

C'est le décret 93-354 du 15 mars 1993 qui apporte le référentiel qui servira de cadre pour le contrôle de bonne exécution des analyses. Il s'agit du GBEA, publié par arrêté du 2 novembre 1994, puis complété par arrêté du 25 novembre 1999. Les règles énoncées sont dites opposables et s'appliquent à tous les laboratoires de biologie médicale (LBM) en donnant des définitions et en recommandant une démarche qualité du pré-analytique à la remise des résultats (post-analytique).

- **Bio Qualité** :

Cette association créée par 3 syndicats de biologistes au début des années 2000 vise à pallier aux difficultés rencontrées par les biologistes dans la mise en place des bases d'une assurance qualité.

La réforme de la biologie médicale :

En 2006, le rapport de l'inspection générale des affaires sociales (IGAS) intitulé « *la biologie médicale libérale en France : bilan et perspectives* » est le premier à souligner « *la nécessité de réformer la biologie médicale* » avec l'idée que « *la seule garantie objective semble être la certification et l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) par un organisme tiers* » [6]. La réforme de la biologie médicale a pour objectif de « *permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à son juste prix dans un cadre européen* ».

Dans le cadre du projet de loi Hôpital Patient Santé et Territoire (HPST), la ministre de la Santé de l'époque, Roselyne Bachelot, demande « *à ce que soient étudiées les modalités de garantie de la qualité de la biologie médicale en France* » afin que chacun puisse « *pouvoir avoir accès sur notre territoire à une biologie médicale de qualité prouvée, rémunérée à sa juste valeur* » [7]. Le rapport « *Ballereau* » [8] répond à cette demande en 2008 et note que la régulation du système de santé des LBM doit reposer sur la qualité. Il met en avant que « *la structure des laboratoires français de biologie médicale n'a pas progressé aussi vite que l'aurait exigé l'évolution des connaissances* » et incite à évoluer vers l'accréditation obligatoire.

Suite au rapport Ballereau l'ordonnance n° 2010-49 relative à la biologie médicale paraît le 13 janvier 2010 [9]. Celle-ci modifie le Code de la Santé Publique et constitue la nouvelle référence réglementaire relative à la biologie médicale. Elle a été par la suite ratifiée et modifiée par la loi du 30 mai 2013 [10]. Les principales caractéristiques de l'ordonnance sont :

- le renforcement de la médicalisation de la discipline. L'examen de biologie médicale est redéfini en intégrant l'analyse de données cliniques et l'interprétation du résultat. Le but est de placer la biologie médicale comme l'activité de santé qu'elle est, et non comme une activité de service.

- la même réglementation s'applique pour les LBM publics et privés.

- la pluralité de l'offre est garantie par le schéma régional d'organisation des soins (SROS) de la biologie, établie par les agences régionales de santé.

- le regroupement des laboratoires multi-sites en une seule entité, avec un laboratoire unique par hôpital.

- la « *qualité prouvée* » : **l'accréditation qui jusqu'alors était une démarche volontaire devient obligatoire (Art. L. 6221-1) conformément à la norme NF EN ISO 15189 [11].** Les examens de biologie médicale délocalisés doivent répondre quant à eux aux exigences de la norme NF EN ISO 22870 [12]. La participation au CNQ de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM, Art. L. 6221-10) ainsi qu'aux évaluations externes de la qualité (EEQ) est rendue obligatoire (Art. L. 6221-9).

1.1.2. Accréditation : reconnaissance de la compétence du Laboratoire

Définition :

L'accréditation est une « *procédure selon laquelle un organisme faisant autorité fournit une reconnaissance formelle qu'une organisation est compétente pour réaliser des tâches spécifiques* » [11] et ce « *dans le seul intérêt du patient* » [13]. Elle permet de garantir aux patients et aux prescripteurs la fiabilité des examens de biologie médicale grâce à une vérification de la compétence du LBM par des biologistes indépendants de la structure à accréditer, avec le soutien de qualitatifs. Cette accréditation porte sur toutes les phases de réalisation de l'examen de biologie médicale, non seulement sur la phase analytique mais également sur les phases pré-analytiques (prélèvement et transport jusqu'au lieu de l'analyse) et post-analytique (validation du résultat, interprétation biologique).

L'accréditation est délivrée par l'organisme national d'accréditation sur demande du LBM. En France, cet organisme est le COmité FRançais d'ACcréditation (COFRAC) avec le calendrier d'accréditation suivant :

- entrée effective du LBM le 31 octobre 2012 pour la voie A (dossier d'accréditation partielle) et le 31 mai 2013 pour la voie B (Bioqualité),
- 50 % des examens du LBM doivent être accrédités à compter du 1^{er} novembre 2016,
- 70 % à compter du 1^{er} novembre 2018,
- Et enfin, 100 % à compter du 1^{er} novembre 2020.

Une fois l'accréditation initiale délivrée au laboratoire, celle-ci est suivie par le COFRAC selon un plan de surveillance précis (Figure 4).

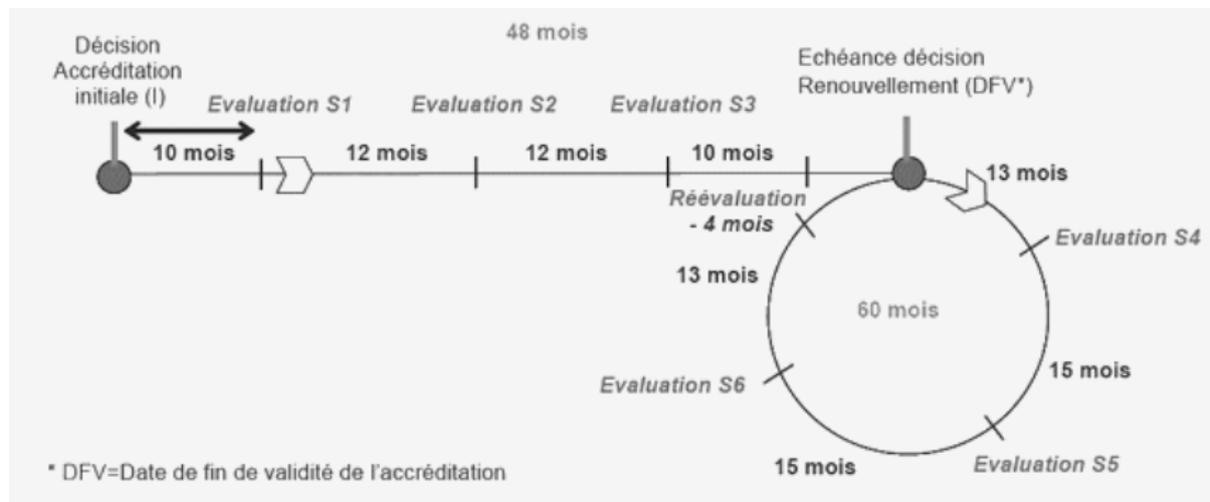


Figure 4: Cycle de vie d'une accréditation

1.1.3. Les référentiels

Un référentiel regroupe l'ensemble des exigences qui s'appliquent à une activité. La biologie médicale est dotée de plusieurs référentiels :

- réglementaires: lois, décrets, arrêtés comme développé précédemment.
- normatifs : internationaux, européens, nationaux.
- professionnels : sociétés savantes, groupes multiprofessionnels.

La norme NF EN ISO 15189 :

La norme NF EN ISO 15189 [11] est fondée sur les normes ISO/CEI 17025 : « *prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais* » et sur l'ISO 9001 : « *système de management de la qualité, exigences* ». La première version de la norme NF EN ISO 15189 a été publiée en 2001, puis elle a subi deux révisions, une première en 2007 puis une seconde en 2012. La norme évolue dans le sens de la série des normes ISO 9000, en intégrant notamment les exigences relatives à la cartographie des processus du laboratoire (processus métier, processus stratégiques, processus supports).

Cette norme internationale fournit les exigences de compétence et de qualité propres aux LBM. Elle comporte cinq chapitres dont deux principaux : le chapitre 4 traitant des exigences relatives au management et le chapitre 5 détaillant les exigences techniques.

La norme NF EN ISO 15189 encadre donc les différentes étapes de l'acte de biologie

médicale : pré-analytique, analytique et post-analytique mais porte aussi sur l'organisation, le management et la compétence du personnel.

Guides et référentiels du COFRAC :

Le COFRAC a rédigé un certain nombre de documents relatifs à l'accréditation des LBM. On distingue :

- Les documents de référence (REF) :

Il s'agit de référentiels opposables dont le plus important d'entre eux, le SH REF 02 « *Recueil d'Exigences Spécifiques pour l'accréditation des LBM en France* » [13], reprend les exigences réglementaires et normatives. Il est utile pour les biologistes afin de préciser les points restés vagues dans la norme ou imposés en France par la réglementation (validation, durée d'archivage ou de conservation des documents, rôle des biologistes, qualifications requises, etc.). Ils permettent également aux évaluateurs techniques et qualitatifs du COFRAC d'harmoniser les auditions des LBM.

- Les guides techniques d'accréditation (GTA)

Ils apportent des précisions suffisantes pour atteindre les exigences de la norme mais leur application n'est pas obligatoire à condition de présenter les éléments de preuve appropriés. Exemple : SH GTA 04 : « *Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale* » [14]. Ce document présente les principes généraux de la validation de méthode ainsi que les critères de performance à vérifier en fonction du type de méthode avec des exemples pratiques.

- **Les documents d'informations (INF) et les formulaires (FORM)** qui ne sont pas non plus d'utilisation obligatoire. Citons par exemple le SH INF 50 : « *Portées-types d'accréditation* » / SH FORM 43 : « *FICHE TYPE QUANTITATIF – Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale* » [15].

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

Le Laboratoire multi-sites 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 (Annexe I). La direction du laboratoire s'est engagée dans ce sens (Annexe II).

1.2.1. La politique qualité du Laboratoire

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. Il a obtenu le 1^{er} Avril 2012, l'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*.

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

La première visite de surveillance s'est déroulée fin septembre 2015 et la deuxième en juillet 2016 conformément au cycle de vie d'une accréditation. Entre deux, des visites d'extension découplées en février et mars 2016 pour environ 67 % des analyses et au moins un examen par famille (anciennes 17 familles du SH INF 50) ont eu lieu. Le Laboratoire est actuellement en attente de sa troisième visite de surveillance prévue en juillet 2017 (Figure 4).

1.2.2. L'accréditation du Laboratoire

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. Il a obtenu le 1^{er} Avril 2012, l'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*.

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

La première visite de surveillance s'est déroulée fin septembre 2015 et la deuxième en juillet 2016 conformément au cycle de vie d'une accréditation. Entre deux, des visites d'extension découplées en février et mars 2016 pour environ 67 % des analyses et au moins un examen par famille (anciennes 17 familles du SH INF 50) ont eu lieu. Le Laboratoire est actuellement en attente de sa troisième visite de surveillance prévue en juillet 2017 (Figure 4).

1.2.3. Accréditation des activités en biologie de la reproduction

Le Laboratoire a demandé l'extension de son accréditation initiale concernant deux activités du sous-domaine Biologie de la Reproduction (BDR) de la famille hématologie-immunologie-BDR selon le document SH INF 50 du COFRAC [15]. Il s'agit des lignes de portée d'accréditation :

- SP1 pour le spermogramme dans la sous-famille « Spermologie diagnostique »,
- et AP3 pour le recueil des complexes cumulo-ovocytaires concernant la sous-famille « Activités biologiques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) ».

Interne médecin biologiste en cours de spécialisation en BDR, 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 celui du COFRAC qui s'est déroulé du 23 au 25 février 2016. Celle-ci a conclu à un total de 13 écarts (dont 8 critiques) soumis à des preuves complémentaires pour septembre 2016.

1.3. Intérêts et objectifs de l'étude

La validation de méthode du spermogramme a fait l'objet d'un écart critique (Annexe III). La fiche d'écart critique et le rapport d'expertise des auditeurs 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 (Annexe IV). 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 (Annexe IV). Elle a été établie comme un processus complexe composé de 4 sous-processus (concentration en spermatozoïdes, mobilité des spermatozoïdes, viscosité et volume du sperme).

Le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat et la concentration en spermatozoïdes sont corrélés au taux de grossesse [16]. C'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). Cette analyse a donc un intérêt clinique majeur en AMP. C'est pourquoi j'ai décidé de présenter plus particulièrement dans cette thèse la validation de méthode du sous-processus concentration en spermatozoïdes dans le sperme éjaculé.

2. METHODOLOGIE

2.1. Mesure de la concentration en spermatozoïdes

2.1.1. Matériel

La manipulation du sperme avant décompte est réalisée sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) 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)

2.1.2. Méthode

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 (Tableau 2). 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 / champ ($\times 20$)	Nb. de spermatozoïdes / champ ($\times 40$)	Dilution requise	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

Tableau 2 : Dilutions requises pour calculer la concentration spermatique [17].

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 20 μl 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 l'homogénéité du dépôt.
- 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.
- 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 (Tableau 3).

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

Tableau 3 : Acceptabilité des différences de 2 numérations en spermatozoïdes d'un même échantillon de sperme pour une somme donnée [17].

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.

2.2. Validation de méthode : information normative

Les exigences organisationnelles et techniques pour la réalisation d'examens de biologie médicale sont mentionnées dans le document SH REF 02 [13]. 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 [18].

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 [14] 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), adaptée par rapport aux méthodes de référence (utilisant les cellules de Neubauer ou de Malassez) [17,19]. Il s'agit donc d'une **validation de méthode quantitative de portée B**.

2.3. Validation d'une méthode quantitative de portée B

En ce qui concerne le spermogramme, sa validation de méthode a été établie comme un processus complexe composé de 4 sous-processus (concentration en spermatozoïdes, mobilité des spermatozoïdes, viscosité et volume du sperme). Suite à la visite du COFRAC au début de l'année 2016, nous avons repris la validation de méthode du sous-processus concentration en spermatozoïdes en nous appuyant sur le document SH GTA 04 [14], la procédure du Laboratoire et la fiche-type SH FORM 43 [20].

2.3.1. Choix des référentiels

Deux sources bibliographiques décrivent la méthode de référence de la mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat : les recommandations de l'OMS [17] et le cahier Bioforma [19]. Nous nous sommes donc appuyés sur ces documents dans notre étude. 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.

2.3.2. 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 (Figure 2).

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.

2.3.3. Evaluation de la performance 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. (Tableau 4) ainsi que les Evaluations Externes de la Qualité (EEQ) réalisées sur Biologie Prospective.

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

Tableau 4 : Objectifs de performance du spermogramme selon la table Ricos et al. [21].

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 :

5 M	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 [22]) - 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 travail
	Délai avant analyse	3	Formation du personnel (si > 1h risque d'asthénospermie, nécrospermie...)	- Formation (<u>CHU-FO1486</u> , <u>CHU-MO0231</u>) et habilitation (<u>CHU-FO1010</u>) - Délai d'analyse :

5 M	Points critiques	Échelle de criticité	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
	Prétraitement	3	Liquéfaction Homogénéisation	* Fiche poste de travail (<u>CHU-FP0067</u>) * Fiche analyse (<u>CHU-FAN0131</u>) avec traçabilité heures de prélèvement et d'analyse * Feuilles de travail
	Interférences	2	Traitements Contexte clinique	Renseignement de la fiche de travail (<u>CHU-MO0261</u>)
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 (<u>CHUPROC0373</u>) Entretien équipement (<u>CHU-MO0027</u> , <u>CHU-MO0032</u>) Salle dédiée
Matériel	Réceptacle (flacon, préservatif)	2	Intégrité Type de stérilisation	Procédure achat (<u>CHUPROC0381</u>) Matériel à usage unique

5 M	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, 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, CHU-MO0231</u>) et habilitation (<u>CHU-FO1010</u>) - Passage régulier au poste de spermologie - Participation aux CIQ et aux EEQ - Fiche poste de travail (<u>CHU-FP0067</u>)

5 M	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	- Formation (<u>CHU-FO1486</u> , <u>CHU-MO0231</u>) et habilitation (<u>CHU-FO1010</u>) - Vérification de la retranscription par le biologiste avant validation avec traçabilité sur les feuilles de travail - Traçabilité des vérifications des enregistrements informatiques (<u>CHU- PROC0372</u>)
	Exposition accidentelle du personnel	2	Risque d'incidents ou d'accidents liés à la manipulation de produits biologiques ou toxiques	Fiche de sécurité (<u>CHU- MO0129</u>) Formation à l'exposition au sang ou produits biologiques (<u>CHU-PROC0373</u>)

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 Excel 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 (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 adaptée [21, 23] ainsi qu'à la pertinence clinique.

Conclusion : La méthode est répétable.

3.2.1.2. Fidélité intermédiaire

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 Excel ont permis de calculer les moyennes, ET et CV de reproductibilité pour les 5 valeurs (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 [21] 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.

La valeur de chaque opérateur est appréciée par la méthode du Z-score, avec :

$$Zscore = \frac{\text{Valeur trouvée} - \text{Moyenne}}{\text{Ecart type}}$$

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 [24]. 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 :

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

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).

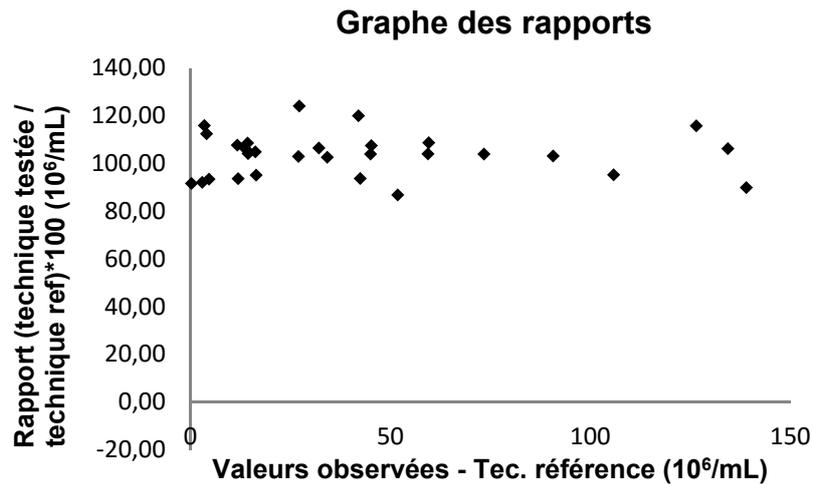
Les résultats du calcul de l'incertitude sont exprimés de la façon suivante :

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

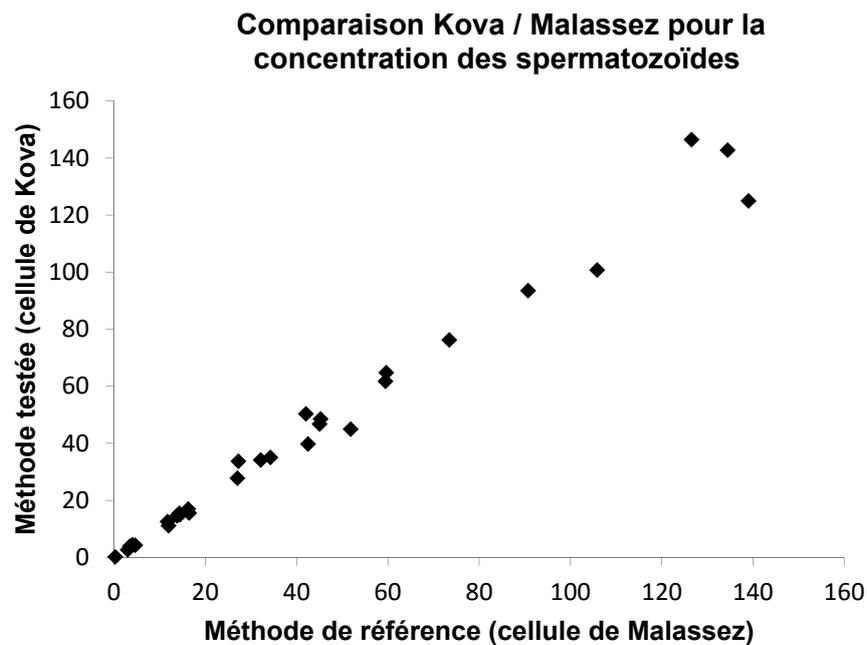
Référence (Ricos)	U = 37.7 %
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : Niveau bas	2.78 ± 0.44 millions Spz / mL
Quantification de l'incertitude (niveau 2) : Niveau haut	27.1 ± 2.48 millions Spz / mL
Interprétation	Conforme

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.



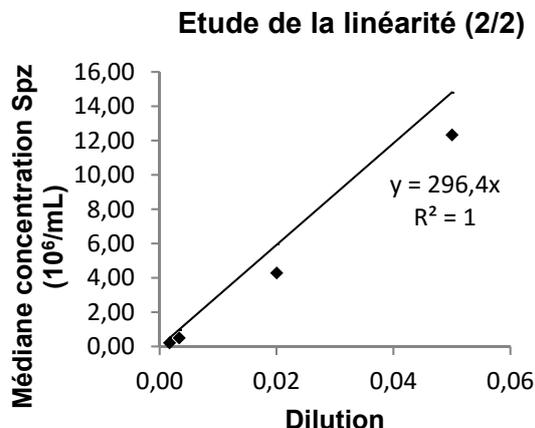
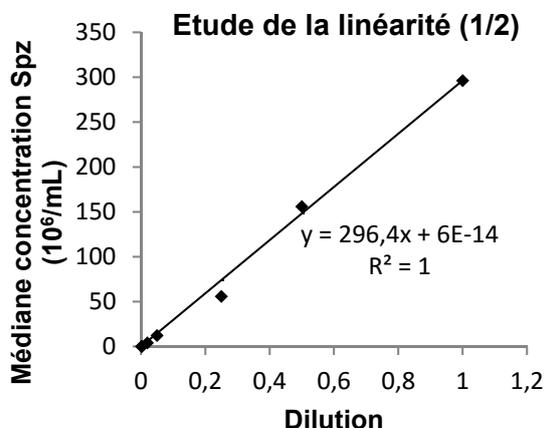
- Analyse des résultats globaux par régression linéaire (droite des moindres rectangles) avec une équation $y = 1.03x - 0.26$



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 [17, 19], 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 mentionne les critères de performance devant être réalisés dans le cadre d'une validation de méthode quantitative de portée B [14]. 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 [17]. 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 [17]. Enfin, la spécificité et la sensibilité sont non adaptées dans le cas d'une méthode quantitative.

4. CONCLUSION

Dans ce travail, d'emblée 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 valeur, diminuant donc fortement leur pertinence [21]. 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.

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 en cohérence avec le récent SH GTA 05 « Guide technique d'accréditation en biologie de la reproduction » [25]. Nos références que sont le manuel de l'OMS de 2010 [17] et le cahier de Bioforma [19] 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 spécialistes de l'AMP puisse déterminer des limites acceptables valables par technique. La rédaction d'un article d'assurance qualité appliqué en AMP à partir de ce travail est en cours de préparation. Enfin et surtout, ce travail a permis d'obtenir l'extension d'accréditation du Laboratoire du CHU d'Amiens concernant la ligne de portée SP1 le 18 Novembre 2016.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Charrat N. Editorial, la qualité un concept vieux comme le monde. Actualité. Biologie & santé. 2007, vol. 7, n°1.
2. Martinez F. Les principes généraux de la qualité. Accréditation et Qualité des soins hospitaliers [Internet]. 2001 [cité le 1 juin 2014]. Disponible sur: <http://www.hcspi.fr/hcspi/explore.cgi/ad351778.pdf>
3. Henri Fayol. Administration industrielle et générale. Dunod, 1916.
4. Siegel D. Le diagnostic stratégique et la gestion de la qualité. L'Harmattan, Paris, 2004.
5. Matthew A. Barsalou. Root Cause Analysis: A Step-By-Step Guide to Using the Right Tool at the Right Time. CRC Press, 9 janvier 2015, p. 17.
6. Lalande F, Laconde C, Yeni I. La biologie médicale libérale en France: bilan et perspectives [Internet]. Inspection générale des affaires sociales (IGAS), 2006 avr. Report No.: 2006 045. Disponible sur: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_IGAS_2006.pdf
7. La ministre de la santé, de la jeunesse et des sports. Lettre de mission à Michel BALLEREAU [Internet]. 2008. Disponible sur: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/lettre_de_mission_Michel_BALLEREAU.pdf
8. Ballereau M. Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale [Internet]. Paris, ministère de la Santé, de la Jeunesse, des Sports et de la Vie associative, 23 septembre 2008. Disponible sur: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_pour_la_biologie_medicale.pdf
9. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [Internet]. JORF n°0012 janv 15, 2010 p. 819. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&dateTexte=>

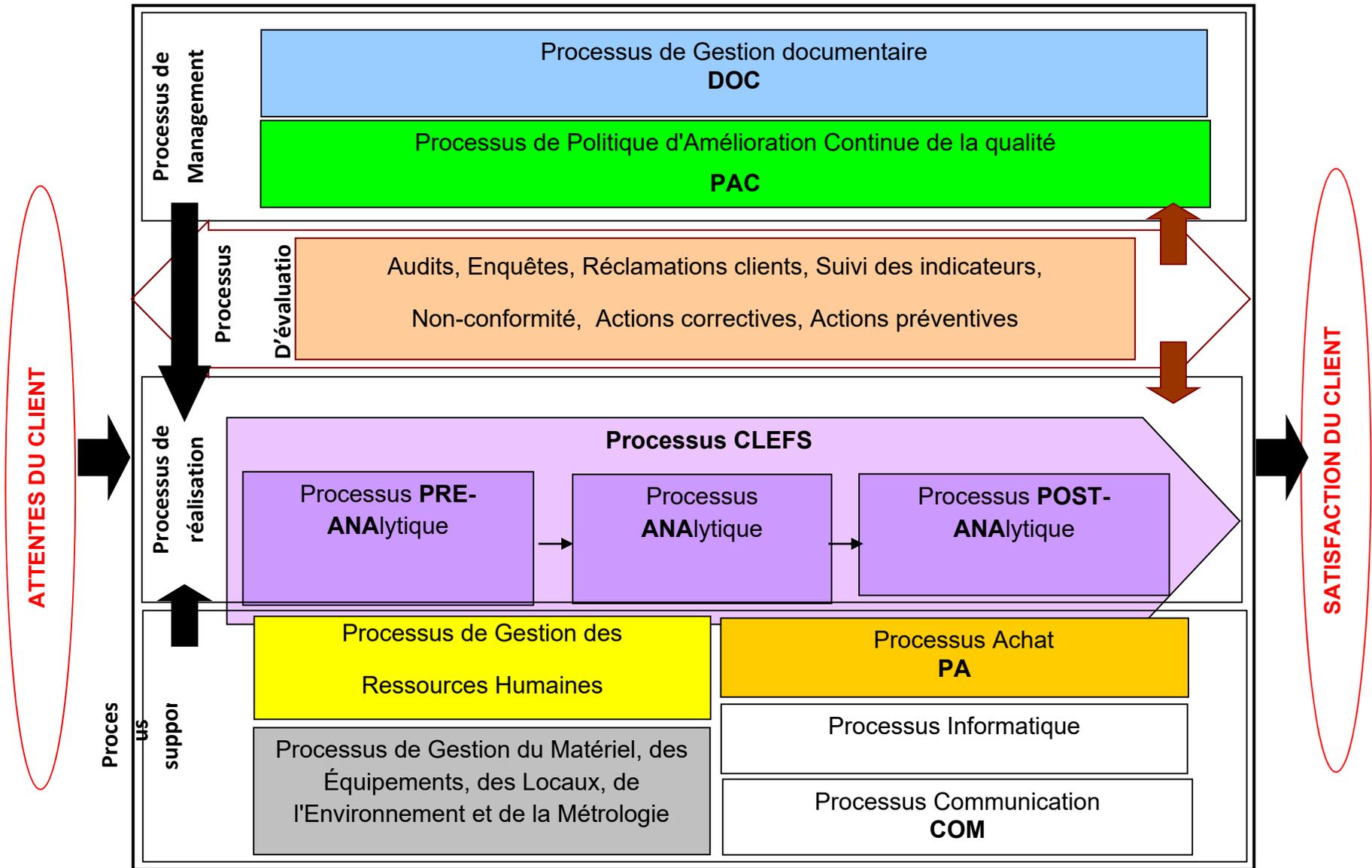
10. LOI n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant sur la réforme de la biologie médicale [Internet]. 2013- 442, JORF n°0124 mai 30, 2013 p. 8954. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027478077&dateTexte=&c ategorieLien=id>
11. NF EN ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR, 2012.
12. NF EN ISO 22870. Analyses de biologie délocalisées (ADBD) - Exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR, 2006.
13. SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale révision 05 [Internet]. COFRAC, 2013. Disponible sur : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>
14. SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale révision 01 [Internet]. COFRAC, 2011. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
15. SH INF 50. Portées-types d'accréditation révision 03 [Internet]. COFRAC, 2016. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-INF-50>
16. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl, 2000 Jan-Feb ; 21(1):145-53.
17. World Health Organization (WHO). Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen 5th edition. Cambridge University Press, UK, 2010.
18. SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation révision 04 [Internet]. COFRAC, 2010. Disponible sur : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
19. Cahier de formation biologie médicale n°42. Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin. Bioforma, 2009.

20. SH FORM 43. FICHE TYPE - Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale révision 01 [Internet]. COFRAC, 2015. Disponible sur : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-FORM-43>
21. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest, 1999, 59:491-500.
22. Guerrin JF, Lejeune H. Apport diagnostique démontré et effets négatifs éventuels des méthodes explorant les facteurs masculins de la fertilité. Contracept.Fertil.Sex, 1992.
23. Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Annales de Biologie Clinique, 1999, Volume 57, numéro 6.
24. SH GTA 14. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale révision 00 [Internet]. COFRAC, 2011. Disponible sur : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>
25. SH GTA 05. Guide technique d'accréditation en biologie de la reproduction révision 00 [Internet]. COFRAC, 2016. Disponible sur : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-05>

6. ANNEXES

Annexe I : Cartographie des processus	p.44
Annexe II : Lettre d'engagement Qualité de la direction du Laboratoire	p.45
Annexe III : Rapport d'évaluation lié à la validation de méthode du spermogramme	p.46
Annexe IV : Rapport d'expertise du sous-processus « concentration en spermatozoïdes »	p.47
Annexe V : Données de l'étude de la répétabilité	p.50
Annexe VI : Données de l'étude de la fidélité intermédiaire	p.52
Annexe VII : Données de la comparaison de méthode	p.52
Annexe VIII : Données de l'étude de linéarité	p.53
Annexe IX : Attestation d'accréditation	p.54

Annexe I



Annexe II

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, le chef de pôle "Femme, Couple, Enfant", responsable de secteurs du laboratoire en son 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 (ADBD) - Exigences concernant la qualité et la compétence.

Cet engagement dans les démarches d'accréditation s'est traduit par l'obtention des accréditations selon la norme NF EN ISO/CEI 17025, N° 1-2397, portée consultable sur www.cofrac.fr et selon la Norme NF EN ISO 15189, N° 8-3290, portée consultable sur www.cofrac.fr. 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.

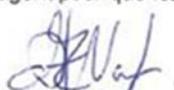
La direction du laboratoire et la direction générale s'engagent pour que les objectifs fixés soient atteints.



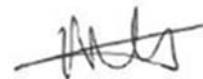
Dr C.C. ADJIDÉ
Responsable du
Laboratoire d'Hygiène



Dr A. VOYER
Pour les biologistes
RAQ adjointe



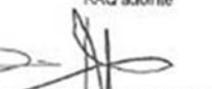
Dr V. ADJIDÉ
Responsable Assurance
Qualité



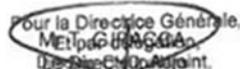
Dr B. ROUSSEL
Chef du Pôle Biologie Pharmacie
et Santé des Populations



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



Pr P. KRYSKOWIAK
Président de CME



Pour la Directrice Générale,
Mme K. BARRO
Directrice adjointe,
Direction Qualité



Mme K. BARRO
Directrice adjointe
Direction Qualité



Fabien PETIT

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"/>	
	Constat(s) : Les éléments de validation/vérification de méthode du spermogramme demandés en expertise n'ont pu être observés lors de l'évaluation. Conséquence avérée : Performances non évaluées Risque induit : Utilisation d'une méthode non vérifiée/validée			
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

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				

Annexe IX



Section Santé Humaine

Convention N° 5247

ATTESTATION D'ACCREDITATION ACCREDITATION CERTIFICATE

N° 8-3290 rév. 6

Le Comité Français d'Accréditation (Cofrac) atteste que :
The French Committee for Accreditation (Cofrac) certifies that :

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE AMIENS PICARDIE
1 Place Pauchet
80054 AMIENS CEDEX 1
SIREN N° 268000148

Satisfait aux exigences de la norme **NF EN ISO 15189 : 2012**
Fulfills the requirements of the standard

et aux règles d'application du Cofrac pour les activités d'examens/analyses en :
and Cofrac rules of application for the activities of examination/analysis in :

**BIOLOGIE MEDICALE / BIOCHIMIE - HEMATOLOGIE - IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE -
GENETIQUE - BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION**
*CLINICAL BIOLOGY / BIOCHEMISTRY - HEMATOLOGY - IMMUNOLOGY - MICROBIOLOGY -
GENETICS - REPRODUCTIVE BIOLOGY*

réalisées par / *performed by :*

CHU AMIENS PICARDIE

et précisément décrites dans l'annexe technique suivante.
and precisely described in the following technical annexes.

L'accréditation suivant la norme internationale homologuée NF EN ISO 15189 :2012 est la preuve de la compétence technique du laboratoire dans un domaine d'activités clairement défini et du bon fonctionnement dans ce laboratoire d'un système de management de la qualité adapté (cf. communiqué conjoint ISO/ILAC/IAF de janvier 2015)

Accreditation in accordance with the recognised international standard ISO, 15189 : 2012 demonstrates technical competence for a defined scope and the operation of a laboratory quality management system (re. Joint ILAC/ IAF/ISO Communiqué dated January 2015).

Le Cofrac est signataire de l'accord multilatéral d'EA pour l'accréditation pour les activités objets de la présente attestation.

Cofrac is signatory of the European co-operation for Accreditation (EA) Multilateral Agreement for accreditation for the activities covered by this certificate.

Date de prise d'effet / *granting date* : 18/11/2016

Date de fin de validité / *expiry date* : 31/10/2018

Pour le Directeur Général et par délégation
On behalf of the General Director

Le Responsable de l'Unité d'accréditation Est,
The Unit Accreditation Manager,

Benoît CARPENTIER

Implementation of quality control, management & assay (QC/QM/QA) according to the NF EN ISO 15189 standard for sperm analysis in the reproductive medicine and biology department of the university hospital of Amiens

Keywords: accreditation, assisted reproduction techniques, NF EN ISO 15189 standard, spermatology, spermogram

SUMMARY

The quality control and management is an old concept which was operative at first in industry before its application in medicine and particularly in medical biology. Initial accreditation of the laboratory of the university hospital of Amiens according to the NF international standard IN ISO 15189 was obtained on November 1st 2014. Concerning the department of assisted reproduction technologies, the Laboratory asked for the extension of its initial accreditation to sperm analysis. The evaluation by the COFRAC accreditation took place in February 2016 and was initially unsuccessful. The main objective of my work was to answer to the critical gap concerning the validation of spermogram method. This Thesis presents more specifically the validation of method of the spermatozoa concentration subprocess in ejaculated sperm, within quantitative method of B lineage.

Using SH GTA 04 document, we achieved a control of risks and determined, after bibliographical study, the method performance criteria according to their clinical relevance.

This study shows that our method is valid to measure spermatozoa concentration in ejaculated sperm and is validated for clinical use in our Laboratory. Evidences were provided to the COFRAC accreditation which allowed our Laboratory to obtain the extension of accreditation in reproductive biology department on November 18th, 2016.

Mise en place de la démarche qualité selon la norme NF EN ISO 15189 en spermologie diagnostique dans le service de médecine et biologie de la reproduction du CHU d'Amiens

Mots clés: accréditation, assistance médicale à la procréation, norme NF EN ISO 15189, spermologie, spermogramme

RESUME

La qualité est une notion ancienne qui s'est d'abord imposée en industrie avant d'intéresser le milieu de la santé et notamment la biologie médicale. L'accréditation initiale 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. En ce qui concerne le secteur d'assistance médicale à la procréation, le Laboratoire a demandé l'extension de cette accréditation initiale pour le spermogramme. La visite du COFRAC s'est déroulée en février 2016. L'objectif de mon travail a été de répondre à l'écart critique concernant la validation de méthode du spermogramme. Ce mémoire de thèse présente plus spécifiquement la validation de méthode du sous-processus concentration en spermatozoïdes, méthode quantitative de portée B.

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.

Cette étude montre 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 ont été fournies au COFRAC et nous ont permis d'obtenir l'extension de l'accréditation le 18 Novembre 2016.