

Précision sur le Guide sur l'examen et la préparation de sperme de l'OPTMQ

Suite à un questionnaire reçu à l'OPTMQ, nous désirons vous faire part de la précision suivante quant à la méthode présentée au point 13.4.5.2 du *Guide sur l'examen et la préparation de sperme de l'OPTMQ* :

Cette méthode de quantification pour confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie n'a pas pour but de déterminer avec précision la quantité de spermatozoïdes, mais plutôt de s'assurer que la recherche de rares spermatozoïdes est faite correctement pour déterminer s'il y a présence de spermatozoïdes mobiles et donner un estimé de la concentration au prescripteur lorsque celle-ci est inférieure à la limite de détection de la méthode de comptage à l'hématimètre.

Selon les lignes directrices de l'European Association of Urology et de l'American Urological Association, l'efficacité occlusive de la vasectomie est confirmée quand les deux conditions suivantes sont réunies : aucun spermatozoïde mobile n'est observé et la concentration de spermatozoïdes est égale ou inférieure à 100 000/ml ($0,1 \times 10^6$ /ml).

Le Comité des normes de la pratique de l'OPTMQ



*ORDRE PROFESSIONNEL DES
TECHNOLOGISTES MÉDICAUX
DU QUÉBEC*

GUIDE SUR L'EXAMEN ET LA PRÉPARATION DE SPERME





GUIDE SUR L'EXAMEN ET LA PRÉPARATION DE SPERME

Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec
281, avenue Laurier Est, Montréal (Québec) H2T 1G2
Tél. : 514-527-9811 **Sans frais** : 1-800-567-7763 Téléc. : 514-527-7314
Courriel : info@optmq.org Adresse Internet : www.optmq.org

ISBN : 978-2-9814023-6-3 (version imprimée)
ISBN : 978-2-9814023-7-0 (version PDF)
Dépôt légal - Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2016
Dépôt légal - Bibliothèque et Archives Canada, 2016

© 2016 Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec (OPTMQ).
Tous droits réservés. Toute reproduction ou utilisation du présent ouvrage est
autorisée avec mention de la source et avis à l'OPTMQ

AVANT-PROPOS

Afin de remplir son mandat qui est de protéger le public, l'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec (OPTMQ) encadre l'exercice de la profession d'une part, par la surveillance générale de celui-ci et d'autre part, par la formation de ses membres. L'OPTMQ s'assure que ses membres conservent leurs compétences et ont accès à des outils appropriés pour les guider dans l'exercice de leurs fonctions.

Les technologistes médicaux doivent posséder les compétences requises pour exercer leur profession. Ces compétences se traduisent par le savoir, le savoir-être, le savoir-faire et le savoir-agir. Pour le technologiste médical, le savoir-agir se manifeste notamment par la capacité d'analyser et d'évaluer le travail à faire, d'en établir l'importance et les priorités, de planifier son travail en conséquence et de prendre les décisions qui s'imposent au moment opportun. Bien que son rôle, sa participation et sa responsabilité varient d'un laboratoire à l'autre, le technologiste médical doit connaître les politiques et procédures en vigueur à son travail et s'y conformer. L'exercice du jugement professionnel suppose également la capacité d'appliquer les politiques et procédures établies avec toute la rigueur nécessaire ainsi que l'adaptabilité exigée par les circonstances.

Le document intitulé *Les normes de pratique du technologiste médical* énonce les compétences générales que doivent maîtriser les technologistes médicaux. Le présent guide précise les compétences relatives à l'examen du sperme, à la suite d'une vasectomie ou dans le cadre de l'évaluation de la fertilité, ainsi qu'à la préparation du sperme en vue d'un traitement de fertilité.

Ce guide vise à compléter les connaissances et à améliorer les pratiques des technologistes médicaux. Il collige les renseignements existants afin de renforcer les critères de qualité et de sécurité s'appliquant aux analyses du sperme et à sa préparation au laboratoire de biologie médicale, en vue d'accorder la primauté au bien-être et à la protection du patient et à l'amélioration de la qualité des services dispensés. Ce document rassemble les meilleures pratiques de base connues à ce jour, évaluées par les experts qui ont participé à son élaboration. Il a pour but de standardiser les spermogrammes dans tout le réseau de la santé et, en particulier, dans les centres qui n'ont pas de laboratoire spécialisé d'andrologie.

Cet ouvrage ne vise pas à créer de nouvelles obligations non prévues par la loi. Les renseignements qu'il contient ne sont pas exhaustifs et ne remplacent pas la réglementation en vigueur. Compte tenu de l'évolution rapide de la technologie, il fera l'objet de révisions et toute suggestion susceptible d'en améliorer le contenu sera accueillie avec intérêt.

Quand une référence citée dans le présent document n'est pas datée, c'est qu'elle renvoie à la plus récente édition du document. Les hyperliens figurant dans le texte étaient opérationnels quand ce guide a été imprimé. Il est à noter que le titre de « technologiste médical » est considéré invariable et qu'il désigne aussi bien les hommes que les femmes.

La mention d'un fournisseur, d'une entreprise, d'un produit ou d'un service dans ce guide ne signifie pas que l'OPTMQ se porte garant dudit fournisseur, entreprise, produit ou service; de même, le fait de ne pas mentionner un fournisseur, une entreprise, un produit ou un service ne doit pas être interprété comme un désaveu.

AVANT-PROPOS (suite)

Dans le présent document, le terme « laboratoire » désigne une entité qui comprend, entre autres, le personnel du laboratoire, les gestionnaires et la direction du laboratoire. Le terme « établissement » désigne tout lieu physique où se déroulent des activités de prélèvement, d'analyse ou de préparation de sperme, et englobe tous les types de laboratoires participant aux activités de procréation médicalement assistée, sauf ceux qui n'offrent que des services de troisième ligne.

Membres du groupe de travail sur l'examen et la préparation du sperme :

Francine Cloutier, T.M.

Coordonnatrice du laboratoire d'andrologie du CHUL, CHU de Québec - Université Laval

Nadia Giasson, T.M.

Service d'anatomopathologie et assurance qualité, Hôpital Charles-Le Moyne, CISSS de la Montérégie-Centre

Chantal Guilbert, T.M.

Coordonnatrice du laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR

Michel Labrecque, M.D., Ph.D., professeur titulaire

Département de médecine familiale et de médecine d'urgence, Université Laval

Julie Lecours

Technicienne de laboratoire, service de cytologie, Hôpital régional de Saint-Jérôme, CISSS des Laurentides

Philippe Lehouillier, M.D., FRCPC, médecin biochimiste

Laboratoire d'andrologie du CHUL, CHU de Québec - Université Laval

Mathieu Provençal, Ph.D., D.E.P.D., CSPQ, biochimiste clinique

Hôpital Maisonneuve-Rosemont, CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal

Ann Villeneuve, M.Sc., embryologiste

Anciennement service d'anatomopathologie du CHUS, CIUSSS de l'Estrie, maintenant CPA du CHU Sainte-Justine

Anne-Marie Martel, T.M., chargée de dossiers scientifiques

OPTMQ

Remerciements

L'OPTMQ souhaite remercier les réviseurs externes et les organismes qui ont participé à la révision et à la validation scientifique de l'ébauche de ce guide. Les conclusions et recommandations de ce guide ne reflètent pas forcément les opinions des réviseurs externes ou des autres personnes consultées.

Réviseurs externes

Mathieu Boilard, Ph.D.

Président, Nasci biologie médicale Inc.

Louise Caron, M.D.

Clinique Saint-Louis

Pascal Desrosiers, embryologiste

CPA, CHU Sainte-Justine

Marie-Josée Dufour, T.M.

Hôtel-Dieu de Lévis, CISSS de Chaudière-Appalaches

Sylvie Moulin, T.M.

Procréa Clinique / Groupe Opmédic

Chantal Paquin, T.M.

Centre hospitalier Hôtel-Dieu de Sorel, CISSS de la Montérégie-Est

Roland R. Tremblay, D.Sc., M.D., Ph.D.

Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval,
Axe reproduction, santé de la mère et de l'enfant

Luc Verreault, T.M.

Centre Hospitalier Régional Baie-Comeau, CISSS de la Côte Nord

Organismes consultés

Association canadienne de fertilité et d'andrologie / Canadian Fertility and Andrology Society (CSAF)

David Mortimer, Ph.D.

Association des cytologistes du Québec (ACQ)

Chantal Sévigny, T.M., présidente

Association des médecins biochimistes du Québec (AMBQ)

Jean Bergeron, M.D., FRCPC, médecin biochimiste

Association paritaire pour la santé et la sécurité du travail du secteur affaires sociales (ASSTSAS)

Sylvain LeQuoc

Collège des médecins du Québec (CMQ)

Pauline Gref, M.D., et les membres du Comité d'élaboration du guide d'exercice sur la procréation médicalement assistée du CMQ

Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS)

Michel Lebrun, MBA, Ph.D., et Mélanie Martin, Ph.D.

Ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS)

Direction de la biovigilance et de la biologie médicale

Jasmine Perron

Abréviations et acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique

ASSTSAS : Association paritaire pour la santé et la sécurité du travail du secteur affaires sociales

AUA : *American Urological Association* (association américaine d'urologie)

CAN/CSA : Association canadienne de normalisation /Canadian Standards Association

CASA : système informatisé d'analyse de sperme (*Computer Assisted Semen Analysis*)

CHUL : Centre hospitalier de l'Université Laval

CHUM : Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CHUS : Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

CISSS : Centre intégré de santé et de services sociaux

CIUSSS : Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux

CO₂ : dioxyde de carbone

CPA : centre de procréation assistée

CSSS : Centre de santé et de services sociaux

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais, ROS : *reactive oxygen species*)

EAU : *European Association of Urology* (association européenne d'urologie)

EBSS : solution saline équilibrée de Earle (en anglais, *Earle's balanced salt solution*)

ESHRE : *European Society of Human Reproduction and Embryology* (société européenne de reproduction humaine et d'embryologie)

FIV : fécondation *in vitro*

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HPF : champ à fort grossissement (*High Power Field*)

IICS : injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde

IIU : insémination intra-utérine

IM : spermatozoïde immobile (de l'anglais *immotile*)

ISO : Organisation internationale de normalisation (*International Organization for Standardization*)

OMS : Organisation mondiale de la Santé (en anglais, WHO : *World Health Organization*)

OPTMQ : Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec

PMA : procréation médicalement assistée

PR : spermatozoïde progressif (de l'anglais *progressive*)

NP : spermatozoïde non progressif (de l'anglais *non-progressive*)

RPM : rotations par minute

RTMD : *Règlement sur le transport des marchandises dangereuses*

T.M.: technologiste médical

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	III
REMERCIEMENTS	V
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	VII
1.0 INTRODUCTION	1
2.0 DOMAINE D'APPLICATION	1
3.0 DÉFINITIONS	2
4.0 SYSTÈME DE GESTION DE LA QUALITÉ	6
5.0 MESURES DE SÉCURITÉ	6
5.1 AGENTS PATHOGÈNES	7
5.2 ERGONOMIE	7
6.0 PERSONNEL	8
7.0 MATÉRIEL DIDACTIQUE ET DE RÉFÉRENCE	8
8.0 LOCAUX ET CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	8
8.1 LOCAUX DESTINÉS À LA COLLECTE DES ÉCHANTILLONS	9
9.0 GESTION DE LA DOCUMENTATION	10
10.0 EXIGENCES DU PROCESSUS PRÉANALYTIQUE	10
10.1 ORDONNANCE	11
10.2 INSTRUCTIONS RELATIVES À LA COLLECTE	11
10.3 COLLECTE DE L'ÉCHANTILLON	11
10.3.1 Échantillon produit dans l'établissement	12
10.3.2 Échantillon produit à domicile	12
10.4 IDENTIFICATION DE L'ÉCHANTILLON	13
10.5 CONSERVATION DE L'ÉCHANTILLON ENTRE LA COLLECTE ET LA RÉCEPTION	13
10.6 TRANSPORT DE L'ÉCHANTILLON	14
10.7 RÉCEPTION DES ÉCHANTILLONS	14
10.7.1 Questionnaire préanalytique	15
10.7.2 Critères de conformité des échantillons	15
10.8 DÉLAIS D'EXÉCUTION DES ANALYSES	16
10.9 PRÉPARATION PARTICULIÈRE EN CAS D'ÉJACULATION RÉTROGRADE	17
10.9.1 Instructions fournies au patient	17
10.9.2 Instructions à l'intention du laboratoire et du personnel à la réception des échantillons	18
11.0 EXIGENCES DU PROCESSUS ANALYTIQUE	19
11.1 MATÉRIEL DE LABORATOIRE	19
11.1.1 Instrumentation et équipement	19
11.1.1.1 Microscope	20
11.1.1.2 Balance	20
11.1.1.3 Centrifugeuse	20
11.1.1.4 Chambre de comptage	21
11.1.1.5 Dispositif de conservation de chaleur	21
11.1.1.6 Compteur	21
11.1.1.7 Pipette	21
11.1.1.8 Lame et lamelle	21
11.1.1.9 Bandelette indicatrice de pH	21
11.1.1.10 Contrôles de qualité commerciaux	22
11.1.1.11 Équipement spécialisé	22
11.2 ENTRETIEN PRÉVENTIF	25
11.3 PROGRAMME D'ASSURANCE QUALITÉ	25
11.3.1 Contrôle interne de la qualité	25
11.3.2 Contrôle externe de la qualité	25

12.0 EXAMEN DU SPERME VISANT L'ÉVALUATION DE LA FERTILITÉ.....	27
12.1 HOMOGÉNÉISATION DE L'ÉJACULAT EN VUE DE SON EXAMEN.....	28
12.1.1 Rotation du récipient.....	28
12.1.2 Homogénéisation à la pipette	28
12.2 EXAMEN MACROSCOPIQUE.....	28
12.2.1 Aspect	28
12.2.2 Viscosité	29
12.2.3 Volume	29
12.2.4 pH.....	30
12.3 EXAMEN MICROSCOPIQUE.....	30
12.3.1 Sperme à l'état frais (préparation de la lame).....	30
12.3.2 Liquéfaction.....	31
12.3.3 Éléments observables dans le sperme à l'état frais.....	33
12.3.3.1 Agrégation non spécifique.....	33
12.3.3.2 Agglutination.....	33
12.3.3.3 Cellules rondes	33
12.3.3.4 Érythrocytes.....	35
12.3.3.5 Autres éléments cellulaires ou particuliers	35
12.3.4 Évaluation de la motilité	36
12.3.4.1 Préparation et examen des échantillons.....	36
12.3.4.2 Catégories de mouvement	38
12.3.4.3 Dénombrement des spermatozoïdes par catégorie.....	38
12.3.4.4 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesure entre les échantillons.....	39
12.3.4.5 Valeurs de référence	39
12.3.5 Vitalité.....	40
12.3.5.1 Préparation et examen des échantillons.....	40
12.3.5.2 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons	41
12.3.5.3 Valeurs de référence	41
12.3.6 Évaluation manuelle de la concentration et du nombre de spermatozoïdes.....	42
12.3.6.1 Hématimètre de Neubauer	42
12.3.6.2 Choix de la dilution appropriée à l'évaluation de la concentration sur l'hématimètre de Neubauer.....	44
12.3.6.3 Homogénéisation et dilution de l'éjaculat.....	45
12.3.6.4 Montage de l'hématimètre et sédimentation des spermatozoïdes	46
12.3.6.5 Comptage des spermatozoïdes dans chacun des échantillons préparés	46
12.3.6.6 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons	49
12.3.6.7 Calcul de la concentration.....	49
12.3.6.8 Limite de détection	50
12.3.6.9 Calcul de la valeur absolue.....	51
12.3.6.10 Valeurs de référence	51
12.3.6.11 Manipulations additionnelles.....	51
12.3.6.12 Entretien de l'hématimètre	52
12.3.7 Évaluation de la concentration des spermatozoïdes avec un système CASA	52
12.3.8 Évaluation de la morphologie (spermocytogramme).....	53
12.3.8.1 Préparation du frottis en vue de l'évaluation morphologique.....	53
12.3.8.2 Coloration du frottis.....	53
12.3.8.3 Évaluation morphologique des spermatozoïdes.....	54
12.3.8.4 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons	56
12.3.8.5 Différenciation des cellules rondes sur lame colorée.....	57
12.3.8.6 Valeurs de référence	57

13.0 CONFIRMATION DU SUCCÈS OU DE L'ÉCHEC DE LA VASECTOMIE.....	58
13.1 DÉLAI RECOMMANDÉ ENTRE LA VASECTOMIE ET LA RÉALISATION DE L'EXAMEN DU SPERME	58
13.2 TRAITEMENT DE L'ÉJACULAT EN VUE DE L'EXAMEN POST-VASECTOMIE	58
13.3 EXAMEN MACROSCOPIQUE.....	59
13.4 EXAMEN MICROSCOPIQUE	59
13.4.1 Sperme à l'état frais (préparation de la lame).....	59
13.4.2 Liquéfaction et homogénéité de l'éjaculat.....	59
13.4.3 Examen initial de l'éjaculat à l'état frais.....	60
13.4.3.1 Érythrocytes.....	60
13.4.3.2 Cellules rondes	61
13.4.4 Évaluation de la motilité	62
13.4.5 Évaluation de la concentration	63
13.4.5.1 Absence de spermatozoïdes dans le sperme frais.....	63
13.4.5.2 Moins de 500 spermatozoïdes dans le sperme frais	63
13.4.5.3 Au moins 500 spermatozoïdes dans le sperme frais	64
13.4.6 Valeurs de référence	64
14.0 PRÉPARATION DE SPERME EN VUE DE L'INSÉMINATION.....	65
14.1 PRÉCAUTIONS	66
14.2 ÉVALUATION MACROSCOPIQUE SOMMAIRE	67
14.2.1 Liquéfaction	67
14.2.2 Volume et viscosité.....	67
14.3 ÉVALUATION MICROSCOPIQUE.....	68
14.3.1 Sperme à l'état frais.....	68
14.3.2 Évaluation de la motilité	68
14.3.3 Estimation de la concentration.....	68
14.4 MÉTHODE DES GRADIENTS DE DENSITÉ.....	68
14.4.1 Préparation des solutions de travail	69
14.4.2 Préparation du tube de gradient	70
14.4.3 Évaluation après la séparation	72
14.4.4 Validation de la méthode.....	74
14.5 MÉTHODE DU SIMPLE LAVAGE	75
14.6 MÉTHODE DE LA MIGRATION ASCENDANTE (<i>SWIM-UP</i>)	75
15.0 EXIGENCES DU PROCESSUS POSTANALYTIQUE	75
15.1 FORMAT DU RAPPORT	75
15.2 VALEURS DE RÉFÉRENCE	77
15.3 CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS ET DES RAPPORTS D'ANALYSE.....	78
15.4 ÉLIMINATION DES ÉCHANTILLONS.....	78
ANNEXE 1 EXEMPLE D'INSTRUCTIONS	79
ANNEXE 2 MESURES VISANT À METTRE LE PATIENT À L'AISE ET À PRÉSERVER SON INTIMITÉ	80
ANNEXE 3 EXEMPLE DE RAPPORT D'ÉVALUATION DE LA FERTILITÉ (SPERMOGRAMME)	81
ANNEXE 4 AIDE-MÉMOIRE : EXAMEN MACROSCOPIQUE DE L'ÉJACULAT	82
ANNEXE 5 AIDE-MÉMOIRE : EXAMEN MICROSCOPIQUE VISANT L'ÉVALUATION DE LA FERTILITÉ.....	83
ANNEXE 6 ESTIMÉ DE LA CONCENTRATION DES CELLULES RONDES PAR CHAMP DANS 10 µL DE SPERME	84
ANNEXE 7 CALCUL ESTIMATIF DU NOMBRE DE CELLULES RONDES PAR ML, SELON LE FACTEUR DE GROSSISSEMENT.....	86
ANNEXE 8 TABLEAUX DES ÉCARTS ACCEPTABLES ENTRE ÉCHANTILLONS ...	88

ANNEXE 9 PROTOCOLE DE COLORATION À L'ÉOSINE-NIGROSINE EN VUE DE L'ÉVALUATION DE LA VITALITÉ.....	91
ANNEXE 10 ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DU SPERMATOZOÏDE.....	92
ANNEXE 11 EXEMPLE DE RAPPORT DE CONFIRMATION DU SUCCÈS OU DE L'ÉCHEC DE LA VASECTOMIE	96
ANNEXE 12 AIDE-MÉMOIRE : EXAMEN MICROSCOPIQUE DU SPERME EN VUE DE CONFIRMER LE SUCCÈS OU L'ÉCHEC DE LA VASECTOMIE.....	97
ANNEXE 13 ALGORITHME D'INTERPRÉTATION DU SPERMOGRAMME POST- VASECTOMIE À L'INTENTION DU MÉDECIN	98
ANNEXE 14 AIDE-MÉMOIRE : PRÉPARATION DU SPERME EN VUE DE L'INSÉMINATION SELON LA MÉTHODE DES GRADIENTS DE DENSITÉ	100
ANNEXE 15 EXEMPLE DE RAPPORT DE PRÉPARATION DE SPERME	101
BIBLIOGRAPHIE.....	102
COMMENTAIRES.....	107

1.0 Introduction

Le spermogramme désigne l'examen qualitatif et quantitatif du sperme et des spermatozoïdes pratiqué dans le cadre des analyses de biologie médicale. Au sens strict, le spermogramme est le rapport de l'examen complet du sperme et, par extension, cet examen même. Il permet de préciser différents paramètres, dont les principaux indicateurs de la fertilité masculine : le nombre, la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. La réalisation du spermogramme est ordonnée essentiellement dans les contextes cliniques suivants : évaluation de la fertilité et confirmation du succès ou de l'échec de la vasectomie. La justesse et la précision de l'information figurant sur les rapports d'analyse dépendent du soin apporté aux processus préanalytiques, analytiques et postanalytiques.

L'insémination intra-utérine est une technique d'intervention souvent pratiquée utilisée dans le cadre de la procréation médicalement assistée (PMA). Les étapes de préparation du sperme en vue d'une insémination visent à optimiser la qualité et l'innocuité de l'échantillon qui sera utilisé.

Le présent guide a pour objet de standardiser les processus liés à la réalisation du spermogramme et à la préparation du sperme destiné à l'insémination dans l'ensemble des laboratoires du Québec, privés et publics, dans le but ultime de servir les intérêts du couple et de l'homme. Il a été rédigé à la suite d'une revue de la littérature existante et s'appuie sur l'expérience des membres du groupe de travail. Pour les laboratoires offrant des services spécialisés de fertilité, des exigences de qualité supplémentaires peuvent s'appliquer. Les laboratoires ont la responsabilité de suivre les exigences de qualité appropriées aux services de laboratoire qu'ils fournissent, même si ceux-ci ne sont pas inclus dans le présent guide.

2.0 Domaine d'application

Le présent guide traite des analyses de sperme visant à évaluer la fertilité ou à confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie. Comme l'évaluation du succès de la vasovasostomie comprend les mêmes analyses que celle de la fertilité, ces deux types d'examens seront traités sans distinction dans ce document.

Ce guide présente uniquement les activités de laboratoires offrant des services de première et de deuxième lignes, incluant les méthodes de lavage du sperme et de PMA ainsi que les analyses associées à ces méthodes.

D'autres méthodes comme le dosage du fructose, la recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN ne sont pas abordées dans ce guide, pas plus que les manipulations effectuées exclusivement dans les laboratoires offrant des services de troisième ligne.

La manipulation et l'analyse d'un échantillon à risque de contamination devant être réalisées en milieu spécialisé, ces techniques ne seront pas abordées dans le présent guide.

3.0 Définitions

Note : Bien que plusieurs laboratoires au Québec expriment la concentration des spermatozoïdes en milliards par litre de sperme ($\times 10^9/L$), le groupe d'experts de l'OPTMQ recommande d'exprimer ces résultats en millions par millilitre ($\times 10^6/ml$) afin de mieux rendre compte du volume de sperme éjaculé et d'utiliser les mêmes unités que l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et d'autres références reconnues ^{(1) (2) (3) (4) (5)}.

Termes propres à l'examen et à la préparation du sperme	
Abstinence sexuelle	Correspond au nombre de jours (ou d'heures) sans éjaculation.
Agglutination	Amas de spermatozoïdes mobiles liés les uns aux autres par la tête, le cou et/ou le flagelle. ⁽¹⁾ .
Agrégation	Amas de spermatozoïdes immobiles ou de l'agglomération de spermatozoïdes mobiles à des filets de mucus, des débris ou d'autres types de cellules ⁽¹⁾ .
Asthénozoospermie	Motilité des spermatozoïdes, sous la limite inférieure de référence ⁽¹⁾ .
Azoospermie	Absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat ⁽¹⁾ .
Concentration	Nombre de spermatozoïdes dans un millilitre d'éjaculat, exprimé en millions (nombre $\times 10^6/ml$).
Efficacité occlusive	Efficacité de la vasectomie à empêcher le passage des spermatozoïdes dans les canaux déférents.
Éjaculat	Échantillon de sperme obtenu à la suite d'une éjaculation ⁽⁶⁾ .
Fécondation <i>in vitro</i> (FIV)	Fusion de l'ovule et du spermatozoïde que l'on réalise en dehors du corps, au laboratoire ⁽⁶⁾ .
HPF	(<i>High Power Field</i>) Champ à fort grossissement. Dans le cadre de la microscopie, mesure qui fait référence à la superficie visible sous objectif 20x ou 40x, correspondant à un facteur de grossissement total de 200 ou de 400.
Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (IICS)	Introduction mécanique d'un spermatozoïde dans l'ovule.
Insémination intra-utérine (IIU)	Technique de transfert d'une préparation de spermatozoïdes dans la cavité utérine.

Leucospermie	Présence dans l'éjaculat de leucocytes en quantité supérieure à la valeur seuil ⁽¹⁾ .
Motilité	Aptitude à effectuer des mouvements spontanés ou réactionnels, constituant un des caractères du vivant ⁽⁷⁾ . Le terme mobilité n'a pas été utilisé, car il désigne la capacité d'un spermatozoïde à se déplacer, ce qui est différent de la motilité. Par exemple, un spermatozoïde non progressif exhibe de la motilité sans exhiber de la mobilité.
Motilité totale	Somme de la motilité progressive et non progressive des spermatozoïdes.
Oligozoospermie	Concentration ou valeur absolue des spermatozoïdes sous la limite inférieure de référence ⁽¹⁾ .
Procréation médicalement assistée (PMA)	Ensemble des techniques médicales visant à faciliter la procréation en dehors du processus naturel ⁽⁶⁾ .
Services de première ligne	Analyses de base, incluant la réalisation de spermogrammes.
Services de deuxième ligne	Services spécialisés qui incluent la préparation du sperme en vue des traitements de fertilité.
Services de troisième ligne	Services spécialisés qui incluent les manipulations de l'ovule et des spermatozoïdes dans un laboratoire d'embryologie (p. ex., FIV et IICS).
Spermogramme	Résultat de l'examen du sperme permettant l'évaluation de la fertilité masculine ou la confirmation du succès ou de l'échec de la vasectomie, et par extension, cet examen même.
Spermatozoïdes immobiles (IM)	Spermatozoïdes qui ne bougent pas ⁽¹⁾ .
Spermatozoïdes mobiles	Spermatozoïdes qui se déplacent (progressifs).
Spermatozoïdes non progressifs (NP)	Spermatozoïdes qui bougent, mais dont les mouvements ne permettent pas le déplacement (petits cercles, faibles battements déplaçant à peine la tête, battements de flagelle seulement) ⁽¹⁾ .
Spermatozoïdes progressifs (PR)	Spermatozoïdes qui se déplacent en ligne droite, en zigzag ou en formant de grands cercles, peu importe leur vitesse ⁽¹⁾ .

Tératozoospermie	Pourcentage des spermatozoïdes de morphologie normale sous la limite inférieure de référence ⁽¹⁾ .
Valeur absolue de spermatozoïdes	Nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat complet, obtenu par multiplication de la concentration des spermatozoïdes par le volume d'éjaculat ⁽¹⁾ . Synonyme de <i>nombre total par éjaculat</i> .
Vasectomie	Occlusion des canaux déférents dans le but d'empêcher le passage des spermatozoïdes dans l'éjaculat.
Vasovasostomie	Intervention chirurgicale qui consiste à relier les canaux déférents sectionnés par vasectomie afin de rétablir le passage des spermatozoïdes dans l'éjaculat.
Vitalité	Propriété d'un spermatozoïde qui est vivant.
Définitions générales	
Procédure	Documentation et instructions techniques expliquant toutes les étapes à suivre. Les expressions <i>procédure opératoire normalisée</i> (PON) et <i>procédure documentée</i> peuvent également être utilisées.
Processus	« Ensemble d'activités corrélées ou en interaction qui utilise des éléments d'entrée pour produire un résultat escompté. » ⁽⁸⁾ ISO 9000 :2015, 3.4.1.
Processus préanalytique	Série d'étapes débutant par l'ordonnance médicale, comprenant par la suite la préparation du patient, le prélèvement, la stabilisation, l'acheminement et la réception de l'échantillon au laboratoire, et se terminant avec le début du processus analytique ⁽⁹⁾ .
Processus analytique	Série d'étapes qui comprennent l'analyse et la transformation de l'échantillon aux fins de mesures particulières.
Processus postanalytique	Série d'étapes qui suivent l'analyse et comprennent la revue systématique, la mise en forme, l'interprétation, la validation, la transmission et l'archivage du rapport, ainsi que l'entreposage des échantillons biologiques examinés ⁽⁹⁾ .

Qualité	Degré d'excellence ou mesure dans laquelle un laboratoire répond aux besoins et aux attentes des clients tout en respectant les normes généralement reconnues ⁽¹⁰⁾ .
Système de gestion de la qualité	Ensemble des activités de planification, de direction, de contrôle et d'assurance de la qualité destinées à assurer ou à maintenir la qualité.
Traçabilité	Aptitude à retrouver l'historique, la mise en œuvre ou l'emplacement de ce qui est examiné ⁽⁸⁾ .
Validation	« Confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévues ont été satisfaites. » ⁽⁸⁾ ISO 9000 :2015, 3.8.13.
Vérification	« Confirmation par des preuves objectives que les exigences spécifiées ont été satisfaites. » ⁽⁸⁾ ISO 9000 :2015, 3.8.12.
Signification des termes « doit », « devrait » et « peut »	
Doit :	Dans le présent document, le verbe <i>devoir</i> à l'indicatif désigne l'obligation de respecter ou d'appliquer les exigences prescrites, soit parce qu'elles sont exigées par la réglementation en vigueur ou parce qu'elles ont trait à une compétence que doit posséder le technologiste médical. L'expression <i>il faut</i> a le même sens.
Devrait :	Dans le présent document, le verbe <i>devoir</i> au conditionnel signifie que l'énoncé s'appuie sur des faits scientifiques et qu'il est recommandé de le respecter ou de l'appliquer. L'expression <i>il faudrait</i> a le même sens.
Peut :	Dans le présent document, le verbe <i>pouvoir</i> signifie que l'énoncé est considéré comme valable et que son application est souhaitable.

4.0 Système de gestion de la qualité

Depuis 2005, le ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec oblige tous les laboratoires de biologie médicale à solliciter l'agrément de leurs services auprès d'un organisme d'accréditation reconnu⁽¹¹⁾. L'organisme d'accréditation se base sur diverses normes reconnues, dont la norme ISO 15189 : *Laboratoire d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence*⁽⁹⁾ ⁽¹²⁾.

La *Loi sur les activités cliniques et de recherche en matière de procréation assistée* exige quant à elle que tout centre de procréation assistée obtienne et conserve un agrément de ses activités de procréation assistée auprès d'un organisme d'agrément reconnu⁽¹³⁾.

Ce guide présente certaines exigences tirées de la norme ISO 15189 afin d'informer le lecteur des points applicables aux analyses de sperme. Toutefois, il n'entend pas être une interprétation de cette norme; pour en savoir plus, le lecteur doit se référer à la dernière édition de la norme ainsi qu'à toute exigence du processus d'agrément des laboratoires.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire met en place un système de gestion de la qualité afin d'assurer la qualité de tous les processus préanalytiques, analytiques et postanalytiques. Ce système couvre toutes les étapes du processus, de l'ordonnance médicale de l'analyse à l'acheminement et à l'archivage du rapport d'analyse. Le système de gestion de la qualité inclut la mise en place de mesures de contrôle qui comprennent, entre autres, la gestion des cas non conformes, des incidents et des accidents, des mesures correctives et préventives, des indicateurs de qualité, des audits et des achats⁽⁹⁾.

Pour se renseigner davantage sur les systèmes de gestion de la qualité, consulter les documents suivants :

- ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO 15189 (F) Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence*⁽⁹⁾;
- ORDRE PROFESSIONNEL DES TECHNOLOGISTES MÉDICAUX DU QUÉBEC. *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale*⁽¹⁴⁾.

5.0 Mesures de sécurité

La *Loi sur la santé et la sécurité du travail* établit des exigences de sécurité pour l'employeur et le travailleur⁽¹⁵⁾. Cette Loi traite de sujets tels que la formation exigée en matière de santé et de sécurité et l'information que l'employeur doit mettre à la disposition du personnel. Il incombe au technologiste médical de prendre connaissance du programme de prévention qui le concerne et de tous renseignements transmis par l'employeur, et de participer aux activités de formations qui lui sont offertes⁽¹⁶⁾.

Le technologiste médical doit exercer sa profession de façon sécuritaire. Il doit adopter les mesures nécessaires pour assurer sa protection et celle des autres, et il doit utiliser le matériel et les équipements de façon sécuritaire⁽¹⁶⁾.

Pour se renseigner davantage sur les mesures de sécurité à respecter au laboratoire de biologie médicale, consulter les documents suivants :

- *Loi sur la santé et la sécurité du travail*⁽¹⁵⁾;
- *Règlement sur la santé et la sécurité du travail*⁽¹⁷⁾;
- *La sécurité au laboratoire - Directives de la SCSLM*, septième édition, 2012⁽¹⁸⁾;
- *CAN/CSA-Z15190-05 Medical laboratories - Requirements for safety (Laboratoires de médecine - Exigences pour la sécurité)*, 2005⁽¹⁹⁾;
- AGENCE DE LA SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA, *Norme canadienne sur la biosécurité*⁽²⁰⁾.
- AGENCE DE LA SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA, *Guide canadien sur la biosécurité*⁽²¹⁾.

5.1 Agents pathogènes

Certains agents pathogènes comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les virus de l'hépatite B (VHB) et C (VHC) peuvent se trouver dans des échantillons de sperme. Ces échantillons doivent donc être considérés comme potentiellement infectieux. Il faut respecter les précautions normales (qui englobent les précautions universelles) lors de la manipulation de ces échantillons^{(1) (18)}. Il peut être nécessaire de prendre des précautions additionnelles avec les échantillons de sperme destinés à l'insémination (voir le point 14.1).

5.2 Ergonomie

Il faudrait évaluer les exigences physiques (p. ex., postures contraignantes, mouvements répétitifs) et cognitives (p. ex., surcharge de travail) des différentes tâches afin d'apporter, le cas échéant, les correctifs jugés nécessaires. Les considérations d'ordre ergonomique devraient faire partie de la politique d'achat du matériel. La conception physique de l'environnement de travail exige que l'on s'attarde aux différences de taille (hauteur) des divers employés susceptibles d'y travailler. L'acquisition d'équipement et d'appareils réglables peut être une option intéressante.

L'Association paritaire pour la santé et la sécurité du travail du secteur affaires sociales (ASSTSAS) a créé des fiches techniques pour le travail au microscope et le pipetage qui peuvent être consultées à l'adresse suivante^{(22) (23)} : <http://www.asstsas.qc.ca/dossiers-thematiques/amenagement-ergonomie/laboratoire-de-biologie-medical-prelevements/les-fiches-laboratoires.html>.

6.0 Personnel

Comme le prescrit la norme ISO 15189, la direction du laboratoire s'assure de la présence d'un nombre suffisant de personnes ayant la formation et la compétence nécessaires pour fournir des services de laboratoire qui permettent de traiter les échantillons de sperme dans les délais prescrits, en tenant compte des exigences liées à la nature de ce type de prélèvement pour assurer la qualité des résultats et de la préparation du sperme ⁽⁹⁾. L'attribution des tâches dans le laboratoire doit être conforme à la réglementation en vigueur.

La lecture du présent guide ne peut pas se substituer à la formation pratique, qui est essentielle à la bonne exécution des activités qui y sont décrites. La consultation d'ouvrages de référence est une des démarches nécessaires à la formation et à la préparation de documents normatifs.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, un programme de formation continue doit permettre d'assurer le maintien des compétences du personnel travaillant au laboratoire ⁽⁹⁾. Pour se renseigner davantage sur les programmes de formation et l'évaluation des compétences, consulter le document de l'OPTMQ intitulé *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale* ⁽¹⁴⁾.

Les établissements peuvent consulter les ressources suivantes pour déterminer le contenu de leur programme de formation continue et l'évaluation des compétences dans ce secteur d'activité :

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Training and Competence Assessment; Approved Guideline*, QMS03 ⁽²⁴⁾.
- CANADIAN FERTILITY AND ANDROLOGY SOCIETY. *Guidelines for the Evaluation and Development of competencies for ART Laboratory Professionals* ⁽²⁵⁾.

7.0 Matériel didactique et de référence

En vue d'accomplir son travail quotidien ainsi qu'aux fins d'orientation et de formation continue, le personnel devrait avoir accès sur place au matériel nécessaire à l'exercice de ses fonctions, entre autres ⁽⁵⁾:

- ouvrages de référence récents;
- procédures établies au laboratoire;
- lames témoin, planches ou images numérisées;
- toute autre source d'information pertinente.

8.0 Locaux et conditions environnementales

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire s'assure que l'espace réservé à l'exécution de ses activités est suffisant et adéquat, afin de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité des prestations offertes aux utilisateurs, ainsi que la santé et la sécurité du personnel du laboratoire, des patients et des visiteurs ⁽⁹⁾.

Il faut prévoir l'espace et des conditions d'entreposage adaptés afin d'assurer l'intégrité permanente des échantillons, des documents, des équipements, des réactifs, des consommables, des enregistrements, des résultats et d'autres éléments susceptibles d'influer sur la qualité des résultats d'analyse. Il faut entreposer les échantillons et matériaux biologiques utilisés dans les processus analytiques de manière à éviter toute contamination croisée ⁽⁹⁾.

Le laboratoire doit surveiller, contrôler et enregistrer les conditions propres à l'environnement conformément aux spécifications correspondantes ou au cas où ces conditions seraient susceptibles d'influer sur la qualité des échantillons, des résultats ou encore sur la santé du personnel. Il faut faire attention à des facteurs comme les niveaux d'éclairement, la stérilité, la poussière, les fumées nocives ou dangereuses, les radiations, l'humidité, l'alimentation électrique, la température, les niveaux de bruit et de vibration et la logistique de travail, si ces facteurs visent les activités concernées, pour éviter d'invalider les résultats ou de nuire aux exigences de fiabilité des examens et de la préparation du sperme ⁽⁹⁾.

8.1 Locaux destinés à la collecte des échantillons

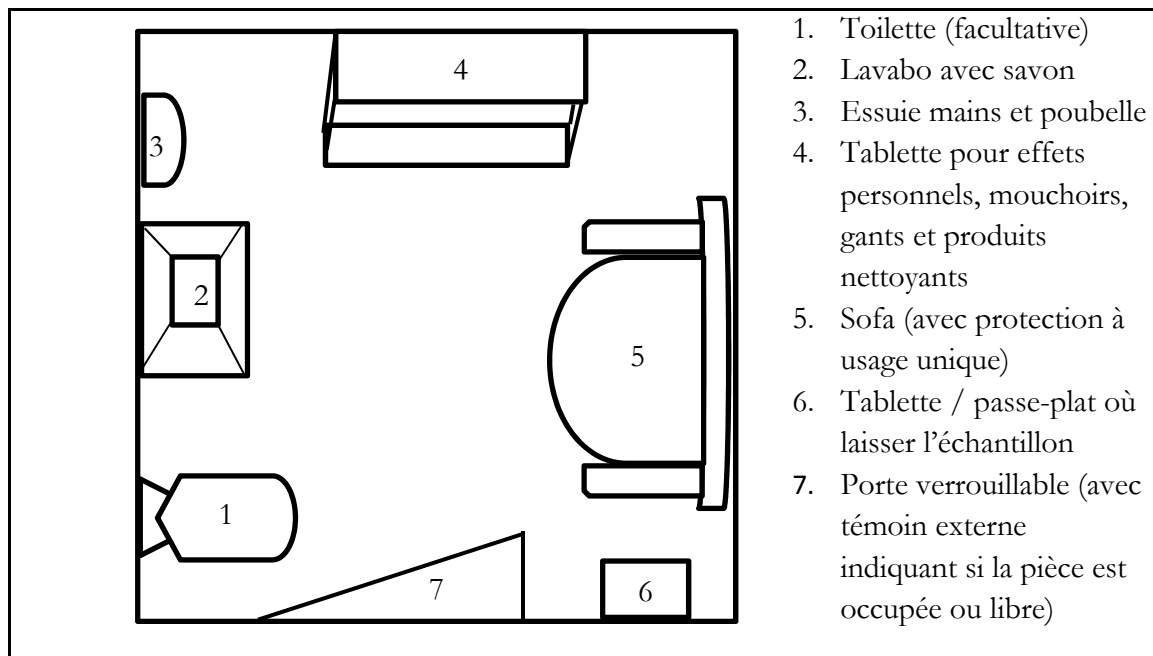
Des locaux privés devraient être mis à la disposition des patients devant recueillir leur éjaculat au centre de prélèvement ou au laboratoire ⁽¹⁾. Comme le prescrit la norme ISO 15189, les locaux où sont effectués les prélèvements doivent être conçus de façon à assurer la confidentialité, le confort et les besoins du patient ⁽⁹⁾.

De plus, ces locaux devraient préserver l'intimité du patient, être munis d'un lavabo pour le lavage des mains et d'une tablette où déposer le récipient ⁽²⁾ ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾. En vertu du *Code de construction du Québec*, ces locaux doivent être assez spacieux pour faciliter l'accès aux personnes à mobilité réduite ⁽²⁸⁾. De plus, ils devraient permettre au patient d'être accompagné. Le matériel aidant à la stimulation devrait être facilement lavable ou jetable. Le matériel de désinfection des lieux devrait être laissé dans la salle même ou être facilement accessible. Le local devrait être inspecté et, au besoin, désinfecté avant son utilisation par un autre patient ⁽²⁹⁾.

Ces locaux devraient être situés à proximité du laboratoire qui effectuera l'analyse pour éviter les fluctuations de température et réduire le temps entre la collecte et la réception au laboratoire ⁽¹⁾ ⁽²⁶⁾. Il est recommandé de munir le local d'un moyen de communication pour avertir le personnel lorsque l'échantillon est prêt ou en cas de problème ⁽³⁰⁾.

La figure 1 fournit un exemple d'aménagement de la pièce destinée à la collecte des échantillons de sperme.

Figure 1. Aménagement type de la pièce destinée à la collecte des échantillons de sperme



9.0 Gestion de la documentation

Dans les systèmes de gestion de la qualité, la documentation désigne les politiques, les processus, les procédures et l'enregistrement des résultats. Comme le prescrit la norme ISO 15189, des procédures documentées sont élaborées de concert avec les spécialistes du laboratoire pour toutes les activités effectuées ⁽⁹⁾. Il incombe au technologiste médical de prendre connaissance de ces procédures et de s'y conformer, tout en s'appuyant sur son jugement professionnel quand la situation l'exige ⁽¹⁰⁾.

Le technologiste médical doit s'assurer que les enregistrements (p. ex., résultats d'analyse et commentaires) qu'il fait sont lisibles, précis, exacts et complets ⁽³¹⁾. Il doit s'assurer d'ajouter au rapport tous les commentaires qu'il juge pertinents afin de transmettre la meilleure description possible de l'échantillon, tout en respectant les politiques et les procédures en vigueur au laboratoire ⁽¹⁶⁾.

10.0 Exigences du processus préanalytique

Comme c'est le cas pour toute analyse biomédicale, il importe de comprendre et de respecter les différentes étapes du processus préanalytique pour assurer la qualité finale de l'analyse et de la préparation du sperme. L'analyse et la préparation du sperme, en particulier en vue de l'évaluation de la fertilité, exigent efficacité et rapidité d'exécution. Après l'éjaculation, le liquide séminal est toxique pour les spermatozoïdes lorsqu'ils restent en contact avec celui-ci. En effet, son pH change progressivement suivant la composition chimique du milieu et altère la vitalité et la motilité des spermatozoïdes. Par conséquent, il faut agir rapidement, dans les délais prescrits (voir le point 10.8), afin d'obtenir des résultats représentatifs de l'état des spermatozoïdes à l'éjaculation ^{(1) (5)}.

Alors qu'il l'est pour la majorité des analyses biomédicales, le centre de prélèvement n'est pas toujours la porte d'entrée pour le patient (ou son éjaculat). En effet, il se peut que le patient reçoive les directives de collecte de son médecin et qu'il apporte son échantillon directement au laboratoire. Par conséquent, le centre de prélèvement ne peut pas toujours fournir l'encadrement et les instructions nécessaires, ou garantir la qualité de l'échantillon. Il incombe donc aux biochimistes cliniques, aux médecins spécialistes du laboratoire et aux technologues médicaux de tout mettre en œuvre pour assurer la qualité de l'éjaculat.

10.1 Ordonnance

Chaque échantillon reçu au laboratoire doit être accompagné d'une ordonnance (requête)^{(14) (32)}. Le personnel qui réceptionne les échantillons doit s'assurer qu'il comprend bien les renseignements inscrits sur l'ordonnance. En cas de doute, le personnel doit vérifier l'ordonnance avec le prescripteur, une personne autorisée ou le patient lui-même⁽¹⁶⁾.

Le Règlement sur les normes relatives aux ordonnances faites par un médecin adopté par le Collège des médecins du Québec précise les éléments devant être inclus sur l'ordonnance individuelle⁽³³⁾.

Parmi les renseignements cliniques inscrits sur l'ordonnance, il importe de trouver le type d'analyse ordonnée, les interventions subies par le patient ou prévues⁽²⁹⁾ et toute autre information pertinente (p. ex., préparation du sperme en vue d'une insémination).

10.2 Instructions relatives à la collecte

Il est très important de transmettre au patient des instructions claires et pertinentes avant la production de l'échantillon. Ces instructions peuvent être données verbalement, mais il est préférable de remettre également un court dépliant résumant chaque renseignement jugé pertinent. Il est important de s'assurer que le patient comprenne les instructions⁽²⁷⁾.

Si le patient recueille son sperme chez lui, il faut lui faire comprendre l'importance d'apporter l'échantillon sans tarder au laboratoire et de le conserver à la température précisée⁽¹⁾.

L'annexe 1 présente des exemples d'instructions que l'on peut remettre au patient en vue de l'évaluation de la fertilité ou de la confirmation du succès ou de l'échec de la vasectomie.

10.3 Collecte de l'échantillon

Plusieurs centres n'ont pas de pièce réservée à la production d'éjaculat. Dans ce cas, le patient devra produire l'éjaculat chez lui. L'échantillon peut donc être produit dans deux cadres différents, qui imposent des conditions de réception différentes.

Chaque laboratoire détermine le type de récipient accepté pour la collecte de l'éjaculat. Ce récipient doit être à usage unique. Idéalement, il devrait être fait de polypropylène, stérile, pourvu d'une grande ouverture et étanche (p. ex., pot d'urine stérile, tube conique). Certains éléments, tels que les nettoyeurs ou des matériaux entrant dans la production de récipients de polystyrène, peuvent être toxiques pour les spermatozoïdes. Idéalement, on recueillera les échantillons destinés à l'insémination dans un contenant reconnu comme non cytotoxique ^{(1) (5) (29)}.

Dans la mesure du possible, on peut donner un récipient pré-pesé au patient afin de mesurer plus précisément le volume de l'éjaculat. Le même récipient contenant l'échantillon sera pesé de nouveau sur réception (voir le point 12.2.3, mesure du volume) ^{(1) (34)}.

L'intervalle entre deux analyses de sperme dépend de certains facteurs cliniques. Même si un cycle de spermatogénèse complet prend jusqu'à 12 semaines ⁽⁵⁾, un intervalle de 4 à 6 semaines entre 2 analyses est généralement souhaitable. Il revient au médecin de déterminer l'intervalle nécessaire, puisque la présence d'anomalies marquées sur le premier spermogramme suppose la réalisation sans délai d'une deuxième analyse. Une période d'abstinence de 2 à 5 jours est généralement recommandée ^{(1) (2) (35)}.

10.3.1 Échantillon produit dans l'établissement

Il est préférable d'encourager le patient à fournir l'échantillon en établissement, surtout en vue de l'évaluation de la fertilité, pour respecter les exigences de délai et de température, et sachant que les locaux sont adaptés à cette fin. Le point 8.1 présente les exigences et recommandations liées aux locaux réservés à la collecte d'échantillons dans les établissements. Certains établissements fixent des rendez-vous afin de favoriser le traitement rapide des échantillons après la collecte. L'annexe 2 expose des mesures visant à mettre le patient à l'aise et à préserver son intimité lors de la collecte.

10.3.2 Échantillon produit à domicile

Contrairement à l'éjaculat produit en établissement, l'échantillon que le patient produit chez lui sera probablement liquéfié à son arrivée au laboratoire et devra être analysé immédiatement ⁽¹⁾. Le personnel doit donc être prêt à intervenir rapidement dès que le patient apporte son échantillon.

Le point 10.2 expose les instructions à transmettre au patient en vue de la collecte à domicile.

10.4 Identification de l'échantillon

Pour être bien identifié, le récipient contenant l'échantillon doit porter deux identifiants, c'est-à-dire le nom et le prénom du patient ainsi qu'un numéro d'identification propre au patient ⁽¹⁴⁾ ⁽²⁷⁾ ⁽²⁹⁾. Ces renseignements (qui peuvent être inscrits sur une étiquette) seront apposés par le patient lors de la collecte ou par le personnel sur réception de l'échantillon.

Afin d'assurer la traçabilité de l'échantillon et de permettre au laboratoire de vérifier la concordance entre l'ordonnance médicale et l'échantillon, les renseignements suivants devraient également figurer sur le récipient ⁽¹⁶⁾ ⁽²⁷⁾ :

- la date du prélèvement;
- l'heure exacte du prélèvement.

Note : si la date et l'heure ne sont pas inscrites sur le récipient, il faut mettre en place un protocole de communication de ces renseignements au laboratoire pour que le personnel évalue correctement le temps écoulé entre la collecte et les étapes suivantes (analyse et préparation du sperme) ⁽¹⁴⁾.

Il faut consigner tous les renseignements relatifs à la collecte pour assurer la traçabilité de l'échantillon une fois celui-ci éliminé. Des politiques ou des procédures devraient préciser l'endroit où ces données peuvent être consignées (formulaire, système d'information du laboratoire) ⁽¹⁴⁾.

10.5 Conservation de l'échantillon entre la collecte et la réception

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire s'assure que les échantillons ont été conservés à la température appropriée pour garantir leur intégrité ⁽⁹⁾.

L'échantillon doit être conservé à une température proche de la température corporelle (sans excéder 37°C). Il faut avertir le patient qui produit son échantillon hors de l'établissement de mettre le récipient en contact direct avec sa peau pour le tenir au chaud ⁽⁵⁾. On donnera les mêmes instructions à toute personne qui transporte l'échantillon pour le patient. L'ordonnance ne devrait pas être en contact direct avec l'échantillon ⁽²⁷⁾ ⁽³⁶⁾.

Si l'échantillon est produit dans l'établissement, mais qu'il n'est pas possible de l'expédier immédiatement au laboratoire, on doit l'entreposer dans un dispositif qui permet de le tenir à la température souhaitée (p. ex., étuve, bain-marie ou plaque chauffante) en attendant son transport au laboratoire ⁽⁵⁾.

10.6 Transport de l'échantillon

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire s'assure que les échantillons sont transportés ⁽⁹⁾ :

- dans le délai approprié, compte tenu des examens demandés;
- à la température appropriée au type de prélèvement et à la manipulation prévue des échantillons;
- d'une manière qui garantit l'intégrité de l'échantillon et la sécurité du transporteur, du grand public et du laboratoire destinataire, conformément aux exigences établies.

Dès qu'un échantillon biologique doit passer sur la voie publique, il est assujéti au *Règlement sur le transport des marchandises dangereuses* (RTMD) de Transports Canada. Si on a des raisons de croire que l'éjaculat peut contenir des agents pathogènes, on doit le transporter comme s'il s'agit d'une matière infectieuse de classe 6.2, conformément au RTMD ⁽³⁷⁾.

Pour se renseigner davantage sur les exigences relatives au transport des échantillons, consulter le document de l'OPTMQ intitulé *Transport et conservation des échantillons dans le domaine de la biologie médicale* ⁽³⁶⁾ ainsi que le *Règlement sur le transport des marchandises dangereuses* de Transports Canada ⁽³⁷⁾.

10.7 Réception des échantillons

Une fois l'éjaculat produit, peu importe où, le personnel du laboratoire doit se tenir prêt à accueillir le patient ou l'échantillon. Le personnel doit respecter l'intimité du patient et le caractère confidentiel du test. Si ce n'est pas déjà fait, le personnel demande au patient de remplir le questionnaire préanalytique présenté au point 10.7.1.

Il faut vérifier l'intégrité et la traçabilité des échantillons dès leur arrivée au laboratoire. La concordance entre l'identification de l'échantillon reçu et l'ordonnance médicale doit être vérifiée à cette étape ainsi qu'à toutes les étapes suivantes des processus de préparation et d'analyse au laboratoire ⁽⁹⁾.

Toute condition susceptible de modifier la qualité de l'échantillon doit être consignée. Par exemple, si l'échantillon n'a pas été recueilli au complet, on doit demander au patient à quel moment de la collecte (au début, au milieu ou à la fin de l'éjaculation) les gouttes de sperme ont été perdues. Cette perte aura une portée clinique différente selon le type d'analyse demandée. On ajoutera une note au rapport pour aviser le médecin que l'échantillon n'était pas complet ^{(1) (9) (16)}.

Il faut s'assurer qu'il y a suffisamment de personnel pour réceptionner et traiter les échantillons ^{(9) (29)}.

Avant la réception de l'échantillon, mettre en marche le dispositif qui permet de contrôler la température (p. ex., étuve, bain-marie ou plaque chauffante) assez longtemps d'avance pour qu'il atteigne la température désirée, puis vérifier que cette température est atteinte. L'éjaculat doit être entreposé sans délai à une température de 37 °C (sans y excéder), si cette température peut être maintenue pendant tout le processus ⁽¹⁾ ⁽⁵⁾. Sinon, le conserver à la température de la pièce ⁽¹⁾. Certaines évaluations méritent d'être effectuées dès la réception comme l'évaluation de la liquéfaction (voir le point 12.3.2) ⁽⁵⁾.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, tous les échantillons reçus sont inscrits dans un registre d'admission, sur une feuille de travail, dans un système informatique ou tout autre système comparable. La date et l'heure de réception et/ou d'enregistrement des échantillons doivent être consignées ⁽⁹⁾. L'identité de la personne recevant l'échantillon doit également être enregistrée ⁽¹⁴⁾ ⁽²⁷⁾.

10.7.1 Questionnaire préanalytique

Un questionnaire préanalytique doit être rempli avec le patient sur réception de l'échantillon; ce questionnaire devrait porter sur les points suivants ⁽¹⁾ ⁽²⁹⁾ :

- le nombre de jours d'abstinence;
- si l'échantillon a été recueilli au complet (si ce n'est pas le cas, à quelle étape de l'éjaculation la perte a eu lieu);
- si l'échantillon a été transporté conformément aux instructions (au contact de la peau);
- l'heure du prélèvement;
- l'heure d'arrivée de l'échantillon;
- les interventions médicales (p. ex., traitement du cancer) et chirurgicales subies par le patient ou prévues (p. ex., vasectomie, vasovasostomie);
- le nom de la conjointe (pour l'évaluation de la fertilité, car le dossier conservé par le médecin peut porter son nom).

10.7.2 Critères de conformité des échantillons

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le personnel autorisé doit évaluer les échantillons reçus afin de s'assurer qu'ils satisfont aux critères d'acceptation pertinents en vue des examens prescrits ⁽⁹⁾.

Les critères de conformité d'un échantillon sont établis dans chaque laboratoire en étroite collaboration avec les spécialistes. Ces critères peuvent mener au rejet de l'échantillon si une ou plusieurs des conditions préanalytiques n'ont pas été respectées. Le technologiste médical doit s'appuyer sur son jugement professionnel pour appliquer les critères de conformité et tout mettre en œuvre pour préserver l'intégrité de l'échantillon et éviter de retarder l'analyse, sans perdre de vue les impératifs de qualité des résultats ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁶⁾.

Voici les critères d'exclusion qui mènent au rejet d'un échantillon ⁽²⁹⁾ :

- échantillon reçu sans ordonnance;
- identification non conforme;
- récipient non conforme;
- récipient qui fuit (non hermétique).

Voici quelques exemples de situations qui ne mènent pas à un rejet automatique, mais qui nécessitent l'ajout d'une note au rapport :

- dépassement du délai prescrit avant l'analyse (voir le point 10.8);
- échantillon qui n'a pas été conservé à la température corporelle;
- période d'abstinence trop courte ou trop longue. Une période d'abstinence de 2 à 5 jours ⁽¹⁾ ⁽³⁵⁾ est recommandée, mais n'est pas un critère d'exclusion quand l'analyse vise à confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie;
- perte d'une partie de l'échantillon (durant l'éjaculation).

Note : Il faut savoir que les premières gouttes de l'éjaculat contenant surtout du liquide prostatique acide sont les plus riches en spermatozoïdes et que les dernières gouttes plus basiques proviennent surtout des glandes accessoires et contiennent moins de spermatozoïdes. Il est donc clair que la perte des premières gouttes se traduira par une baisse du nombre réel de spermatozoïdes ⁽¹⁾.

Si le laboratoire doit traiter un échantillon non conforme, le rapport final doit indiquer la nature du problème et, le cas échéant, conseiller l'interprétation prudente des résultats ⁽⁹⁾.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire consigne chaque cas non conforme et réexamine régulièrement ces enregistrements afin de déceler des tendances et d'apporter des correctifs ⁽⁹⁾.

10.8 Délais d'exécution des analyses

Il faut éviter d'accumuler les échantillons de sperme ou de retarder inutilement les analyses, sous peine de perdre de précieux renseignements. Tout retard d'analyse doit être noté dans le rapport ⁽¹⁾.

La motilité et le pH sont particulièrement sensibles aux délais d'analyse ⁽¹⁾. Il est recommandé d'effectuer les analyses de ces paramètres dans un délai de 30 à 60 minutes après l'éjaculation ⁽¹⁾ ⁽²⁹⁾ ⁽³⁸⁾, et pas plus de 2 heures après celle-ci ⁽⁴⁾. Il est donc préférable d'aviser le patient d'apporter son échantillon au laboratoire dans l'heure qui suit l'éjaculation ⁽¹⁾.

Tant que l'éjaculat n'est pas liquéfié, le mouvement des spermatozoïdes, l'homogénéité de l'échantillon et la capacité de bien effectuer les observations au microscope sont limités. La liquéfaction s'effectue normalement en l'espace de 15 à 30 minutes après l'éjaculation ⁽²⁾. Idéalement, l'analyse commence dès que la liquéfaction est complétée ⁽¹⁾.

Il faut éviter de repousser l'analyse des échantillons visant à confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie pour donner la priorité aux évaluations de la fertilité. Le mandat du laboratoire de biologie médicale qui effectue un spermogramme à la suite d'une vasectomie est d'évaluer non seulement la présence des spermatozoïdes, mais également leur motilité. En effet, selon l'*European Association of Urology* (EAU) ⁽³⁾ et l'*American Urological Association* (AUA) ⁽⁴⁾, la motilité d'un seul spermatozoïde est un critère suffisant pour établir que la vasectomie a peut-être échoué. Il est donc essentiel d'évaluer les échantillons recueillis après une vasectomie dans un délai raisonnable. Il faut achever l'analyse moins de deux heures après l'éjaculation afin d'assurer la détection des spermatozoïdes mobiles ⁽⁴⁾. Comme dans le cas de l'évaluation de la fertilité, la prise de rendez-vous peut grandement aider à gérer ces échéanciers serrés.

10.9 Préparation particulière en cas d'éjaculation rétrograde

Dans de rares cas, le volume de sperme éjaculé sera très faible, voire nul. Dans ces cas, le médecin peut suspecter que la cause du problème est une éjaculation rétrograde partielle ou complète. En fait, l'éjaculation a bien lieu, mais l'éjaculat passe dans la vessie au lieu d'être expulsé normalement. Cette situation peut toucher notamment les patients atteints de diabète ^{(5) (39)}. On arrive à reconnaître ces cas problématiques en analysant un échantillon d'urine pour vérifier s'il contient ou non des spermatozoïdes ⁽¹⁾.

L'urine et le sperme ont des pH différents ce qui peut nuire à la motilité des spermatozoïdes. Une préparation spéciale est donc nécessaire à la détection des spermatozoïdes mobiles dans l'urine. Les spermatozoïdes mobiles ainsi détectés pourraient servir dans des traitements de fertilité (p. ex., FIV et IICS). Le dépistage de l'éjaculation rétrograde se fait donc sur échantillon d'urine obtenu après l'éjaculation ⁽¹⁾.

La méthode décrite ci-dessous s'appuie sur l'expérience des membres du groupe de travail de l'OPTMQ et les ouvrages de référence ^{(1) (5) (39)}. Chaque centre doit valider et adapter cette méthode au besoin.

10.9.1 Instructions fournies au patient

Le patient obtiendra les instructions de son médecin. Toutefois, la procédure suivante peut être communiquée directement au médecin sur demande. Le patient doit s'abstenir de toute activité sexuelle (masturbation ou relation sexuelle) de 2 à 5 jours avant de produire l'échantillon ^{(1) (2) (5)}.

- La journée qui précède la production de l'échantillon, le patient doit prendre par voie orale un cachet de bicarbonate de sodium (650 mg) toutes les 6 heures afin d'alcaliniser son urine (pH visé de 7,5 à 8,0), comme suit :
 - 6 h (la veille du test) : prise d'un cachet de 650 mg;
 - Midi : prise d'un cachet de 650 mg;
 - 18 h : prise d'un cachet de 650 mg;
 - Minuit : prise d'un cachet de 650 mg;
 - 6 h (le matin du test) : prise d'un cachet de 650 mg.
- Le jour du test, le patient doit uriner 1 heure avant de produire l'éjaculat.
- Le patient produit ensuite l'éjaculat et le recueille dans un récipient stérile.
- Finalement, le patient doit se vider complètement la vessie dans un autre récipient stérile. Prévoir un contenant assez grand.
- Le patient apporte les deux échantillons au laboratoire (éjaculat et urine).

10.9.2 Instructions à l'intention du laboratoire et du personnel à la réception des échantillons

- S'assurer qu'il y a une ordonnance et que les analyses de sperme et d'urine y sont demandées.
- Remplir le questionnaire présenté au point 10.7.1 avec le patient.
- Vérifier le pH de l'échantillon d'urine et le noter au rapport. S'il ne se situe pas entre 7,5 et 8,0, la motilité des spermatozoïdes sera moins grande⁽³⁹⁾.
- Mesurer le volume de l'urine.
- Transférer tout l'échantillon d'urine dans des tubes coniques.
- Centrifuger les tubes d'urine pendant 10 minutes afin de concentrer les spermatozoïdes (à une force de 500 à 800 g). Retirer rapidement le surnageant.
- Conserver les culots et les mélanger ensemble dans un seul tube.
- Remettre en suspension dans 1 ml du milieu de lavage.
- Préparer un état frais avec le culot; examiner au microscope.
- Si l'urine contient des spermatozoïdes, évaluer leur concentration et leur motilité.

11.0 Exigences du processus analytique

11.1 Matériel de laboratoire

Dans le présent guide, le matériel de laboratoire désigne les instruments, les équipements, les réactifs, les substances de référence et le matériel consommable, entre autres.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire doit posséder tout le matériel nécessaire à la prestation des services. Le laboratoire doit vérifier, durant l'installation et avant l'utilisation, que le matériel permet d'obtenir le résultat attendu et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés. Il faut conserver des enregistrements de chaque élément du matériel, afin de contribuer à la bonne exécution des examens⁽⁹⁾.

Idéalement, il faudrait entreposer le matériel qui entre en contact avec l'échantillon, comme les lames et lamelles, les pipettes sérologiques et le milieu de dilution du sperme, à une température de 37 °C (si cette température peut être maintenue pendant tout le processus) avant son utilisation pour éviter les chocs thermiques⁽¹⁾.

Les spermatozoïdes sont normalement vivants et le contact de produits toxiques peut leur nuire. On doit donc s'assurer que tout le matériel utilisé pour contenir ou manipuler le sperme n'est pas nocif, particulièrement avant l'évaluation de la motilité et la préparation de sperme destiné aux traitements de fertilité^{(1) (29)}.

Pour se renseigner davantage sur l'utilisation et la gestion des réactifs, consulter le document de l'OPTMQ intitulé *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale*⁽¹⁴⁾.

11.1.1 Instrumentation et équipement

Pour que le laboratoire soit performant, il faut compter non seulement sur les bonnes techniques, mais aussi sur un équipement adéquat. Cette section expose une liste non exhaustive du matériel et de l'équipement que l'on recommande dans tout laboratoire de biologie médicale afin d'assurer la réalisation appropriée du spermogramme conformément à ce guide. L'instrumentation est un élément important du processus analytique. Le technologiste médical doit connaître le fonctionnement des instruments qu'il utilise et s'en servir avec vigilance⁽¹⁶⁾.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, les instruments doivent être tenus dans un état de fonctionnement optimal et sécuritaire. Si l'instrument se révèle défectueux, il doit être mis hors service et clairement identifié. Le matériel défectueux doit être bien identifié et ne doit pas être utilisé tant qu'il n'a pas été réparé. Il doit répondre aux critères d'acceptabilité précisés avant sa remise en service⁽⁹⁾. Tout le matériel consommable utilisé durant la préparation du sperme en vue de la PMA doit être stérile⁽¹⁾.

11.1.1.1 Microscope

Il est recommandé d'utiliser un microscope de bonne qualité, ergonomique et, idéalement, à contraste de phase ^{(1) (2)}.

Ce microscope devrait être équipé des accessoires suivants ^{(1) (2)} :

- objectifs à faible et fort grossissements pour permettre les différentes évaluations nécessaires : 10x, 20x, et 40x ainsi qu'un objectif à l'huile de 100x (sans contraste de phase);
- oculaire à champ large (au moins 10x). Toutefois, un oculaire de 12,5x est recommandé pour l'évaluation de la morphologie;
- platine chauffante. Dans certains cas, l'ajout d'une plaque chauffante sur la platine du microscope cause une distorsion du faisceau lumineux. L'ajout d'un filtre permet de corriger cette distorsion.

Le technologiste médical doit être en mesure d'effectuer les divers réglages, comme celui de l'éclairage suivant la méthode de Köhler. Le document de l'OPTMQ intitulé *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale* présente une procédure d'ajustement de l'éclairage suivant la méthode de Köhler ⁽¹⁴⁾.

11.1.1.2 Balance

Il est recommandé d'utiliser une balance assez sensible pour permettre des mesures en milligramme (mg) ⁽²⁾.

11.1.1.3 Centrifugeuse

Il est recommandé d'utiliser une centrifugeuse à rotors oscillants et à godets fermés. Idéalement, ce type de centrifugeuse devrait également être programmable. On devrait avoir accès à différents adaptateurs permettant de centrifuger divers types de tubes, tels que des tubes coniques de 15 ml et des tubes de 50 ml pour les échantillons urinaires recueillis en cas d'éjaculation rétrograde ⁽²⁾.

Les vitesses de centrifugation proposées dans ce guide sont exprimées en unités de force centrifuge relative (g). La vitesse de rotation par minute (RPM) doit être calculée en fonction du rayon du rotor de la centrifugeuse utilisée. Le document de l'OPTMQ intitulé *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale* présente une procédure de détermination de la RPM ⁽¹⁴⁾.

11.1.1.4 Chambre de comptage

La chambre de comptage comprend les éléments suivants ⁽²⁾ :

- Hématimètre de type amélioré de Neubauer.
- Chambre humide pour éviter l'évaporation. La chambre humide peut tout simplement être une boîte de Petri contenant une gaze imprégnée d'eau.

Il existe d'autres types de chambres de comptage (p. ex., chambre Makler®). Ces chambres de comptage peuvent être utiles quand le dénombrement précis de spermatozoïdes n'est pas nécessaire ^{(40) (41)}.

11.1.1.5 Dispositif de conservation de chaleur

S'assurer que l'étuve, le bain (bain-marie ou bain sec) ou la plaque chauffante est à température contrôlée pour éviter les fluctuations de température pouvant nuire à l'intégrité de l'échantillon. Il faut vérifier ces équipements quotidiennement en tenant un registre des températures ⁽²⁾.

11.1.1.6 Compteur

Compteur manuel ou clavier numérique pour compter les spermatozoïdes.

11.1.1.7 Pipette

Pour compter les spermatozoïdes, il est fortement suggéré d'utiliser des pipettes à déplacement positif qui serviront à manipuler le sperme ^{(1) (2) (5)}. Ces pipettes exigent un entretien minutieux et des étalonnages réguliers.

Pour évaluer la viscosité et mesurer le volume (si on n'a pas recours à la pesée), il est recommandé d'utiliser des pipettes sérologiques (de 2, 5 et 10 ml). Des pipettes jetables, telles que les pipettes Pasteur de diamètre approximatif de 1,5 mm, peuvent également servir à évaluer la viscosité ⁽¹⁾.

11.1.1.8 Lame et lamelle

Utiliser des lames et des lamelles mesurant 22 mm x 22 mm pour examiner les spermatozoïdes à l'état frais ⁽¹⁾.

11.1.1.9 Bandelette indicatrice de pH

Permet de mesurer des pH allant de 0 à 14 avec une précision de 0,5. La bandelette de pH 6,5 à 10 sert souvent à mesurer le pH de l'éjaculat ⁽²⁾.

11.1.1.10 Contrôles de qualité commerciaux

Solutions témoins dont la concentration en billes de latex ou autre élément est connue. De taille comparable à la tête d'un spermatozoïde, ces contrôles permettent de confirmer la précision de la numération.

11.1.1.11 Équipement spécialisé

Système CASA : Système informatisé d'analyse de sperme (*Computer-Assisted Semen Analysis*) : analyseur de plus en plus intégré dans les laboratoires de biologie médicale, permettant la réalisation de spermogrammes. Cet appareil facultatif est surtout utile dans les centres effectuant un grand volume d'analyses ou les centres spécialisés de fertilité.

Les figures 2 et 3 illustrent des photos de systèmes CASA.

Figure 2. Système CASA en circuit fermé



Photo prise par Francine Cloutier, T.M., au laboratoire d'andrologie du CHUL, CHU de Québec - Université Laval. Reproduite avec permission.

Figure 3. Système CASA montée sur microscope

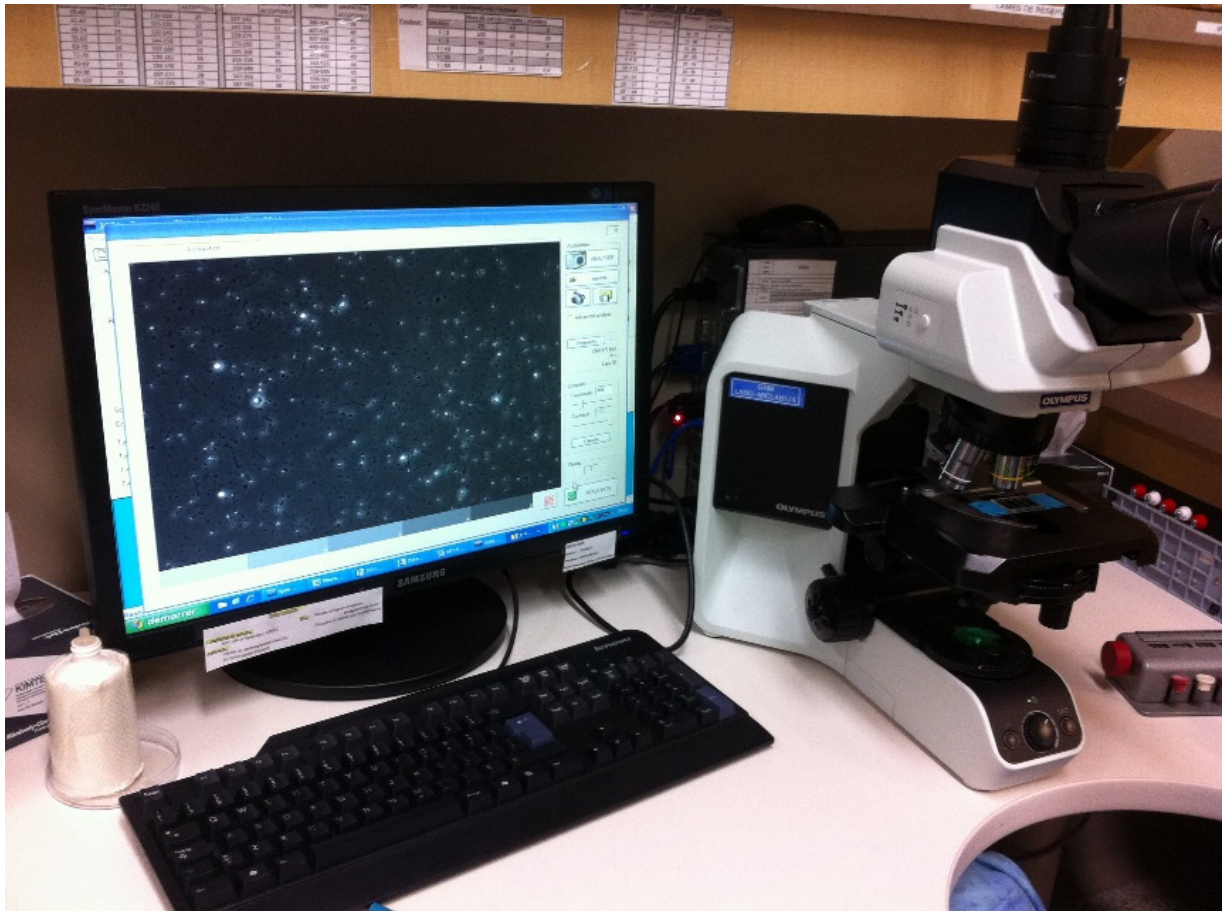


Photo prise par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduite avec permission.

Les systèmes CASA sont constitués d'un microscope, d'une caméra et d'un processeur (ordinateur). Les plus récents appareils permettent la mesure et le calcul de nombreux paramètres du spermogramme^{(1) (2)}.

Paramètres de base :

- concentration des spermatozoïdes;
- motilité.

Paramètres spécifiques :

- caractéristiques morphométriques (longueur, largeur, périmètre et surface de la tête, longueur du flagelle);
- caractéristiques morphologiques (flagelle enroulé, cassé, vacuoles).

On doit suivre les recommandations du fabricant quant à l'utilisation et à l'étalonnage de ces systèmes.

Lame de comptage pour l'analyse de sperme, compatible avec les systèmes CASA : Le calibrage de chaque chambre permet un dénombrement précis. Chaque lame peut contenir jusqu'à huit chambres ⁽⁴²⁾. Les figures 4 et 5 illustrent des photos de lames de comptage.

Figure 4. Lame de comptage à deux chambres

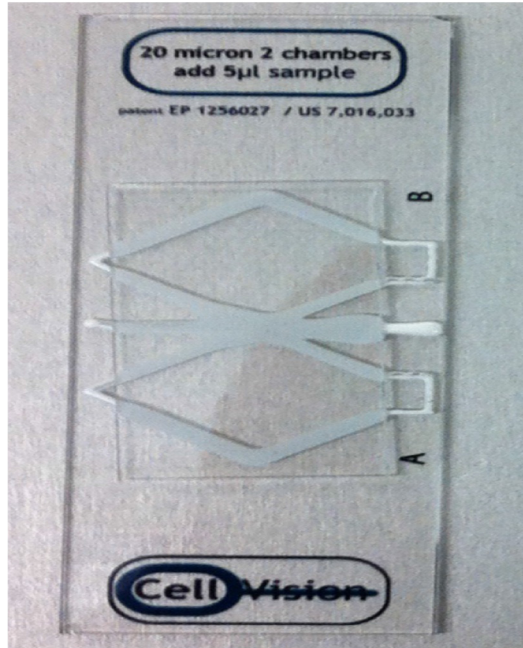


Photo prise par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduite avec permission.

Figure 5. Lames de comptage à quatre chambres

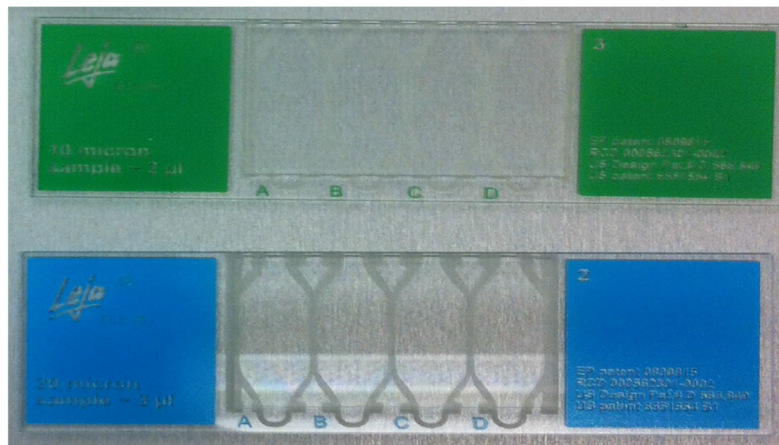


Photo prise par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduite avec permission.

11.2 Entretien préventif

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire doit disposer d'un programme documenté d'entretien préventif de ses équipements qui respecte au minimum les instructions du fabricant ⁽⁹⁾.

Les activités d'entretien préventif peuvent être effectuées en collaboration avec le Service de génie biomédical, le fournisseur ou toute autre personne habilitée, pourvu que les spécifications soient fournies par le laboratoire. Le technologiste médical doit suivre le programme d'entretien préventif en vigueur au laboratoire et doit documenter toutes ses interventions ⁽¹⁶⁾.

11.3 Programme d'assurance qualité

Le programme d'assurance qualité englobe les mesures prises afin d'éviter les erreurs préanalytiques, analytiques et postanalytiques. Le but final de ce programme est d'offrir des analyses de grande qualité et, par conséquent, d'étayer les interventions du médecin auprès du patient.

C'est grâce aux contrôles de qualité interne et externe que les erreurs analytiques peuvent être détectées. Le chef de département de la biologie médicale est responsable de l'application des mesures de contrôle interne de la qualité ainsi que de la participation du laboratoire au contrôle externe de la qualité, pour chacune des analyses effectuées au laboratoire, comme le prescrit le Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec ^{(32) (43)}. Le technologiste médical doit connaître et respecter le programme de contrôle de la qualité propre à chaque analyse ⁽¹⁶⁾.

11.3.1 Contrôle interne de la qualité

Le contrôle interne de la qualité est le plus important moyen de déceler les problèmes analytiques afin de les corriger rapidement. Ce type de contrôle permet un suivi au jour le jour de l'exactitude et de la précision des analyses. En l'absence de dispositifs de contrôle commerciaux, il est possible de créer localement des solutions de contrôle interne de la qualité ^{(9) (43)}.

11.3.2 Contrôle externe de la qualité

Chaque discipline biomédicale est tenue par le Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec de participer à un programme d'évaluation externe de la qualité de tous les types d'analyses. Le rôle principal du programme de contrôle externe de la qualité est de déceler des erreurs systématiques (biais). Le programme permet ainsi de vérifier l'exactitude de la méthode d'analyse et de comparer la prestation du laboratoire à celle d'autres laboratoires ^{(9) (32) (43)}.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, le laboratoire intègre les échantillons fournis dans le cadre d'un programme de contrôle externe de la qualité dans les séries régulières pour leur faire subir autant que possible le même traitement que les échantillons provenant de patients. Ces échantillons sont traités par le personnel qui analyse régulièrement les échantillons de patients ⁽⁹⁾ ⁽¹⁴⁾.

Plusieurs sociétés et organismes offrent des services de contrôle externe de la qualité (p. ex., *College of American Pathologists* et *Oneworld Accuracy*).

Si une comparaison entre laboratoires n'est pas possible, le laboratoire doit développer d'autres approches en vue de fournir des preuves objectives validant l'acceptabilité des résultats d'analyse ⁽⁹⁾ ⁽¹⁴⁾.

Pour se renseigner davantage sur le contrôle de la qualité, consulter les documents suivants :

- ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO 15189 (F) Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence* ⁽⁹⁾.
- ORDRE PROFESSIONNEL DES TECHNOLOGISTES MÉDICAUX DU QUÉBEC. *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale* ⁽¹⁴⁾.

12.0 Examen du sperme visant l'évaluation de la fertilité

Le spermogramme visant l'évaluation de la fertilité permet au médecin de vérifier certains paramètres pouvant être mis en cause quand un couple a de la difficulté à réaliser un projet de conception. Cette évaluation permet au médecin de commencer son investigation du couple sous-fertile. Ce type de spermogramme peut également servir aux fins suivantes⁽⁴⁴⁾ :

- suivi de certaines interventions chirurgicales;
- suivi de la fonction reproductrice dans certains cas de cancer ou dans le cadre de la préservation de fertilité;
- évaluation de la qualité du sperme congelé.

Depuis de nombreuses années, le spermogramme est la pierre angulaire du diagnostic d'infertilité masculine malgré que la pertinence de cet examen ait été mise en doute par de nombreux auteurs^{(45) (46) (47)}. Il est en effet connu depuis des décennies que le pouvoir fécondant du sperme ne dépend pas seulement des éléments mesurés dans un spermogramme, mais de plusieurs processus biochimiques relativement complexes⁽⁴⁶⁾. L'interprétation du spermogramme doit tenir compte de ces limites. Cependant, la concentration des spermatozoïdes et leur motilité sont des paramètres qui ont leur utilité s'ils sont bien mesurés.

Plusieurs organismes de référence ont à tour de rôle tenté de baliser l'examen du sperme afin d'en améliorer la technique et d'en tirer une meilleure information clinique. L'OMS est l'un des premiers organismes à avoir publié un manuel afin de standardiser la pratique de l'examen du sperme humain. Les recommandations à propos de l'évaluation de la fertilité énoncées dans le présent guide s'appuient principalement sur la dernière édition du manuel de l'OMS, publiée en 2010 (5^e édition)⁽¹⁾.

Le médecin pourra tirer des renseignements utiles du spermogramme dont il aura ordonné la réalisation seulement si toutes les étapes des processus préanalytiques et analytiques sont effectuées correctement. Cependant, même dans ce cas, le diagnostic peut se révéler incertain. En effet, le spermogramme ne fournit qu'une partie de l'information nécessaire pour bien orienter le traitement du patient.

Il faut également savoir que la composition du sperme peut varier chez un même individu, c'est-à-dire que l'examen de deux éjaculats fournis consécutivement par un même patient peut donner des résultats différents. Il est donc recommandé de fonder l'interprétation des résultats sur l'examen d'au moins deux éjaculats⁽¹⁾.

La réalisation du spermogramme en vue d'évaluer la fertilité comporte un volet macroscopique et un volet microscopique. Le volet macroscopique porte sur l'aspect, la liquéfaction, la viscosité, la mesure du volume et du pH de l'éjaculat. Le volet microscopique consiste à examiner un échantillon d'éjaculat afin d'évaluer la motilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes observés et de les compter. L'annexe 3 présente un exemple de rapport d'évaluation de la fertilité.

12.1 Homogénéisation de l'éjaculat en vue de son examen

Idéalement, l'éjaculat doit être conservé à une température de 37 °C (sans y excéder) entre les manipulations, si cette température peut être maintenue pendant tout le processus ^{(2) (5)}. Sinon, le conserver à la température de la pièce ⁽¹⁾.

L'homogénéisation doit être une préoccupation constante avant chacune des étapes de l'examen de l'échantillon (évaluation initiale, agrégation, agglutination, dénombrement et motilité, morphologie). Il ne faut jamais utiliser de vortex pour homogénéiser l'échantillon. De même, il faut éviter de mélanger l'échantillon trop vigoureusement pour éviter la formation de bulles. Parmi les méthodes qui suivent, la première est à privilégier ^{(1) (2) (5)}. Il faut également savoir que, même si on respecte ces étapes de mélange, une certaine micro-hétérogénéité pourrait subsister dans l'éjaculat ⁽¹⁾.

12.1.1 Rotation du récipient

Faire tourner le contenant en décrivant des cercles avec le poignet pendant 15 à 20 secondes pour faire décoller le sperme des parois du contenant ⁽²⁾.

12.1.2 Homogénéisation à la pipette

Aspirer et expulser **délicatement** l'échantillon (une dizaine de fois) avec une pipette sérologique dont l'embout fait 1,5 mm de diamètre en prenant soin d'éviter la formation de bulles ⁽¹⁾.

12.2 Examen macroscopique

L'annexe 4 présente un aide-mémoire des étapes de l'examen macroscopique de l'éjaculat.

12.2.1 Aspect

L'échantillon liquéfié est normalement d'aspect laiteux (gris opalescent). Il peut être plus translucide s'il contient peu de spermatozoïdes. Si l'échantillon contient des érythrocytes, il peut être de couleur rouge brunâtre. Il peut également avoir une coloration plus jaunâtre si le patient souffre d'ictère ou prend certains suppléments de vitamines ou médicaments ⁽¹⁾.

Voici les termes recommandés (ayant une signification clinique) pour décrire l'aspect du sperme :

- laiteux;
- translucide;
- brunâtre;
- rougeâtre;
- jaunâtre.

12.2.2 Viscosité

La viscosité devrait être évaluée après liquéfaction spontanée de l'éjaculat de 30 à 60 minutes après l'éjaculation ou dès sa réception au laboratoire ⁽²⁾.

La viscosité de l'échantillon est considérée élevée lorsque le sperme paraît élastique et adhère fortement à lui-même quand on essaie de le recueillir à la pipette. Une viscosité élevée peut notamment nuire à l'examen de la motilité et de la concentration. Pour mesurer la viscosité, on se sert d'une pipette sérologique dont l'embout fait de 1,5 mm de diamètre; on évalue l'étirement en centimètres des gouttes de sperme qui tombent de l'embout par gravité. La viscosité normale correspond à un étirement de 2 cm ou moins. Si les gouttes s'étirent sur plus de 2 cm, rapporter comme suit : « **Viscosité anormale : peut altérer la motilité, la concentration et l'intégrité des spermatozoïdes** » ^{(1) (2)}.

La méthode décrite au point 12.3.2 pour rendre le sperme moins gélatineux à l'aide d'une seringue peut aussi servir à diminuer la viscosité très élevée d'un échantillon, sauf si l'échantillon doit servir à un traitement de fertilité ⁽²⁾. Si on recourt à cette méthode, on doit également le préciser dans le rapport en mentionnant que cela « **peut altérer la motilité et l'intégrité des spermatozoïdes** ».

12.2.3 Volume

La quantité totale de liquide (volume de l'éjaculat) est un indicateur du fonctionnement des glandes accessoires. Ainsi, 90 % du volume de l'éjaculat provient principalement des sécrétions de la prostate, des vésicules séminales, des glandes bulbo-urétrales (Cowper) et de l'épididyme ⁽¹⁾.

On peut mesurer le volume d'éjaculat avec une pipette sérologique de 2, 5 ou 10 ml ⁽⁵⁾. Il est à noter que la viscosité du sperme peut entraîner la perte de 0,3 à 0,9 ml du volume mesuré ⁽¹⁾.

Dans son manuel, l'OMS recommande de mesurer le volume de l'éjaculat en le pesant. Le contenant de prélèvement doit être pesé avant et après la collecte de l'échantillon. Cependant, il ne faut pas oublier que des contenants identiques n'ont pas tous le même poids, ni négliger des détails comme le poids de l'étiquette apposée sur le contenant. La densité du sperme étant d'environ 1 g/ml, on peut estimer que chaque gramme de sperme pesé correspond à 1 millilitre ⁽¹⁾.

Si la quantité de sperme obtenue ne permet pas d'effectuer toutes les analyses requises, prioriser l'évaluation de la motilité et la mesure de la concentration.

12.2.4 pH

Normalement supérieur à 7,2, le pH de l'éjaculat est le résultat du mélange des sécrétions des vésicules séminales (pH plutôt alcalin) et des sécrétions prostatiques (pH plutôt acide) ⁽¹⁾. Un pH faible peut indiquer, entre autres, une possible contamination par de l'urine ⁽⁴⁸⁾. Il peut également nuire à la motilité des spermatozoïdes et à l'interprétation de l'efficacité de la vasectomie ^{(1) (5) (49)}. Puisqu'il est reconnu que le pH d'un échantillon augmente au fil du temps, il faut idéalement mesurer ce paramètre moins de 30 minutes après l'éjaculation, sans dépasser une heure ⁽¹⁾. On mesure le pH en déposant une goutte de sperme sur une bandelette indicatrice de pH 6,5 à 10,0 ⁽⁵⁾.

12.3 Examen microscopique

L'annexe 5 présente un aide-mémoire des étapes de l'examen microscopique de l'éjaculat visant l'évaluation de la fertilité.

12.3.1 Sperme à l'état frais (préparation de la lame)

C'est à cette étape que l'on évalue les paramètres microscopiques suivants : liquéfaction, homogénéité de l'éjaculat, présence d'agréats, d'agglutinats, de cellules rondes, d'érythrocytes, de bactéries ou de protozoaires et d'autres débris particuliers.

L'examen de l'état frais permet également d'évaluer la motilité et de faire une estimation initiale de la concentration de spermatozoïdes. L'estimation initiale de la concentration de spermatozoïdes sert à choisir la dilution appropriée à l'évaluation plus précise de ce paramètre (voir le point 12.3.6).

L'état frais se prépare comme suit ⁽¹⁾ :

- Bien homogénéiser l'éjaculat (voir le point 12.1).
- Prélever rapidement 10 µl de sperme afin d'éviter la sédimentation des éléments solides.
- Couvrir avec une lamelle de 22 mm x 22 mm en prenant soin d'éviter la capture ou la formation de bulles d'air entre lame et lamelle. Ces conditions de préparation permettent d'uniformiser l'épaisseur du sperme (20,7 µm) sous la lamelle pour faciliter le calcul de la concentration. Si des paramètres tels que la dimension de la lamelle, le volume de sperme ou le coefficient de champ sont changés, il faudra corriger le calcul en conséquence.

- Au microscope, examiner rapidement et systématiquement (mouvement de balayage) l'éjaculat à l'état frais sous grossissement total de 200 ou de 400 afin d'éviter que la préparation ne sèche ⁽²⁾. Si le nombre de spermatozoïdes par champ varie considérablement, c'est que l'échantillon n'est pas homogène. Il faut jeter la préparation et en refaire une autre en prêtant une attention particulière à l'homogénéisation ⁽¹⁾. L'examen du sperme à l'état frais doit débiter dès que les éléments cellulaires du sperme ont cessé de dériver entre la lame et la lamelle ⁽¹⁾.

12.3.2 Liquéfaction

Les différents paramètres de l'éjaculat analysés au microscope doivent être mesurés sur échantillon liquéfié, car l'échantillon venant tout juste d'être recueilli a généralement l'aspect d'une masse coagulée semi-solide. La liquéfaction est différente de la viscosité ⁽⁵⁾.

Si l'éjaculat semble liquéfié à l'examen macroscopique, on valide cette observation par examen microscopique d'une préparation de sperme à l'état frais. La présence de courants visqueux ressemblant à du mucus dans l'urine indique que la liquéfaction est incomplète et risque de compromettre la motilité des spermatozoïdes et de nuire à leur dénombrement ⁽¹⁾. La figure 6 illustre l'aspect du sperme non liquéfié au microscope. La liquéfaction d'un échantillon par les protéases prostatiques est généralement achevée en une trentaine de minutes, mais peut prendre plus d'une heure dans certains cas ⁽¹⁾.

Figure 6. Courants visqueux visibles au microscope témoignant de la liquéfaction incomplète du sperme

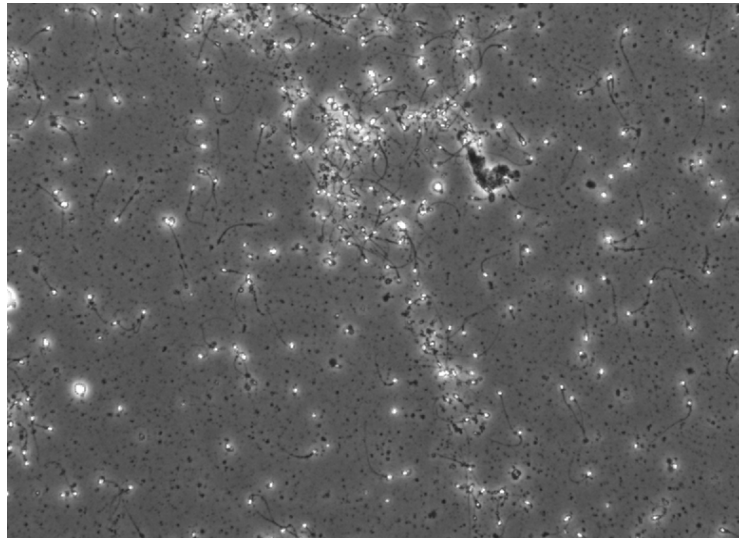


Photo prise par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduite avec permission.

Si la liquéfaction est anormale (> 60 minutes), on peut tenter de rendre le sperme moins gélatineux en l'aspirant et en l'expulsant lentement jusqu'à 10 fois (3 fois suffisent habituellement) avec une seringue (sans lubrifiant) munie d'une aiguille de 18G ou 19G⁽¹⁾. Il ne faut pas recourir à cette technique si l'échantillon doit servir à un traitement de fertilité⁽²⁾.

L'échantillon peut contenir des corps gélatineux (voir la figure 7). Ceux-ci n'ont pas de portée clinique et la liquéfaction peut être considérée comme complète malgré leur présence⁽¹⁾.

Figure 7. Corps gélatineux



Photo prise par Francine Cloutier, T.M., au laboratoire d'andrologie du CHUL, CHU de Québec - Université Laval. Reproduite avec permission.

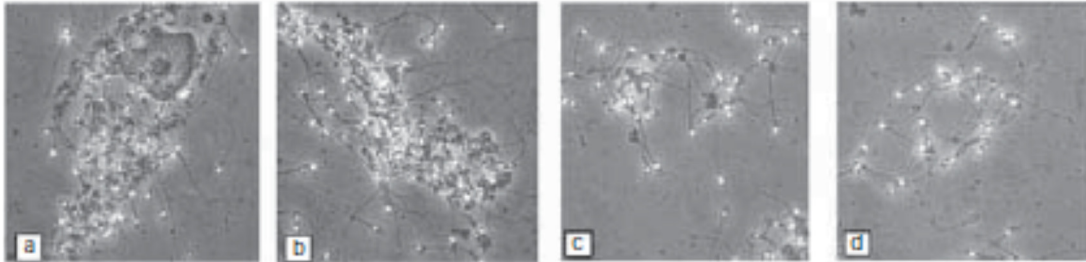
Une liquéfaction incomplète au bout de 60 minutes doit être rapportée comme suit : « *liquéfaction incomplète; résultat sous toutes réserves pour la motilité et la concentration de spermatozoïdes* ». Si on a rendu le sperme moins gélatineux à l'aide d'une seringue, il faut le préciser dans le rapport⁽¹⁾.

12.3.3 Éléments observables dans le sperme à l'état frais

12.3.3.1 Agrégation non spécifique

Il s'agit d'amas de spermatozoïdes immobiles ou de l'agglomération de spermatozoïdes mobiles à des filets de mucus, des débris ou d'autres types de cellules⁽¹⁾. La figure 8 présente des photos d'agrégats non spécifiques de spermatozoïdes.

Figure 8. Agrégation non spécifique de spermatozoïdes autour d'une cellule épithéliale (a), avec des débris (b) et avec des spermatozoïdes (c et d).



Source : Cinquième édition du *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Image reproduite avec permission de l'OMS.

Nous recommandons de noter la présence d'agrégats non spécifiques dans le rapport, car celle-ci peut influencer sur la proportion de spermatozoïdes mobiles observée⁽¹⁾. Rapporter comme suit : « **Présence d'agrégats non spécifiques, résultat sous toutes réserves pour la valeur absolue des spermatozoïdes** ».

12.3.3.2 Agglutination

Il s'agit d'amas de spermatozoïdes mobiles liés les uns aux autres par la tête, le cou et/ou le flagelle. L'agglutination est évocatrice de la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes, sans toutefois la confirmer. Seule la recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes peut confirmer une cause immunologique à ce phénomène⁽¹⁾.

La présence de spermatozoïdes mobiles collés à des cellules ou à des débris et celle de spermatozoïdes immobiles collés entre eux (agrégation) ne doit pas être confondue avec l'agglutination. Il faut être particulièrement attentif pour différencier l'agrégation de l'agglutination⁽¹⁾.

La présence d'agglutination doit être notée dans le rapport⁽¹⁾.

12.3.3.3 Cellules rondes

L'expression *cellules rondes* désigne les spermatozoïdes immatures (cellules germinales) et les leucocytes⁽⁵⁰⁾. Les fragments cytoplasmiques anucléés ne sont pas comptés dans cette catégorie⁽⁵⁾.

Il est très rare qu'un éjaculat ne contienne aucune cellule ronde ⁽⁵⁾. Par contre, il devrait normalement en contenir moins de $1,0 \times 10^6/\text{ml}$; une concentration égale ou supérieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ est anormale ⁽¹⁾. Dans le contexte actuel, nous recommandons de considérer la présence de moins de $1,0 \times 10^6$ cellules rondes par ml comme étant normale et de ne pas consigner cette observation dans le rapport.

Le tableau 5 à l'annexe 6 peut servir à estimer si la concentration des cellules rondes dépasse le seuil de 1 million/ml dans un échantillon de 10 μl . Ce tableau ne peut être utilisé que dans les conditions suivantes : 10 μl de sperme frais, entre lame et lamelle de 22 mm x 22 mm, et ouverture de champ du microscope de 20 mm. Si ces conditions diffèrent, il faut adapter le calcul en conséquence à partir de la grille fournie à l'annexe 7.

Si on compte plus de 1×10^6 cellules rondes par ml, rapporter comme suit : « ***> 1 x 10⁶ cellules rondes/ml. Évaluation fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 μl prélevé sur le volume total de l'éjaculat*** ».

En présence de plus de 1×10^6 cellules rondes par ml, la note suivante pourrait fournir plus d'indications à certains prescripteurs : « ***Concentration des leucocytes possiblement > 1 x 10⁶/ml; à valider avec les données cliniques*** ».

Il est recommandé de pousser l'investigation afin de différencier les leucocytes des spermatozoïdes immatures, et de les compter si la concentration de cellules rondes est estimée à $\geq 1,0 \times 10^6/\text{ml}$ ^{(1) (5)}. Comme l'évaluation des cellules rondes à l'état frais est difficile, on les examinera sur la lame colorée à l'examen de la morphologie (voir le point 12.3.8.5). L'utilisation d'images de référence est recommandée ^{(1) (2) (51)}.

On peut également mesurer les concentrations respectives de leucocytes et de spermatozoïdes immatures avec l'hématimètre ^{(1) (2)}. Il peut être nécessaire de faire une autre dilution plus concentrée, car la préparation initiale servant à calculer la concentration de spermatozoïdes peut être trop diluée en cellules rondes.

Certains auteurs recommandent de distinguer les cellules rondes par leur activité peroxydase ^{(1) (50)}. Le groupe de travail est d'avis qu'il s'agit d'un test surspécialisé qui dépasse les besoins de la majorité de nos prescripteurs. Il existe des bandelettes réactives qui détectent les leucocytes et permettent donc cette distinction.

Aucune valeur de référence n'a été trouvée pour la concentration de spermatozoïdes immatures et il n'existe pas de consensus quant à une telle valeur en ce qui a trait à la concentration de leucocytes dans le sperme. Dans les quatre premières éditions du manuel de l'OMS, la valeur seuil définissant la leucospermie s'établissait à $1,0 \times 10^6$ leucocytes par ml et dans la cinquième édition, elle est de $1,0 \times 10^6$ cellules peroxydase positives par ml ⁽¹⁾.

12.3.3.4 Érythrocytes

La présence d'une grande quantité d'érythrocytes est souvent révélée par la couleur rougeâtre (sang frais) ou brunâtre (épanchement sanguin moins récent) du sperme.

Normalement, le sperme ne devrait pas contenir d'érythrocytes. La présence de quelques érythrocytes dans un éjaculat n'a pas nécessairement d'incidence clinique ⁽⁵⁾. Il faut néanmoins la noter dans le rapport. Si moins d'un érythrocyte est observé par HPF, rapporter comme suit : « **Présence de peu d'érythrocytes** ». Si on observe plus d'un érythrocyte par HPF, rapporter comme suit : « **Présence de plusieurs érythrocytes** » ⁽⁵⁾.

Note : Cette estimation est fondée sur l'examen de 10 µl de sperme frais à un grossissement total de 400, entre lame et lamelle de 22 x 22 mm, et ouverture de champ du microscope de 20 mm ⁽⁵⁾.

12.3.3.5 Autres éléments cellulaires ou particuliers

La présence de cellules épithéliales dans le sperme est fréquente et ne peut être associée à aucune anomalie ou infection. On trouve également dans le sperme divers éléments : bactéries, fragments cytoplasmiques anucléés, cristaux ⁽⁵⁾. À moins de concentrations exceptionnelles, ces éléments n'ont pas à être notés dans le rapport.

Généralement, il y a peu de bactéries ou de protozoaires dans le sperme. Leur présence en grand nombre pourrait être due à une infection urogénitale. Le médecin peut alors demander la réalisation d'une spermoculture ⁽⁵⁾.

12.3.4 Évaluation de la motilité

La motilité peut être évaluée manuellement ou à l'aide d'un système CASA. La technique manuelle est décrite ci-dessous. Pour évaluer la motilité avec un système CASA, suivre les recommandations du fabricant. Dans la cinquième édition de son manuel, l'OMS recommande de faire des mesures répétées sur deux échantillons prélevés sur l'éjaculat en évaluant la motilité d'au moins 200 spermatozoïdes par échantillon si ce paramètre est mesuré par système CASA ⁽¹⁾.

12.3.4.1 Préparation et examen des échantillons

Rappelons que la motilité des spermatozoïdes peut être modifiée par une liquéfaction incomplète, mais aussi par le pH du sperme qui augmente au fil du temps ⁽¹⁾.

Pour limiter l'erreur d'échantillonnage à 5 %, l'OMS recommande dans la cinquième édition de son manuel d'évaluer au moins 200 spermatozoïdes par échantillon, dans 2 échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat ⁽¹⁾. L'évaluation de 100 spermatozoïdes par échantillon permet d'obtenir une erreur d'échantillonnage de 7,1 % ⁽¹⁾. Les experts du groupe de travail de l'OPTMQ considèrent que l'évaluation de 100 spermatozoïdes par échantillon distinct et donc une erreur d'échantillonnage de 7,1 % suffisent à assurer la qualité de cette analyse dans le contexte clinique des services de première et de deuxième lignes.

La préparation des échantillons se fait comme suit : homogénéisation de l'éjaculat, prélèvement de 10 µl et évaluation du sperme à l'état frais. Répéter ces étapes pour le deuxième échantillon. ⁽¹⁾. Respecter les instructions décrites au point 12.3.1.

L'examen de l'état frais se fait sous grossissement total de 200 ou 400 ⁽¹⁾. On se servira d'un compteur pour enregistrer le nombre de spermatozoïdes par catégorie de mouvement.

Comme c'est le cas pour l'évaluation de la concentration, on n'évaluera et ne comptera que les spermatozoïdes intacts (ayant une tête et un flagelle). Les spermatozoïdes mobiles en forme de tête d'épingle (*pin head*) sont exclus (voir la figure 9) ⁽¹⁾.

Figure 9. Spermatozoïde en forme de tête d'épingle (partie inférieure de la photo)



Photo prise par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduite avec permission.

- Examiner la lame de manière systématique pour ne pas évaluer la même région plus d'une fois. Changer souvent et aléatoirement de champ de vision. Éviter la tendance naturelle à privilégier les régions qui contiennent plus de spermatozoïdes mobiles. Éviter les champs périphériques qui peuvent commencer à sécher rapidement ⁽¹⁾.
- Évaluer la motilité des spermatozoïdes dans une zone définie (p. ex., diviser le champ en quatre). L'utilisation d'un oculaire à réticule interne (quadrillé) peut faciliter cette division ⁽¹⁾.
- Commencer le comptage à un moment aléatoire sans attendre qu'un spermatozoïde mobile entre dans la zone de comptage définie ⁽¹⁾.

12.3.4.2 Catégories de mouvement

La motilité est exprimée par la proportion (pourcentage) de spermatozoïdes classés dans chacune des catégories de mouvement suivantes ⁽¹⁾ :

- Motilité progressive (PR) : les spermatozoïdes se déplacent (en ligne droite, en zigzag ou en formant de grands cercles) peu importe leur vitesse.
- Motilité non progressive (NP) : les spermatozoïdes qui bougent, mais dont les mouvements ne permettent pas le déplacement (petits cercles, faibles battements déplaçant à peine la tête, battements de flagelle seulement).
- Immobiles (IM) : les spermatozoïdes ne font aucun mouvement.

À l'évaluation de la motilité, il importe de distinguer la motilité progressive (PR) de la motilité totale (PR+NP, qui doit aussi évaluer 100 % - IM) ^{(1) (5)}.

12.3.4.3 Dénombrement des spermatozoïdes par catégorie

- Il faut visualiser et compter rapidement. Idéalement, on se fera une image mentale instantanée de la zone de comptage (définie dans le champ de vision). Compter d'abord les spermatozoïdes progressifs (PR), puis les spermatozoïdes non progressifs (NP) et, enfin, les spermatozoïdes immobiles (IM) dans la zone de comptage définie. Avec l'expérience, on peut arriver à compter les trois catégories de mouvements en même temps et à définir des zones de comptage plus grandes ⁽¹⁾.
- Il est essentiel de terminer le comptage des trois catégories dans la zone de comptage définie, même si le nombre total de 100 spermatozoïdes est atteint, sous peine de biaiser le résultat en faveur des spermatozoïdes mobiles ⁽¹⁾. Répéter pour le deuxième échantillon.
- Calculer le pourcentage par catégorie de mouvement (PR, NP, IM) dans chacun des échantillons.
- Noter le pourcentage moyen par catégorie de mouvement dans le rapport.

Exemple :

Premier échantillon	Deuxième échantillon	Moyenne
PR : 54 %	PR : 50 %	PR : 52 %
NP : 26 %	NP : 32 %	NP : 29 %
IM : 20 %	IM : 18 %	IM : 19 %

12.3.4.4 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesure entre les échantillons

Calculer l'écart de pourcentage entre les mesures des deux échantillons pour la catégorie de motilité la plus fréquente, et vérifier s'il est acceptable, en consultant le tableau 6 de l'annexe 8⁽¹⁾.

Exemple :

Catégorie PR : 1^{er} échantillon : 54 % et 2^e échantillon : 50 %

Écart de 4 % et moyenne de 52 %

D'après le tableau 6 de l'annexe 8, l'écart acceptable maximal est de 14 %. L'écart est de 4 % donc acceptable.

Si l'écart est trop grand, réévaluer la motilité dans deux nouveaux échantillons en prenant soin de bien homogénéiser l'échantillon. Répéter cette procédure jusqu'à deux fois (donc trois séries de deux échantillons). Si l'écart est encore trop grand après trois séries, calculer la moyenne des six valeurs pour chaque catégorie de mouvement et ajouter une note à ce sujet au rapport⁽¹⁾.

12.3.4.5 Valeurs de référence

Voici les valeurs de référence pour la motilité⁽¹⁾ :

- motilité totale : (PR+NP) : ≥ 40 %
- motilité progressive (PR) : ≥ 32 %

Ces valeurs correspondent au 5^e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS⁽¹⁾.

On parle d'asthénozoospermie lorsque la motilité des spermatozoïdes est sous la limite inférieure de référence⁽¹⁾.

Si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, il est conseillé de seulement rapporter le nombre de spermatozoïdes mobiles par rapport aux spermatozoïdes non mobiles examinés, car le pourcentage observé peut être discutable.

12.3.5 Vitalité

La vitalité (évaluation de la viabilité) correspond au pourcentage de spermatozoïdes vivants ⁽¹⁾. Son évaluation sert essentiellement à vérifier si les spermatozoïdes immobiles sont vivants (syndrome de Kartagener, dyskinésie ciliaire). Il permet aussi de valider la motilité. Un spermatozoïde mobile étant habituellement vivant, la vitalité devrait normalement être supérieure ou égale à la motilité totale ⁽⁵⁾.

Note : Les termes *vitalité* et *viabilité* sont quasi synonymes et renvoient au pourcentage de spermatozoïdes vivants dans le sperme. Les termes *survie* ou *test de survie* renvoient pour leur part à l'examen des variations de motilité après incubation ou préparation du sperme en vue d'un traitement de fertilité (p. ex., IIU, FIV ou IICS) ⁽⁵⁾. Les tests de survie sont principalement effectués dans les laboratoires de troisième ligne qui offrent la FIV.

Dans son manuel, l'OMS propose d'évaluer la vitalité lorsque la motilité des spermatozoïdes progressifs est inférieure à 40 % ⁽¹⁾. La décision d'effectuer ou non cette analyse doit être prise de concert avec les utilisateurs des services du laboratoire. Il faut savoir que, si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, la pertinence de l'évaluation de la vitalité peut être mise en doute.

12.3.5.1 Préparation et examen des échantillons

L'évaluation de la vitalité repose sur le principe de la perméabilité de la membrane du spermatozoïde mort. La tête du spermatozoïde mort devient rose ou rouge quand on la colore à l'éosine-nigrosine, tandis que le spermatozoïde vivant ne prend pas le colorant et reste blanc. La moyenne des résultats obtenue avec les deux échantillons est exprimée en pourcentage de spermatozoïdes vivants dans le rapport ⁽¹⁾.

Il existe des préparations prêtes à l'emploi (colorants) en vue de l'évaluation de la vitalité. Plusieurs ouvrages de référence proposent également des protocoles de coloration ^{(1) (2) (5)}. L'annexe 9 présente le protocole de coloration à l'éosine-nigrosine détaillé dans la cinquième édition du manuel de l'OMS, en vue de l'évaluation de la vitalité.

Pour limiter l'erreur d'échantillonnage à 5 %, l'OMS recommande dans la cinquième édition de son manuel d'évaluer au moins 200 spermatozoïdes par échantillon, dans 2 échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat ⁽¹⁾. Dans ses recommandations, le groupe de travail sur l'andrologie relevant de l'ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) a remis en question la nécessité d'examiner 400 spermatozoïdes en tout ⁽⁵²⁾. L'évaluation de 100 spermatozoïdes par échantillon permet d'obtenir une erreur d'échantillonnage de 7,1 % ⁽¹⁾. Les experts du groupe de travail de l'OPTMQ considèrent que l'évaluation de 100 spermatozoïdes (répétée dans 2 échantillons distincts) et donc une erreur d'échantillonnage de 7,1 % suffisent à assurer la qualité de cette analyse dans le contexte clinique des services de première et de deuxième lignes.

Si les spermatozoïdes sont peu nombreux, on peut en compter moins que 100 par échantillon (p. ex., 50 par échantillon). Rapporter le résultat sous forme de pourcentage et ajouter la note suivante au rapport : « *Résultat sous toutes réserves; évaluation effectuée sur X spermatozoïdes au lieu de 200* ».

12.3.5.2 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons

Le tableau 6 de l'annexe 8 peut servir à vérifier l'acceptabilité des écarts de pourcentage entre les deux échantillons ⁽¹⁾.

12.3.5.3 Valeurs de référence

La vitalité est considérée normale si plus de 58 % de spermatozoïdes sont vivants. Le pourcentage de cellules mortes ne doit pas excéder le pourcentage de cellules immobiles. L'écart acceptable entre cellules mortes et immobiles est de 10 % (tableau 6 de l'annexe 8). Par ailleurs, il est normal que le pourcentage de cellules vivantes excède le pourcentage de cellules mobiles ⁽¹⁾.

12.3.6 Évaluation manuelle de la concentration et du nombre de spermatozoïdes

Il importe de distinguer la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat (valeur absolue). La concentration désigne le nombre de spermatozoïdes, exprimé en millions, dans un millilitre ($n^{\text{bre}} \times 10^6/\text{ml}$) d'éjaculat. La valeur absolue désigne le nombre de spermatozoïdes dans l'échantillon complet et se calcule en multipliant la concentration des spermatozoïdes par le volume de l'éjaculat⁽¹⁾.

La concentration et la valeur absolue des spermatozoïdes sont toutes deux considérées comme de bons indicateurs des chances de conception. Toutefois, la valeur absolue constitue un meilleur indicateur de la fonction testiculaire, car, contrairement à la concentration, elle ne dépend pas du volume de sécrétions produites par les glandes accessoires. Il faut tenir compte de la différence entre ces deux paramètres si l'échantillon de sperme est obtenu par électrostimulation (chez les hommes atteints de lésions à la moelle épinière), produit après une abstinence prolongée (plus de 7 jours) ou produit par un patient atteint d'éjaculation rétrograde⁽¹⁾.

Il faut savoir que, si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, la pertinence de l'évaluation de la vitalité et de la morphologie peut être mise en doute.

Il existe sur le marché divers types de chambres de comptage qui servent toutes au même usage : faire le compte des spermatozoïdes aussi précis que possible dans un volume de sperme connu (dilué ou non). L'hématimètre de Neubauer demeure la chambre de comptage de référence pour évaluer manuellement la concentration des spermatozoïdes et la seule dont l'utilisation sera décrite dans le présent guide^{(1) (5)}.

12.3.6.1 Hématimètre de Neubauer

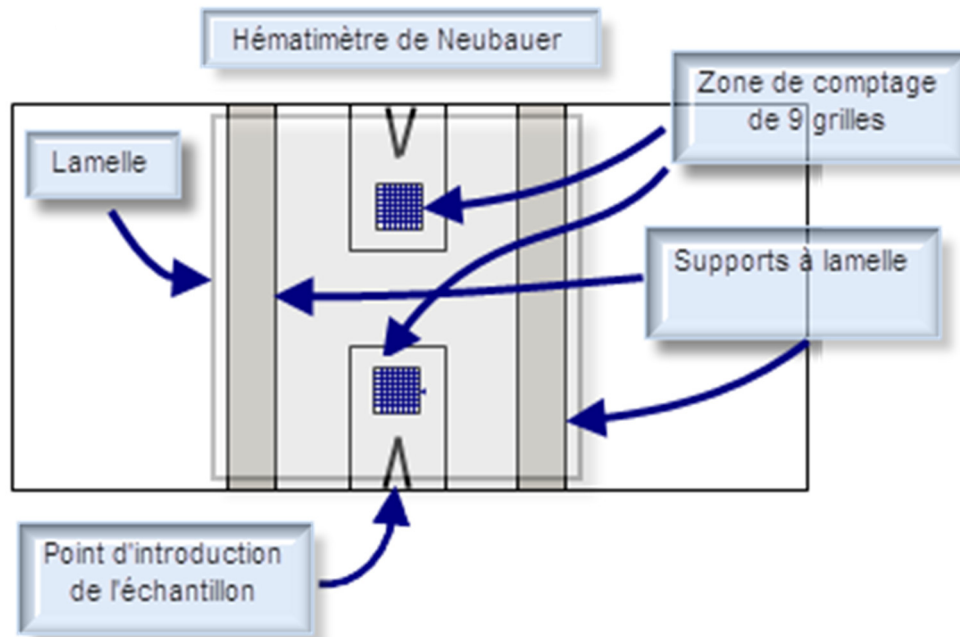
L'hématimètre de Neubauer est composé de deux chambres de comptage séparées, comprenant chacune une zone de comptage de 3 mm x 3 mm subdivisée en 9 grilles de 1 mm x 1 mm, chacune étant composée de carrés de taille connue (voir les figures 10 et 11). Il est utilisé avec une lamelle spéciale (épaisseur n° 4, de 0,44 mm) déposée sur un support intégré permettant d'obtenir un étalement d'épaisseur constante de 0,1 mm. En multipliant la surface d'un carré par l'épaisseur de l'étalement, on peut obtenir le volume de sperme dans ce carré (voir la figure 13 à la page 48) et calculer la concentration en divisant le nombre de spermatozoïdes dénombrés dans un volume connu (concentration = nombre/volume)⁽¹⁾.

Note : $1 \text{ mm}^3 = 0,001 \text{ ml} = 1 \mu\text{l}$.

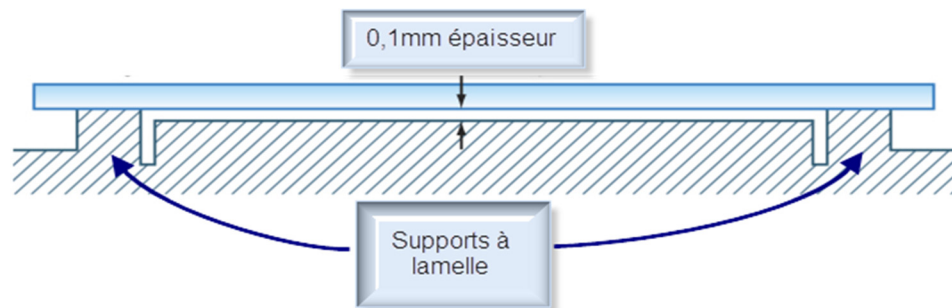
Il faut compter les spermatozoïdes sur différentes sections de la zone de comptage, suivant la dilution effectuée et le nombre de spermatozoïdes à compter par échantillon ⁽¹⁾.

Figure 10. Hématimètre de Neubauer.

a) Vue de dessus.

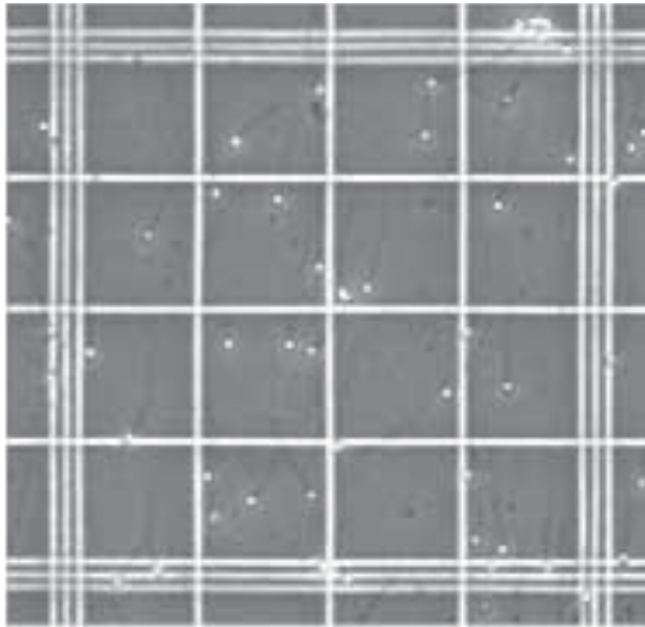


b) Vue de côté



Dessins de Marc Bronsard et d'Ann Villeneuve, embryologistes, au CHUS, CIUSSS de l'Estrie.

Figure 11. Un des 25 carrés de la zone de comptage centrale (grille C de la figure 13, page 48) subdivisé en 16 autres carrés et bordé de 3 lignes parallèles.



Source : cinquième édition du *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Image reproduite avec permission de l'OMS.

12.3.6.2 Choix de la dilution appropriée à l'évaluation de la concentration sur l'hématimètre de Neubauer

Le sperme examiné sur l'hématimètre de Neubauer doit être dilué pour les raisons suivantes :

- immobiliser les spermatozoïdes,
- favoriser l'étalement par capillarité sous la lamelle en rendant le sperme moins visqueux,
- faciliter le dénombrement quand les spermatozoïdes sont très nombreux et se superposent,
- faciliter le dénombrement quand l'échantillon contient beaucoup de débris.

Le nombre de spermatozoïdes par champ, évalué dans 10 µl de sperme à l'état frais étalé sous une lamelle de 22 mm x 22 mm (voir le point 12.3.1), guide le choix de la dilution appropriée au montage de l'hématimètre de Neubauer (tableau 1) en vue de compter au moins 100 spermatozoïdes par échantillon. Dans son manuel, l'OMS propose de faire la dilution avec une préparation de réactif⁽¹⁾, mais l'eau froide fait tout aussi bien l'affaire⁽⁵³⁾.

Tableau 1. Dilutions appropriées à l'évaluation de la concentration sur l'hématimètre de Neubauer

N ^{bre} de spermatozoïdes par champ, facteur de grossissement de 400	Dilution	Sperme (µl)	Diluant (µl)
Rare	1 : 2	100	100
Moins de 15	1 : 5	100	400
De 15 à 40	1 : 10	50	450
De 41 à 200	1 : 20	50	950
Plus de 200	1 : 50	50	2450

Tableau fourni par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduit et adapté avec permission.

12.3.6.3 Homogénéisation et dilution de l'éjaculat

Étant donné la nature visqueuse du sperme et le volume relativement faible des échantillons dilués, il est primordial de bien homogénéiser le sperme avant de prélever le volume désiré pour faire la dilution (voir le point 12.1). Il est aussi fortement recommandé d'utiliser une pipette à déplacement positif pour prélever de petits volumes de sperme, car les pipettes automatiques standard (fonctionnant par déplacement de l'air) ne sont pas considérées assez précises pour la dilution volumétrique de liquides visqueux comme le sperme ⁽¹⁾ ⁽⁵⁾. Bien que l'on recommande de préparer des échantillons d'au moins 50 µl de sperme pour faire les dilutions, afin de limiter l'erreur d'échantillonnage sur des petits volumes visqueux ⁽¹⁾, ce n'est pas toujours possible compte tenu des pipettes à déplacement positif disponibles dans les laboratoires.

Les deux chambres de comptage de l'hématimètre de Neubauer permettent de faire le comptage sur deux échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat. Pour diminuer le risque d'erreur, on dilue les deux échantillons séparément, dans deux tubes différents (c.-à-d. que l'on ne remplit pas les deux chambres de comptage avec des échantillons provenant d'une même dilution, et on n'effectue pas le comptage deux fois dans la même chambre, sinon on ne pourrait pas détecter les erreurs d'échantillonnage, d'homogénéisation ou de dilution) ⁽¹⁾.

Les dilutions peuvent être faites dans des tubes de 5 ml propres (verre ou plastique). Déposer d'abord le diluant, puis le sperme dans le tube de dilution. Avant de transférer le liquide ou le sperme dans le tube de dilution, essuyer l'extérieur de la pipette en prenant soin de ne pas toucher l'ouverture de l'embout pour ne pas absorber de liquide avec le papier. Pour récupérer tout le sperme, rincer l'embout de la pipette dans le diluant en aspirant et en expulsant à quelques reprises ⁽¹⁾.

Si on prévoit un délai entre la préparation de la dilution et le montage de l'hématimètre, il faut prendre des précautions pour éviter l'évaporation.

12.3.6.4 Montage de l'hématimètre et sédimentation des spermatozoïdes

Bien mélanger la première dilution en l'agitant une dizaine de secondes ou à la pipette. Prélever immédiatement 10 µl de la dilution et porter le bout de la pipette au point d'introduction de l'hématimètre sans toucher la lamelle. Faire attention de ne pas surcharger ni de soulever la lamelle, sous peine de modifier l'épaisseur de l'étalement ⁽¹⁾.

Répéter l'opération avec la deuxième dilution dans la seconde chambre ⁽¹⁾. Manipuler délicatement l'hématimètre pour éviter de déplacer la lamelle et le déposer à l'horizontale dans une chambre humide.

Laisser sédimenter les spermatozoïdes à la température ambiante pendant au moins 4 minutes, mais pas plus de 15 minutes, sinon la préparation va sécher et la concentration des spermatozoïdes s'en trouvera plus élevée ^{(1) (2) (5)}.

12.3.6.5 Comptage des spermatozoïdes dans chacun des échantillons préparés

Procéder au dénombrement sans délai ni interruption dès que l'hématimètre sort de la chambre humide ⁽¹⁾.

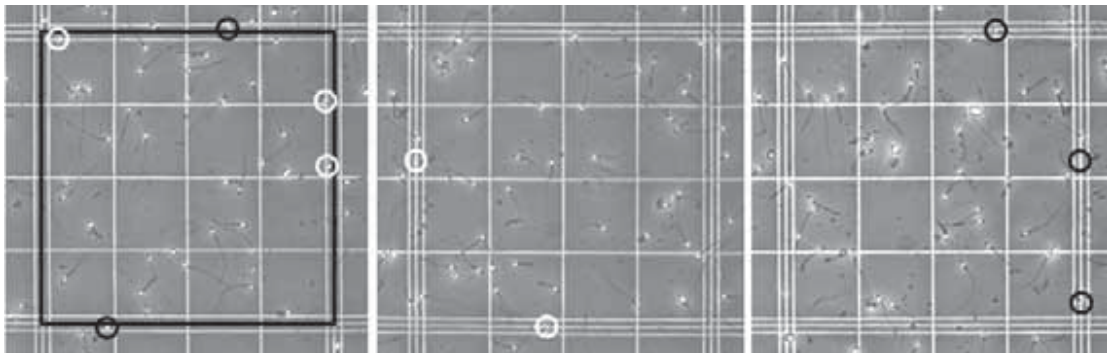
Pour limiter l'erreur d'échantillonnage à 5 %, l'OMS recommande dans la cinquième édition de son manuel d'évaluer au moins 200 spermatozoïdes par échantillon, dans 2 échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat ⁽¹⁾. L'examen de 100 spermatozoïdes par échantillon permet d'obtenir une erreur d'échantillonnage de 7,1 % ⁽¹⁾. Les experts du groupe de travail de l'OPTMQ considèrent que l'évaluation de 100 spermatozoïdes par échantillon et donc une erreur d'échantillonnage de 7,1 % suffisent à assurer la qualité de cette analyse dans le contexte clinique des services de première et de deuxième lignes.

Le dénombrement se fait sous grossissement total de 200 ou 400, de préférence avec un microscope à contraste de phase. On se servira d'un compteur pour le dénombrement. Comme dans le cas de l'évaluation de la motilité, on n'évaluera et ne comptera que les spermatozoïdes intacts (ayant une tête et un flagelle). Les spermatozoïdes en forme de tête d'épingle (*pin head*) sont exclus de l'évaluation ⁽¹⁾.

La décision de compter un spermatozoïde ou non dépend de la position de sa tête, sans égard pour l'orientation du flagelle. La limite d'un carré correspond à la ligne centrale des trois lignes parallèles qui en bordent les côtés. On compte le spermatozoïde si la plus grande partie de sa tête se trouve entre les deux lignes internes de la bordure à trois lignes. On ne le compte pas si la plus grande partie de sa tête se trouve entre les deux lignes externes de la bordure à trois lignes ⁽¹⁾.

Si la plus grande partie de la tête du spermatozoïde se trouve sur la ligne centrale, on ne comptera que les spermatozoïdes touchant les bordures de deux côtés du carré, par convention, le côté gauche et le côté inférieur (figure 12), pour éviter de compter le même spermatozoïde deux fois dans des carrés adjacents ⁽¹⁾.

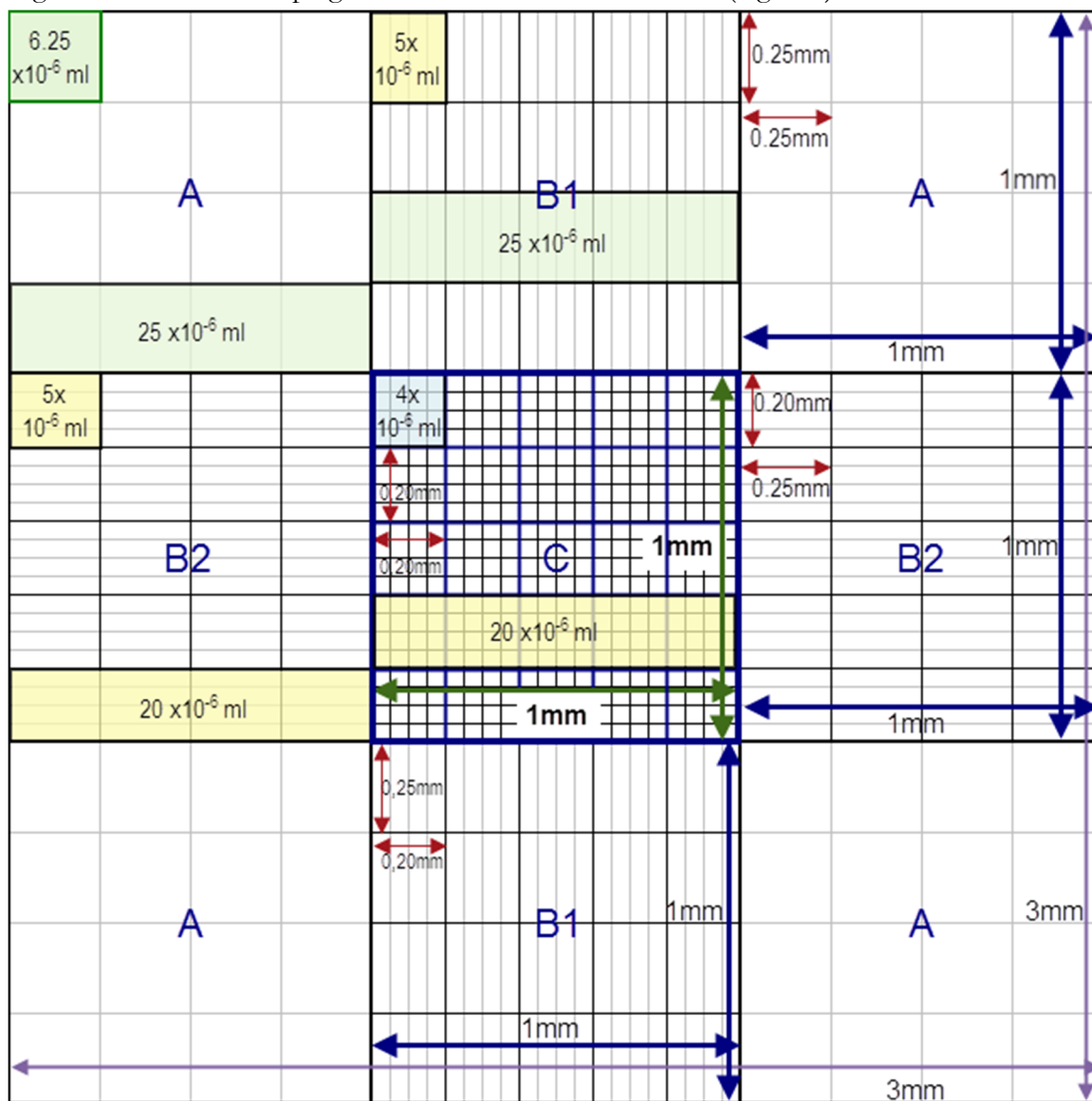
Figure 12. Spermatozoïdes à compter dans une grille (délimitée par une bordure à 3 lignes). Pour compter les spermatozoïdes touchant les bordures de la grille, voir explications ci-dessus. Les spermatozoïdes encadrés en noir ne sont pas comptés alors que les spermatozoïdes encadrés en blanc le sont.



Source : cinquième édition du *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*). Image reproduite avec permission de l'OMS.

Compter les spermatozoïdes dans 5, 10 ou 25 carrés de la grille C (voir la figure 13) jusqu'à concurrence d'au moins 100 spermatozoïdes (maximum de 25 carrés, que l'on atteigne 100 spermatozoïdes ou non)⁽⁵⁾. Passer à la deuxième chambre de comptage de l'hématimètre et compter les spermatozoïdes dans le même nombre de carrés de la grille C (donc le même volume) que pour le premier échantillon⁽¹⁾, même si le nombre final de spermatozoïdes comptés est inférieur à 100. Chaque carré de la grille C a un volume de 4×10^{-6} ml.

Figure 13. Zone de comptage de l'hématimètre de Neubauer (9 grilles)



Dessin de Marc Bronsard et d'Ann Villeneuve, embryologistes, CHUS, CIUSSS de l'Estrie. Reproduit avec permission.

Toutefois, si on compte moins de 100 spermatozoïdes par échantillon dilué à 1 : 2, l'erreur d'échantillonnage sera plus grande et le degré de certitude, plus faible. Dans ce cas, il faut examiner les 9 grilles des 2 chambres de comptage pour tenter d'obtenir une erreur d'échantillonnage acceptable (20 %) ⁽¹⁾. Voir le tableau 7 de l'annexe 8 pour se renseigner sur l'erreur d'échantillonnage suivant le nombre de spermatozoïdes comptés.

12.3.6.6 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons

Calculer la somme et la différence des deux comptes ⁽¹⁾ (p. ex., 1^{er} échantillon : 126 spermatozoïdes dans 10 carrés de la grille C; 2^e échantillon 134 spermatozoïdes dans 10 carrés de la grille C de la deuxième chambre, totalisant 260. Différence entre les deux comptes : 8).

Établir l'acceptabilité de l'écart entre les nombres en consultant le tableau 8 de l'annexe 8 ⁽¹⁾.

Exemple. : Pour 260 spermatozoïdes, la différence acceptable est de 32; la différence obtenue ici, de 8, étant inférieure à 32, est acceptable et on peut passer au calcul de la concentration.

Si la différence est trop grande pour être acceptée, l'OMS recommande de refaire les deux dilutions en prenant soin de bien homogénéiser le sperme à chaque étape, et de refaire le comptage. Répéter cette procédure jusqu'à deux fois (trois séries de deux échantillons). Si l'écart est encore trop grand après trois séries (éjaculat particulièrement visqueux et hétérogène), faire la moyenne des six nombres obtenus et ajouter une note à ce sujet au rapport ⁽¹⁾.

12.3.6.7 Calcul de la concentration

La concentration (C) de spermatozoïdes est égale au nombre (N) de spermatozoïdes divisé par le volume (V) de sperme dans lequel ils ont été comptés, multiplié par le facteur de dilution (D) ⁽¹⁾.

Exemple :

- D = 20 (dilution de 1 : 20).
- N = 260 (1^{re} chambre = 126, 2^e chambre = 134).
- V = 10 carrés (x 2 échantillons) de 4×10^{-6} ml chacun, totalisant 80×10^{-6} ml.
- $C = (N/V) \times D$ ($260/80 \times 10^{-6}$) $\times 20 = 65 \times 10^6$ par ml.

Pour calculer plus rapidement la concentration, on peut consulter le tableau 2 afin d'établir le facteur de division à appliquer suivant le nombre de carrés compris dans le comptage et la dilution effectuée.

Tableau 2. Facteurs de division à appliquer au nombre total de spermatozoïdes comptés dans les deux chambres pour calculer la concentration (en $\times 10^6/\text{ml}$)

Dilution	N ^{bre} de carrés de la grille C (de chaque chambre) compris dans le comptage			9 grilles (de chaque chambre) comprises dans le comptage
	5	10	25	
	Facteur de division			
1 : 2	20	40	100	900
1 : 5	8	16	40	360
1 : 10	4	8	20	180
1 : 20	2	4	10	90
1 : 50	0,8	1,6	4	36

Tableau fourni par Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduit avec permission.

Reprenons l'exemple précédent :

- $N = 260$ (2 chambres)
- Facteur de division = 4 (intersection de la colonne 10 carrés et de la ligne dilution de 1 : 20)
- $N/\text{Facteur de division} = C$
- $260/4 = 65$
- $C = 65 \times 10^6/\text{ml}$

12.3.6.8 Limite de détection

La méthode proposée comporte une limite de détection de 56 000 spermatozoïdes par ml (pour que l'erreur d'échantillonnage ne dépasse pas 20 %). Donc, cette méthode est imprécise s'il y a moins de 25 spermatozoïdes par chambre de comptage (total de 50 spermatozoïdes)⁽¹⁾.

Si on compte moins de 50 spermatozoïdes en tout (avec une dilution de 1 : 2), rapporter comme suit :
« < 56 000 spermatozoïdes/ml, nombre insuffisant pour établir avec précision la concentration et la valeur absolue »⁽¹⁾.

Si aucun spermatozoïde n'est observé, rapporter comme suit :
« Aucun spermatozoïde observé à l'hématimètre, nombre insuffisant pour établir avec précision la concentration et la valeur absolue (< 56 000 spermatozoïdes/ml) »⁽¹⁾.

12.3.6.9 Calcul de la valeur absolue

La valeur absolue (Va) désigne le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat complet. Elle est égale à la concentration (C) multipliée par le volume de l'éjaculat (Ve) ⁽¹⁾.

Exemple :

Si,

$V_e = 2,5 \text{ ml}$

Et que,

$C = 32 \times 10^6/\text{ml}$

Alors,

$V_a = 2,5 \times (32 \times 10^6) = 80 \times 10^6$

12.3.6.10 Valeurs de référence

La valeur de référence quant à la concentration de spermatozoïdes est égale ou supérieure à $15 \times 10^6/\text{ml}$ (correspond au 5^e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS) ⁽¹⁾.

Dans le cas de la valeur absolue, la valeur de référence est égale ou supérieure à $39 \times 10^6/\text{éjaculat}$ ⁽¹⁾ (correspond au 5^e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS).

12.3.6.11 Manipulations additionnelles

Mise en garde : Les manipulations présentées ci-dessous ne doivent jamais servir à établir un diagnostic d'azoospermie ^{(29) (54)}.

Si aucun spermatozoïde n'est observé (manuellement ou avec système CASA), on devrait centrifuger tout l'éjaculat à 3000 g pendant 15 minutes afin de valider ce résultat, selon le contexte clinique. Par contre, après la centrifugation à une telle force, il n'est plus possible de savoir si les spermatozoïdes étaient mobiles auparavant ^{(1) (55)}.

Examiner deux échantillons de 10 µl du culot entre lame et lamelle (22 mm x 22 mm) à un facteur de grossissement total de 400 ⁽¹⁾. Le surnageant peut être conservé en vue du dosage du fructose.

En l'absence de spermatozoïdes, rapporter comme suit :
« Aucun spermatozoïde observé dans le sperme à l'état frais et dans 2 échantillons de 10 µl de sperme centrifugé ».

Si des spermatozoïdes sont observés dans le culot, rapporter comme suit : **« Présence de spermatozoïdes (préciser s'ils sont mobiles ou immobiles) dans 2 échantillons de 10 µl de sperme centrifugé. La centrifugation peut rendre impossible l'évaluation de la motilité ».**⁽¹⁾

Si on n'effectue pas de centrifugation, rapporter comme suit :
« Aucun spermatozoïde observé dans 10 µl de sperme à l'état frais ».

En l'absence de spermatozoïdes, on peut également réaliser une vérification supplémentaire en examinant la lame colorée (voir le point 12.3.8).

12.3.6.12 Entretien de l'hématimètre

Il est important de bien nettoyer l'hématimètre et la lamelle, puis de les essuyer délicatement avec un papier lentille pour retirer tout spermatozoïde ou débris résiduel pouvant nuire à l'étalement d'un prochain échantillon ⁽¹⁾. Il est aussi recommandé de désinfecter (p. ex., à l'hypochlorite de sodium à 0,1 % ⁽¹⁾, à l'alcool à 70 % ou au peroxyde d'hydrogène à 6 %) régulièrement le matériel pour limiter le risque de contamination par des agents infectieux que le sperme pourrait contenir. Enfin, il faut rincer la chambre à l'eau pour enlever le désinfectant ⁽¹⁾.

12.3.7 Évaluation de la concentration des spermatozoïdes avec un système CASA

Comme c'est le cas pour tout analyseur, il importe de considérer tout résultat affiché par cet appareil avec un esprit critique et de suivre les recommandations du fabricant.

Par exemple, si les résultats affichés par l'appareil diffèrent beaucoup de l'évaluation du nombre, de la motilité ou de la progression faite à l'œil par l'opérateur, il est recommandé de valider le résultat manuellement. Une vérification manuelle s'impose également si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à deux millions par ml ⁽¹⁾. Ce seuil peut différer selon le type d'appareil utilisé.

Si le nombre de spermatozoïdes atteint la limite supérieure de linéarité, il est recommandé de faire une autre dilution fondée sur la concentration obtenue et de répéter la numération sur cette dilution ⁽¹⁾.

Il est toujours possible de faire un dénombrement champ par champ afin de vérifier la répartition des spermatozoïdes. Comme dans le cas pour l'évaluation manuelle, il faut s'assurer que la liquéfaction est complète et que l'éjaculat est bien homogénéisé.

12.3.8 Évaluation de la morphologie (spermocytogramme)

Cette évaluation a pour but de distinguer les spermatozoïdes normaux et anormaux. L'examen morphologique du spermatozoïde est difficile à standardiser puisque l'évaluation est subjective et dépend de la perception de l'observateur. La différence entre cellules normales et anormales est parfois très évidente, mais assez souvent à peine perceptible. Depuis la publication de la cinquième édition du manuel de l'OMS, au moins 4 % des spermatozoïdes doivent avoir une forme normale. On peut également calculer l'index de tératozoospermie à partir des critères stricts de Tygerberg, fondés sur le nombre d'anomalies par spermatozoïde ⁽¹⁾ ⁽⁵⁶⁾. Cet index est habituellement rapporté par des laboratoires plus spécialisés.

Il faut savoir que, si la concentration de spermatozoïdes est inférieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, la pertinence de l'évaluation de la morphologie peut être mise en doute.

L'usage du système CASA pour évaluer la morphologie est présentement critiqué ⁽⁵⁷⁾ ⁽⁵⁸⁾. En effet, l'opérateur qui se sert d'un système CASA à cette fin doit avoir une connaissance approfondie du système et être en mesure d'effectuer tous les réglages nécessaires pour assurer la qualité de l'évaluation morphologique ⁽¹⁾.

12.3.8.1 Préparation du frottis en vue de l'évaluation morphologique

Il est recommandé de faire deux frottis en déposant 10 µl d'éjaculat homogénéisé sur la lame (2 échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat) ⁽¹⁾.

Le frottis doit être aussi régulier que possible, ni trop mince, ni trop épais. Il doit être séché à l'air ⁽¹⁾.

12.3.8.2 Coloration du frottis

La coloration doit permettre de bien distinguer les différentes parties du spermatozoïde : la tête (composée de l'acrosome et de la région post-acrosomique), la pièce intermédiaire et le flagelle ainsi que les vacuoles s'il en a (figure 14) ⁽¹⁾.

La technique de coloration doit inclure une étape de fixation (p. ex., au méthanol) ou un autre moyen d'empêcher les spermatozoïdes de décoller de la lame ⁽¹⁾.

Voici quelques-unes des nombreuses colorations existantes :

- Papanicolaou (hématoxyline de Harris) (méthode de référence) ⁽⁵⁶⁾

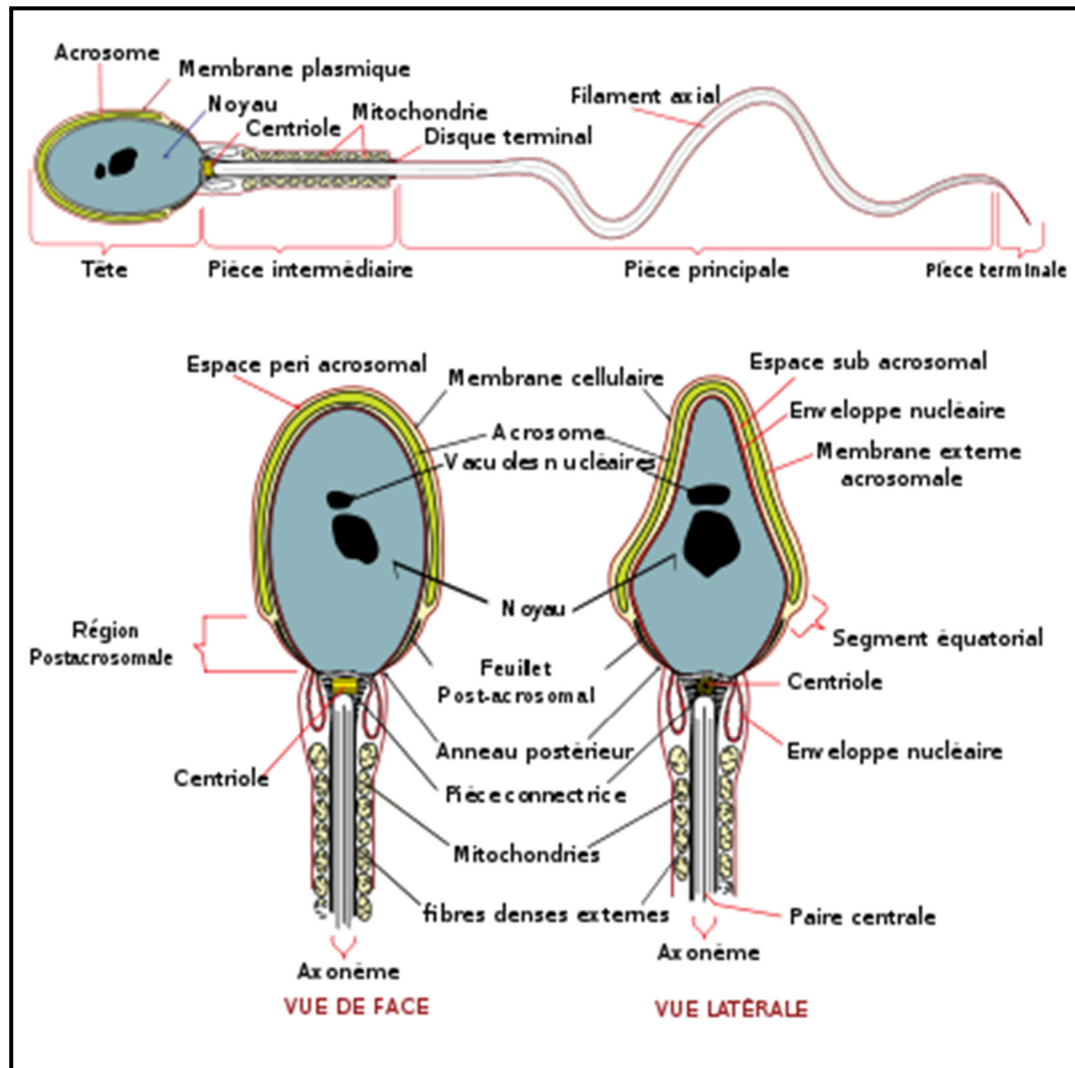
- H&E (hématoxyline et éosine)
- Shorr
- Diff-Quick (bleu de méthylène-éosine).

Il existe également d'autres préparations commerciales prêtes à l'emploi qui peuvent donner des résultats comparables. Il faut toutefois en valider les résultats en les comparant à ceux de la méthode de référence.

12.3.8.3 Évaluation morphologique des spermatozoïdes

Le spermatozoïde est une cellule haploïde (qui contient un seul exemplaire de chaque chromosome) qui mesure 50 à 60 μm de longueur et qui est constituée de trois parties distinctes : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle (figure 14) ⁽²⁾.

Figure 14. Morphologie normale du spermatozoïde



Source : Wikipédia

(https://fr.wikipedia.org/wiki/Spermatozo%C3%AFde#/media/File:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_fr.svg)

La tête est ovale et de contour régulier. Elle comprend deux grands éléments : le noyau, qui renferme le matériel génétique (ADN) condensé sous forme de chromatine, et l'acrosome, qui occupe entre 40 et 70 % de la tête ⁽¹⁾. L'acrosome est chargé d'enzymes hydrolytiques capables de percer la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation ^{(5) (59)}.

La pièce intermédiaire très concentrée en mitochondries fabrique l'énergie nécessaire au mouvement flagellaire. Elle est centrée sur l'axe longitudinal de la tête. En présence de goutte (reste) cytoplasmique plus petite que le tiers de la surface de la tête, la pièce intermédiaire est considérée normale ^{(1) (60)}.

Le flagelle est mince, non enroulé et a un contour bien défini. Il permet au spermatozoïde de se déplacer à une vitesse normale allant de 20 à 25 µm/s ^{(2) (60)}.

L'examen de la préparation s'effectue sous grossissement total de 1000 en immersion à l'huile. Pour faire une bonne évaluation, il faut que le spermatozoïde soit isolé, c'est-à-dire que l'on puisse en examiner chaque partie et qu'aucun débris cellulaire ou agglutinat n'obstrue le champ ⁽¹⁾.

Pour limiter l'erreur d'échantillonnage à 5 %, l'OMS recommande dans la cinquième édition de son manuel d'évaluer au moins 200 spermatozoïdes par échantillon, dans 2 échantillons distincts prélevés sur l'éjaculat ⁽¹⁾. Dans ses recommandations, le groupe de travail sur l'andrologie relevant de l'ESHRE a remis en question la nécessité d'examiner 400 spermatozoïdes en tout ⁽⁵²⁾. L'examen de 100 spermatozoïdes dans 2 échantillons permet d'obtenir une erreur d'échantillonnage de 7,1 % ⁽¹⁾. Les experts du groupe de travail de l'OPTMQ considèrent que l'évaluation de 100 spermatozoïdes par échantillons et donc une erreur d'échantillonnage de 7,1 % suffisent à assurer la qualité de cette analyse dans le contexte clinique des services de première et de deuxième lignes.

Les spermatozoïdes sont classés selon qu'ils sont normaux ou anormaux à l'aide d'un compteur manuel. Les résultats s'expriment en pourcentage.

L'annexe 10 présente une façon d'établir si les spermatozoïdes observés sont anormaux ou normaux. Elle permet également de classer le type d'anomalie observée, mais une telle distinction n'est pas couramment effectuée dans les laboratoires de première et de deuxième lignes. Pour voir d'autres images de spermatozoïdes colorés à l'hématoxyline, consulter le *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* ⁽¹⁾.

12.3.8.4 Vérification de l'acceptabilité des écarts de mesures entre les échantillons

Calculer l'écart de pourcentage de spermatozoïdes normaux entre les deux échantillons. Le tableau 6 de l'annexe 8 présente les écarts acceptables fixés par l'OMS ⁽¹⁾.

Exemple 1 (avec tableau 6) :

Spermatozoïdes normaux : 1^{er} échantillon: 4 % et
2^e échantillon : 6 %

Écart de 2 % et moyenne de 5 %

Selon le tableau 6 de l'annexe 8, l'écart acceptable maximal est de 7%. L'écart de 2 % est donc acceptable.

Toutefois, le groupe de travail de l'OPTMQ est d'avis qu'il faudrait appliquer un écart plus étroit (p. ex., ne dépassant pas 2 % entre deux échantillons) quand un des deux ou les deux contiennent moins de 4 % de spermatozoïdes normaux.

Exemple 2 (avec écart plus étroit):

Spermatozoïdes normaux : 1^{er} échantillon: 1 % et
2^e échantillon : 5 %

Écart de 4 % et moyenne de 3 %

Si on applique un écart plus étroit (p. ex., ne dépassant pas 2 %), l'écart de 4 % est inacceptable.

Si l'écart est trop élevé, refaire l'évaluation morphologique sur les deux lames ⁽¹⁾.

Si l'éjaculat est très visqueux (étirement de plus de 6 cm), il peut être nécessaire de faire un ou plusieurs frottis additionnels.

12.3.8.5 Différenciation des cellules rondes sur lame colorée

À l'examen des deux lames colorées, on peut également observer les cellules rondes, et distinguer les leucocytes des spermatozoïdes immatures (voir le point 12.3.3.3).

Exemple :

Concentration de $80 \times 10^6/\text{ml}$, calculée par évaluation de 200 spermatozoïdes à l'hématimètre
À l'évaluation des 200 spermatozoïdes colorés dans les 2 échantillons, 5 leucocytes et 10 spermatozoïdes immatures sont repérés.
Concentration des leucocytes : n^{bre} de leucocytes multiplié par la concentration des spermatozoïdes, divisé par le n^{bre} de spermatozoïdes évalués Donc, $5 \times (80 \times 10^6)/200 = 2 \times 10^6$ leucocytes par ml
Concentration des spermatozoïdes immatures (SI) : n^{bre} de SI multiplié par la concentration des spermatozoïdes, divisé par le n^{bre} de spermatozoïdes évalués Donc, $10 \times (80 \times 10^6)/200 = 4 \times 10^6$ SI par ml

12.3.8.6 Valeurs de référence

Depuis la publication de la cinquième édition du manuel de l'OMS, l'éjaculat normal doit contenir au moins 4 % de spermatozoïdes morphologiquement normaux (cette valeur correspond au 5^e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS)⁽¹⁾.

13.0 Confirmation du succès ou de l'échec de la vasectomie

La vasectomie, une solution permanente de contrôle des naissances, consiste à réaliser l'occlusion des canaux déférents, pour empêcher les spermatozoïdes produits par les testicules de passer dans le sperme au moment de l'éjaculation. La réalisation du spermogramme après la vasectomie aidera donc à confirmer le succès ou l'échec de cette intervention. Selon les lignes directrices de l'AEU ⁽³⁾ et celles de l'AUA ⁽⁴⁾, l'efficacité occlusive de la vasectomie est confirmée quand les deux conditions suivantes sont réunies : aucun spermatozoïde mobile n'est observé et la concentration de spermatozoïdes est égale ou inférieure à 100 000/ml ($0,1 \times 10^6$ /ml).

Le spermogramme post-vasectomie comporte essentiellement la recherche de spermatozoïdes et, s'il y en a, l'évaluation de leur état général. Fait à remarquer, le volume de l'éjaculat change très peu après la vasectomie (diminution moyenne d'environ 5 %), puisqu'il dépend principalement des sécrétions des vésicules séminales et de la prostate ^{(5) (61)}. Soulignons également que la spermatogenèse n'est pas abolie par l'intervention chirurgicale.

La réalisation du spermogramme en vue de confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie comporte un volet macroscopique, portant sur l'aspect, la viscosité, la mesure du volume et du pH de l'éjaculat, et un volet microscopique, qui consiste à examiner un échantillon d'éjaculat afin de déceler des spermatozoïdes éventuellement éjaculés malgré la vasectomie, et le cas échéant, de les compter et de les évaluer.

L'annexe 11 présente un exemple de rapport.

13.1 Délai recommandé entre la vasectomie et la réalisation de l'examen du sperme

Le temps écoulé entre la vasectomie et la réalisation du premier examen du sperme doit être établi à la discrétion du médecin traitant. En l'absence de consigne de la part de ce dernier, l'AUA considère qu'un délai de 8 à 16 semaines après la vasectomie est raisonnable ⁽⁴⁾.

13.2 Traitement de l'éjaculat en vue de l'examen post-vasectomie

Les exigences préanalytiques présentées au point 10.0 s'appliquent également ici à la collecte, à l'identification, à la conservation et au transport de l'éjaculat. Consulter le point 10.8 pour connaître les délais d'exécution de l'examen.

Il faut attendre que le sperme soit entièrement liquéfié avant de commencer l'examen (environ 30 minutes après l'éjaculation) ⁽¹⁾. L'éjaculat doit être conservé à une température de 37 °C (sans y excéder) jusqu'à sa liquéfaction, si cette température peut être maintenue pendant tout le processus ^{(2) (5)}. Sinon, le conserver à la température de la pièce ⁽¹⁾.

Si l'analyse vise à valider la présence de spermatozoïdes mobiles, il faut prendre soin de ne pas diluer l'éjaculat dans un fixateur ni de le centrifuger ⁽¹⁾.

13.3 Examen macroscopique

Lors de l'examen macroscopique, on peut évaluer l'aspect et la viscosité de l'échantillon, et en mesurer le volume (voir les instructions au point 12.2.3) et le pH (voir les instructions au point 12.2.4). Un pH faible peut indiquer une possible contamination par de l'urine⁽⁴⁸⁾. Il peut également nuire à la motilité des spermatozoïdes et à l'interprétation de l'efficacité occlusive de la vasectomie^{(1) (5) (49)}.

L'annexe 4 présente un aide-mémoire des étapes de l'examen macroscopique de l'éjaculat.

13.4 Examen microscopique

L'annexe 12 présente un aide-mémoire des étapes de l'examen microscopique de l'éjaculat en vue de confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie.

13.4.1 Sperme à l'état frais (préparation de la lame)

Avant d'étaler l'éjaculat pour l'examiner, il faut bien l'homogénéiser dans son récipient d'origine⁽¹⁾.

Il faut prélever puis déposer exactement 10 µl de sperme frais homogénéisé entre lame et lamelle avec une pipette à déplacement positif. Utiliser une lamelle de 22 mm x 22 mm afin d'uniformiser l'épaisseur du sperme (20,7 µm) sous la lamelle^{(1) (5)}. L'étalement d'un volume prédéterminé (en l'occurrence, 10 µl) permet d'uniformiser les techniques d'un centre à l'autre. On obtient ainsi des résultats comparables, peu importe où l'analyse est effectuée, et d'une fois à l'autre chez un même patient. Conserver l'éjaculat à une température de 37 °C (sans y excéder), si cette température peut être maintenue pendant tout le processus^{(2) (5)}. Sinon, le conserver à la température de la pièce⁽¹⁾.

13.4.2 Liquéfaction et homogénéité de l'éjaculat

Examiner une première fois le sperme à l'état frais avec un microscope à contraste de phase pour vérifier qu'il est bien liquéfié et homogène. S'il n'est pas liquéfié, il faut le conserver l'éjaculat à une température de 37 °C (sans y excéder) pendant au moins 10 minutes avant de l'étaler sur une nouvelle lame (voir le point 13.4.1), si cette température peut être maintenue pendant tout le processus. Si l'éjaculat étalé entre lame et lamelle n'est pas homogène, recommencer la préparation. Passer à l'évaluation initiale des spermatozoïdes seulement si l'éjaculat étalé entre lame et lamelle est liquéfié et homogène. Si l'éjaculat n'est pas liquéfié au bout de 60 minutes, on peut tenter de rendre le sperme moins gélatineux en appliquant la technique décrite au point 12.3.2⁽¹⁾.

13.4.3 Examen initial de l'éjaculat à l'état frais

L'examen d'un échantillon (10 µl) d'éjaculat à l'état frais permet d'évaluer la motilité et la concentration des spermatozoïdes. L'examen se fait sous grossissement total de 200 ou 400. La mesure initiale de la concentration permet également de choisir la dilution à faire si on prévoit d'examiner le sperme sur hématimètre.

Note : La méthode proposée dans cette section ne doit pas remplacer le dénombrement des spermatozoïdes si le spermogramme vise à évaluer la fertilité (voir le point 12.3.6).

Si l'éjaculat reste visqueux malgré les étapes proposées au point 13.4.2, il est recommandé de confirmer les résultats en examinant une deuxième lame ⁽¹⁾.

13.4.3.1 Érythrocytes

La présence d'une grande quantité d'érythrocytes est souvent révélée par la couleur rougeâtre (sang frais) ou brunâtre (épanchement sanguin moins récent) du sperme.

Normalement, le sperme ne devrait pas contenir d'érythrocytes. La présence de quelques érythrocytes dans un éjaculat n'a pas nécessairement d'incidence clinique ⁽⁵⁾. Il faut néanmoins la noter dans le rapport. Si moins d'un érythrocyte est observé par HPF, rapporter comme suit : **« Présence de peu d'érythrocytes »**. Si on observe plus d'un érythrocyte par HPF, rapporter comme suit : **« Présence de plusieurs érythrocytes »** ⁽⁵⁾.

Note : Cette estimation est fondée sur l'examen de 10 µl de sperme frais à un grossissement total de 400, entre lame et lamelle de 22 x 22 mm, et ouverture de champ du microscope de 20 mm ⁽⁵⁾.

13.4.3.2 Cellules rondes

L'expression *cellules rondes* désigne les spermatozoïdes immatures (cellules germinales) et les leucocytes (la présence de leucocytes peut être un signe d'inflammation)⁽⁵⁰⁾. Les fragments cytoplasmiques anucléés ne sont pas comptés dans cette catégorie⁽⁵⁾.

Il est très rare qu'un éjaculat ne contienne aucune cellule ronde. Par contre, il devrait normalement en contenir moins de $1,0 \times 10^6/\text{ml}$; une concentration égale ou supérieure à $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ est anormale⁽⁵⁾. Dans le contexte actuel, nous recommandons de considérer la présence de moins de $1,0 \times 10^6$ cellules rondes par ml comme étant normale et il n'est pas nécessaire de consigner cette observation dans le rapport.

Le tableau 5 à l'annexe 6 peut servir à estimer si la concentration des cellules rondes dépasse le seuil de 1 million/ml dans un échantillon de 10 μl . Ce tableau ne peut être utilisé que dans les conditions suivantes : 10 μl de sperme frais, entre lame et lamelle de 22 mm x 22 mm, et ouverture de champ de 20 mm. Si ces conditions diffèrent, il faut adapter le calcul en conséquence à partir de la grille fournie à l'annexe 7.

Comme les chances de trouver des spermatozoïdes immatures dans le sperme sont rares après la vasectomie, il n'est pas nécessaire d'examiner une lame colorée pour distinguer les spermatozoïdes immatures des leucocytes si on a observé des cellules rondes dans l'échantillon étalé.

Si on compte plus de 1×10^6 cellules rondes par ml, rapporter comme suit : « ***> 1 x 10⁶ cellules rondes/ml. Évaluation fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 μl prélevé sur le volume total de l'éjaculat*** ».

En présence de plus de 1×10^6 cellules rondes par ml, la note suivante pourrait fournir plus d'indications à certains prescripteurs : « ***Concentration des leucocytes possiblement > 1 x 10⁶/ml; à valider avec les données cliniques*** ».

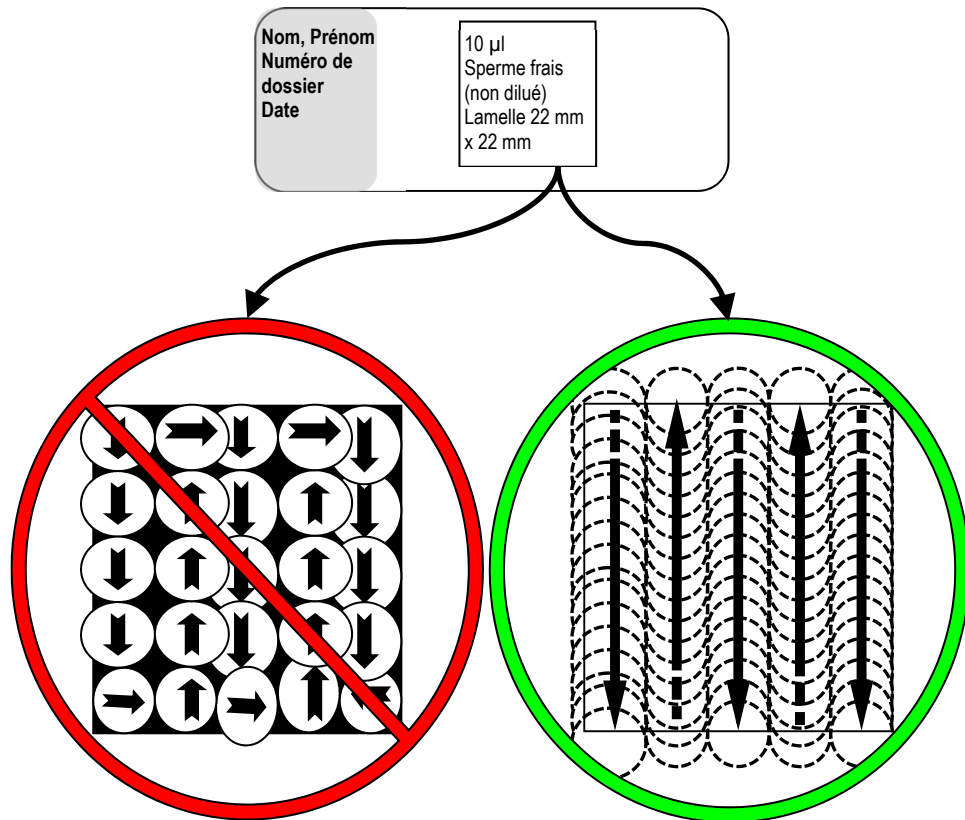
13.4.4 Évaluation de la motilité

Après la vasectomie, la mise au jour de spermatozoïdes mobiles est une information capitale pour le suivi du patient ^{(3) (4) (62) (63)}. Il est donc important de réaliser un examen systématique et exhaustif de la lame de sperme à l'état frais (10 µl) comme on peut le voir à la figure 15, sous grossissement total de 200 à 400 ^{(1) (64)}.

L'examen systématique (balayage) de la lame permet d'évaluer tout l'échantillon de 10 µl (dessin à droite); en effet, en faisant un examen champ par champ (dessin à gauche), on risque davantage de ne pas remarquer les spermatozoïdes qui se trouveraient entre deux champs.

Si on observe des spermatozoïdes, il faut préciser s'ils sont mobiles ou immobiles.

Figure 15. Déplacement du champ de vision (balayage) permettant d'examiner toute la surface de la lamelle couvrant un volume connu de sperme.



Dessin d'Ann Villeneuve, embryologiste, CHUS, CIUSSS de l'Estrie.
Reproduit avec permission.

13.4.5 Évaluation de la concentration

13.4.5.1 Absence de spermatozoïdes dans le sperme frais

Si aucun spermatozoïde n'est observé après l'examen de la lame complète, rapporter comme suit : « **Aucun spermatozoïde observé dans 10 µl de sperme frais** ». ⁽⁴⁾

13.4.5.2 Moins de 500 spermatozoïdes dans le sperme frais

Si on dénombre moins de 500 spermatozoïdes à l'examen de la lame complète, noter le nombre de spermatozoïdes observés dans 10 µl de sperme frais.

Si on étale le sperme frais sur la lame conformément aux instructions du point 13.4.1 et que l'on fait l'examen de la lame complète, on peut évaluer la concentration par ml comme suit :

Un spermatozoïde observé = 100 spermatozoïdes/ml = $0,0001 \times 10^6/\text{ml}$

Exemple : 12 spermatozoïdes dans 10 µl de sperme équivalent à 1200 spermatozoïdes par ml ($0,0012 \times 10^6/\text{ml}$).

Si seulement des spermatozoïdes immobiles sont observés, rapporter comme suit : « ***x spermatozoïdes immobiles observés dans 10 µl de sperme frais. Concentration des spermatozoïdes : x/ml. Concentration fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 µl prélevé sur le volume total de l'éjaculat*** ».

Si au moins un spermatozoïde mobile est observé, rapporter comme suit : « ***x spermatozoïdes observés dans 10 µl de sperme frais. Présence de spermatozoïdes mobiles. Concentration des spermatozoïdes : x/ml. Concentration fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 µl prélevé sur le volume total de l'éjaculat*** ».

Le seuil de 500 spermatozoïdes a été établi comme suit : comme la présence de 1 spermatozoïde sur une lame de 10 µl équivaut à environ 100 spermatozoïdes par ml, la présence de 500 spermatozoïdes sur la même lame correspond à une concentration de 50 000 spermatozoïdes par ml. La méthode de comptage à l'hématimètre présentée au point 12.3.6 comporte une limite de détection de 56 000 spermatozoïdes par ml ^{(1) (54)}. Le seuil de 500 spermatozoïdes dans 10 µl permet donc d'évaluer la concentration, même sous la limite de détection de l'hématimètre.

13.4.5.3 Au moins 500 spermatozoïdes dans le sperme frais

Dès que l'on atteint le chiffre de 500 spermatozoïdes sur la lame de 10 µl, il faut cesser de compter les spermatozoïdes (tout en continuant de chercher ceux qui sont mobiles; comme indiqué au point 13.4.4). Ne pas rapporter le nombre de spermatozoïdes sur cette lame et passer immédiatement au dénombrement sur hématimètre en suivant les directives du point 12.3.6. Seul le résultat du dénombrement sur hématimètre sera inscrit dans le rapport ainsi que la présence de spermatozoïdes observés sur la lame de 10 µl (s'il y a lieu).

Selon leur limite de détection, certains systèmes CASA peuvent également servir à effectuer cette évaluation.

Si seulement des spermatozoïdes immobiles sont observés, rapporter comme suit : ***Concentration des spermatozoïdes immobiles : x/ml***».

Si au moins un spermatozoïde mobile est observé, rapporter comme suit : « ***Concentration des spermatozoïdes : x/ml. Présence de spermatozoïdes mobiles*** ».

13.4.6 Valeurs de référence

Selon les lignes directrices de l'AEU ⁽³⁾ et de l'AUA ⁽⁴⁾ et d'autres sources ^{(62) (63) (65)}, l'efficacité occlusive de la vasectomie est confirmée lorsque la concentration de spermatozoïdes est égale ou inférieure à 100 000/ml et que tous les spermatozoïdes observés sont immobiles.

Bien que les technologues médicaux ne puissent pas faire d'interprétation diagnostique, le présent guide propose des termes et des expressions pour uniformiser la façon d'exprimer les résultats dans le rapport. Ces termes et expressions sont habituellement programmés dans le système informatique du laboratoire par le spécialiste du laboratoire (médecin spécialiste ou biochimiste clinique) et apparaissent automatiquement sur le rapport suivant le résultat de l'analyse.

Proposition de note dans le rapport : « ***Selon les lignes directrices de l'European Association of Urology et de l'American Urological Association, l'efficacité occlusive de la vasectomie est confirmée quand les deux conditions suivantes sont réunies : aucun spermatozoïde mobile n'est observé et la concentration de spermatozoïdes est égale ou inférieure à 100 000/ml (0,1 x 10⁶/ml).*** »

L'annexe 13 présente un algorithme d'interprétation des résultats de spermogramme post-vasectomie pour permettre au médecin d'établir si l'intervention chirurgicale est un succès ou non.

14.0 Préparation de sperme en vue de l'insémination

Le couple qui a des problèmes de fertilité se voit proposer différents examens qui ont pour but de préciser le diagnostic. Différentes approches thérapeutiques peuvent ensuite être envisagées, notamment le recours à certaines techniques. Ces techniques comprennent l'insémination intra-utérine (IIU), la fécondation *in vitro* (FIV) et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (IICS). Il s'agit de services de deuxième et de troisième lignes.

L'IIU consiste à déposer le sperme préalablement préparé au laboratoire dans la cavité utérine, au moyen d'un cathéter. La FIV consiste à mettre un échantillon de sperme traité en présence de l'ovule en dehors du corps de la femme. L'IICS est utile notamment lorsque les spermatozoïdes ne parviennent pas à pénétrer l'ovule, ou que leur nombre ou leur motilité sont faibles. Cette technique permet de faire pénétrer le spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovule à l'aide d'une aiguille très fine⁽⁶⁶⁾.

La préparation du sperme joue un rôle important dans le succès des techniques de PMA. Le plasma séminal se compose de substances qui nuisent au pouvoir de fécondation des spermatozoïdes quand ceux-ci y restent trop longtemps. Pour limiter les pertes, il faut séparer les spermatozoïdes du plasma le plus rapidement possible, c'est-à-dire en moins d'une heure. La préparation du sperme a pour but d'éliminer les spermatozoïdes de moins bonne qualité, les prostaglandines du plasma séminal, les cellules, les débris cellulaires et les bactéries. La sélection des spermatozoïdes permet d'obtenir un pourcentage élevé de gamètes morphologiquement normaux et mobiles⁽¹⁾. Après cette préparation, la concentration de l'échantillon en spermatozoïdes de haute qualité est plus élevée. La concentration et la motilité des spermatozoïdes obtenus après traitement dépendront de la qualité initiale de l'échantillon, des milieux de culture utilisés et des techniques choisies pour préparer le sperme.

Le lavage du sperme fait subir une série de changements aux spermatozoïdes, appelée « capacitation artificielle spermatique », sans laquelle ceux-ci n'auraient pas de pouvoir fécondant. Lors de la relation sexuelle, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant dans les voies génitales féminines⁽²⁾.

Le choix de la méthode de préparation du sperme dépend de la qualité de l'échantillon de départ⁽¹⁾. Normalement, la motilité et la concentration sont évaluées avant et après la préparation. Voici les principales méthodes de préparation : la méthode des gradients de densité, le simple lavage et la méthode de la migration ascendante (*swim up*). L'annexe 14 présente un aide-mémoire des étapes de la préparation du sperme en vue de l'insémination, selon la méthode des gradients de densité.

Le présent guide n'aborde que les méthodes appliquées au sperme frais, par conséquent au sperme de conjoint. Le traitement du sperme de donneur dépasse le cadre de ce guide. La distribution, le traitement et l'importation de sperme de donneur sont encadrés notamment par la *Loi sur les aliments et drogues*⁽⁶⁷⁾, le *Règlement sur le traitement et la distribution du sperme destiné à la reproduction assistée*⁽⁶⁸⁾, les *Exigences techniques en matière d'insémination thérapeutique avec sperme de donneur*⁽⁶⁹⁾, le *Règlement sur les activités cliniques en matière de procréation assistée*⁽⁷⁰⁾ ainsi que par la norme CAN/CSA-Z900.2.1-12 (*Tissus destinés à la reproduction assistée*)⁽⁷¹⁾. Étant donné l'obligation de confirmer l'absence de certains agents infectieux dans le sperme de donneur, il faut congeler les échantillons durant une certaine période en attendant les résultats du dépistage⁽⁶⁹⁾.

Dans certaines situations (préservation de la fertilité avant la chimiothérapie, ablation du testicule, etc.), il peut être nécessaire de congeler le sperme du conjoint en vue d'une utilisation ultérieure⁽¹⁾. Il faut suivre les procédures en vigueur ainsi que les recommandations du processeur (banque de sperme) pour congeler et décongeler le sperme de donneur.

L'annexe 15 présente un exemple du rapport de préparation de sperme.

Les méthodes décrites ci-dessous s'appuient sur l'expérience des membres du groupe de travail. Elles ont été retenues à l'issue de nombreux essais et sont étayées par plusieurs références^{(1) (2) (5)}. Chaque centre doit les valider et les adapter s'il y a lieu, selon les recommandations des fabricants des produits utilisés.

14.1 Précautions

Dans le contexte clinique de la PMA, la contamination croisée ou l'identification erronée d'un échantillon (au début du processus et à toute étape par la suite) peuvent avoir des conséquences tragiques (enfant issu d'un autre parent). **Il est donc primordial d'éviter toute contamination croisée et toute erreur d'identification. Pour ce faire, on prendra les précautions suivantes, entre autres, pour protéger l'échantillon et le personnel^{(1) (2)} :**

- se désinfecter les mains à fond sans exception;
- porter des gants (obligatoire);
- traiter les échantillons un à la fois;
- changer toutes les fournitures à usage unique entre chaque patient (embouts, etc.);
- reboucher les tubes entre chaque étape;
- vérifier la double identification des échantillons à chaque étape;
- désinfecter les surfaces de travail et le matériel réutilisable avant de commencer à travailler, après les manipulations ou après toute contamination.

Suivant les normes canadiennes sur la biosécurité, toute manipulation de récipients ouverts qui contiennent des matières infectieuses doit être effectuée dans une enceinte de sécurité biologique de classe II ⁽²⁰⁾. Même si la présence d'agents pathogènes n'est pas confirmée, le groupe de travail recommande d'effectuer les manipulations liées à la préparation de sperme dans de telles enceintes afin de protéger les échantillons et le personnel.

Si la présence d'agents pathogènes (comme le VIH, le VHB et le VHC) est confirmée, le couple pourrait être dirigé vers un centre de procréation assistée (CPA) qui offre des services de fécondation à risque viral.

14.2 Évaluation macroscopique sommaire

Il faut entreprendre la préparation du sperme sans tarder, car tout délai peut réduire le pouvoir fécondant des spermatozoïdes de certains hommes ^{(2) (5)}.

14.2.1 Liquéfaction

Après la collecte, entreposer le contenant à une température de 37 °C (sans y excéder ou à la température de la pièce ⁽¹⁾) jusqu'à ce que le sperme soit liquéfié complètement, mais pas plus de 30 minutes ^{(2) (5)}. Si l'éjaculat n'est toujours pas liquéfié après 30 minutes, commencer le traitement du sperme.

14.2.2 Volume et viscosité

- Mesurer le volume du sperme avec une pipette sérologique stérile. Éviter la formation de bulles. S'il y a des corps gélatineux, éviter de les aspirer. Il faut plutôt les pousser sur les parois du contenant ou transférer l'éjaculat dans un tube conique de 15 ml, laisser sédimenter les corps gélatineux et retirer le culot de corps gélatineux en plongeant une pipette sérologique de 2 ml dans le fond et en l'aspirant d'un petit coup sec.
- Évaluer la viscosité du sperme en laissant tomber le sperme de la pipette goutte à goutte (voir le point 12.2.2) ⁽¹⁾.

Note : Si le sperme est encore visqueux après avoir passé 30 minutes à une température de 37 °C (sans y excéder ou à la température de la pièce), on peut ajouter un volume de solution de lavage (préchauffée à la même température que l'échantillon) égale au volume de l'éjaculat en procédant lentement, afin d'éviter tout choc osmotique, puis homogénéiser délicatement le mélange.

14.3 Évaluation microscopique

Note : Cette évaluation ne doit pas remplacer le dénombrement des spermatozoïdes dans le cadre de l'évaluation de la fertilité (voir le point 12.3.6).

14.3.1 Sperme à l'état frais

Mélanger le sperme délicatement par rotation du contenant (point 12.1.1). Étaler 10 µl de sperme frais sur une lame et recouvrir d'une lamelle de 22 mm x 22 mm (voir le point 12.3.1).

Noter la présence d'amas (agrégation et agglutination) et la concentration en éléments cellulaires (voir le point 12.3.3). Si le sperme contient beaucoup de cellules rondes ou d'érythrocytes, aviser le médecin de la situation avant l'insémination; la décision de procéder ou non à l'insémination revient au médecin ⁽⁵⁰⁾.

14.3.2 Évaluation de la motilité

On évaluera la motilité du sperme frais étalé entre lame et lamelle comme décrit au point 12.3.4. Cependant, on ne répétera pas cette évaluation dans un deuxième échantillon, mais plutôt sur la même lame afin d'utiliser le moins de volume d'éjaculat possible.

14.3.3 Estimation de la concentration

Dans le cadre de la préparation de sperme, l'évaluation initiale de la concentration sert à orienter le type de préparation à faire et non à se prononcer sur la fertilité du patient.

Bien que l'hématimètre soit l'outil de référence pour évaluer la concentration (voir le point 12.3.6), une évaluation rapide peut suffire à cette étape. On peut adapter la technique proposée au point 12.3.3.3 pour estimer la concentration des spermatozoïdes, en se servant de la même lame qu'à l'évaluation de la motilité.

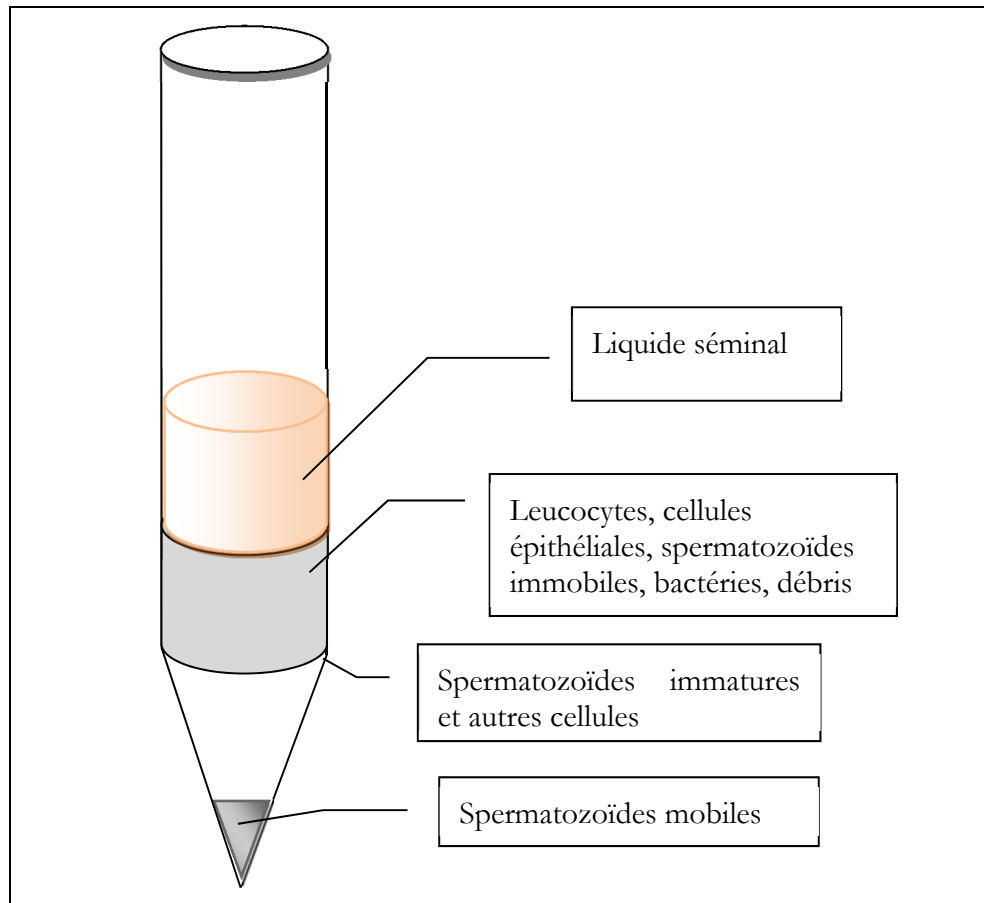
On peut également se servir du système CASA.

14.4 Méthode des gradients de densité

La méthode des gradients de densité est la technique de choix dans la plupart des cas ⁽¹⁾.

Cette méthode consiste à déposer l'éjaculat dans une colonne à gradient de densité. Les cellules se séparent suivant leur densité en traversant des couches discontinues de densité croissante, composées de silice colloïdale revêtue de silane (gradient). À la fin de la centrifugation, chaque spermatozoïde se trouve au niveau du tube correspondant à sa densité ⁽¹⁾. Les spermatozoïdes mobiles et normaux sont généralement plus denses que les spermatozoïdes anormaux ⁽²⁾. La figure 16 représente les couches obtenues après la centrifugation.

Figure 16. Couches obtenues par centrifugation



Dessin de Chantal Guilbert, T.M., laboratoire d'andrologie du CIUSSS de la Mauricie-et-du-Centre-du-Québec, CHAUR. Reproduit avec permission.

Il faut noter que la fraction d'intérêt est celle qui reste au fond du tube. Le culot est récupéré, lavé par centrifugation dans un milieu de culture tamponné (milieu de lavage), puis remis en suspension en vue de l'insémination ⁽¹⁾.

14.4.1 Préparation des solutions de travail

Les solutions de travail nécessaires à la méthode des gradients de densité comprennent une solution colloïdale et une solution de lavage. Il existe également des solutions de travail prêtes à l'emploi sur le marché. On peut également préparer ces solutions au laboratoire sous une enceinte de sécurité biologique à partir d'une solution mère à 100 %.

La solution colloïdale contient des particules de silice colloïdale revêtues de silane dans une solution tamponnée (p. ex. : solution EBSS (solution saline équilibrée de Earle), tamponnée avec de l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)). La solution de lavage est une solution tamponnée (p. ex. : solution EBSS tamponnée avec de l'HEPES) à laquelle peut avoir été ajoutée de l'albumine sérique humaine et des antibiotiques, selon le fournisseur.

Lors de leur utilisation, la température des solutions de travail doit être semblable à celle de l'éjaculat à préparer. Les solutions de travail doivent donc être soit à une température de 37°C sans y excéder ou à la température de la pièce ⁽⁷²⁾.

Les préparations proposées ci-dessous (à 80 % et 40 %) sont celles que recommandent certains fabricants et ne sont fournies ici qu'à titre d'exemple.

Dans un flacon stérile correctement identifié ^{(1) (2)} :

- Pour préparer la solution de 80% : mélanger 20 ml de solution colloïdale à 100 % et 5 ml de solution de lavage;
- Pour préparer la solution de 40 % : mélanger 10 ml de solution colloïdale à 100 % et 15 ml de solution de lavage.

Par la suite, il est recommandé de séparer les solutions de différente densité en aliquotes (p. ex., dans des tubes stériles gradués de 15 ml) selon les besoins du laboratoire afin de préserver l'intégrité des solutions.

Si on utilise des solutions commerciales, désinfecter le bouchon (p. ex., à l'isopropanol) et aspirer avec une seringue stérile.

14.4.2 Préparation du tube de gradient

La figure 17 résume les étapes décrites ci-dessous.

Il convient de conserver l'éjaculat à une température de 37°C sans y excéder ou à la température de la pièce, afin d'éviter les chocs thermiques ^{(1) (2) (5)}.

Étape 1 - Préparation du tube

Tube de gradient :

- Avec des pipettes sérologiques stériles, déposer 1 ml de solution à 80 % dans le fond d'un tube conique gradué, puis déposer délicatement 1 ml de solution à 40 % par-dessus en évitant de mélanger les deux solutions ⁽¹⁾. Le tube à gradient bicouche reste stable durant une certaine période (vérifier avec le fournisseur). Certains auteurs recommandent de l'utiliser moins d'une heure après sa préparation ⁽⁷²⁾.
- S'assurer que la ligne qui sépare les deux couches est bien nette.

Tube de lavage (en vue de l'étape 5) :

- Avec une pipette sérologique stérile, ajouter 5 ml de solution de lavage à un tube stérile prévu pour cet usage.

Étape 2 : Ajout du sperme

Verser tout l'éjaculat dans le tube de gradient. Le sperme peut flotter à la surface de la solution pendant quelques minutes. Si le volume de sperme est plus grand que 1 ml (ou égal au volume de la couche supérieure), on peut le déposer sur deux tubes de gradient (ou plus) ⁽²⁾. On réunira ensuite les culots de ces tubes dans un seul et même tube de lavage.

Étape 3 : Première centrifugation

Centrifuger le tube de gradient pendant 20 minutes à une force allant de 300 à 400 g ⁽¹⁾.

Étape 4 : Aspiration du surnageant

Après la centrifugation, aspirer le surnageant avec une pipette sérologique stérile jusqu'à quelques millimètres au-dessus du culot. Ensuite, aspirer tout le culot avec une pipette Pasteur stérile.

Étape 5 : Transfert du culot dans le tube de lavage

Déposer délicatement le culot à la surface de la solution de lavage. Boucher le tube et mélanger délicatement.

Étape 6 : Deuxième centrifugation

Centrifuger le tube de lavage pendant 10 minutes à une force allant de 300 à 500 g.

Dans la 5^e édition de son manuel, l'OMS recommande de laver le culot deux fois en répétant les étapes 4, 5 et 6 ⁽¹⁾.

Étape 7 : Élimination du surnageant

Retirer le surnageant avec une pipette sérologique stérile en allant le plus près possible du culot.

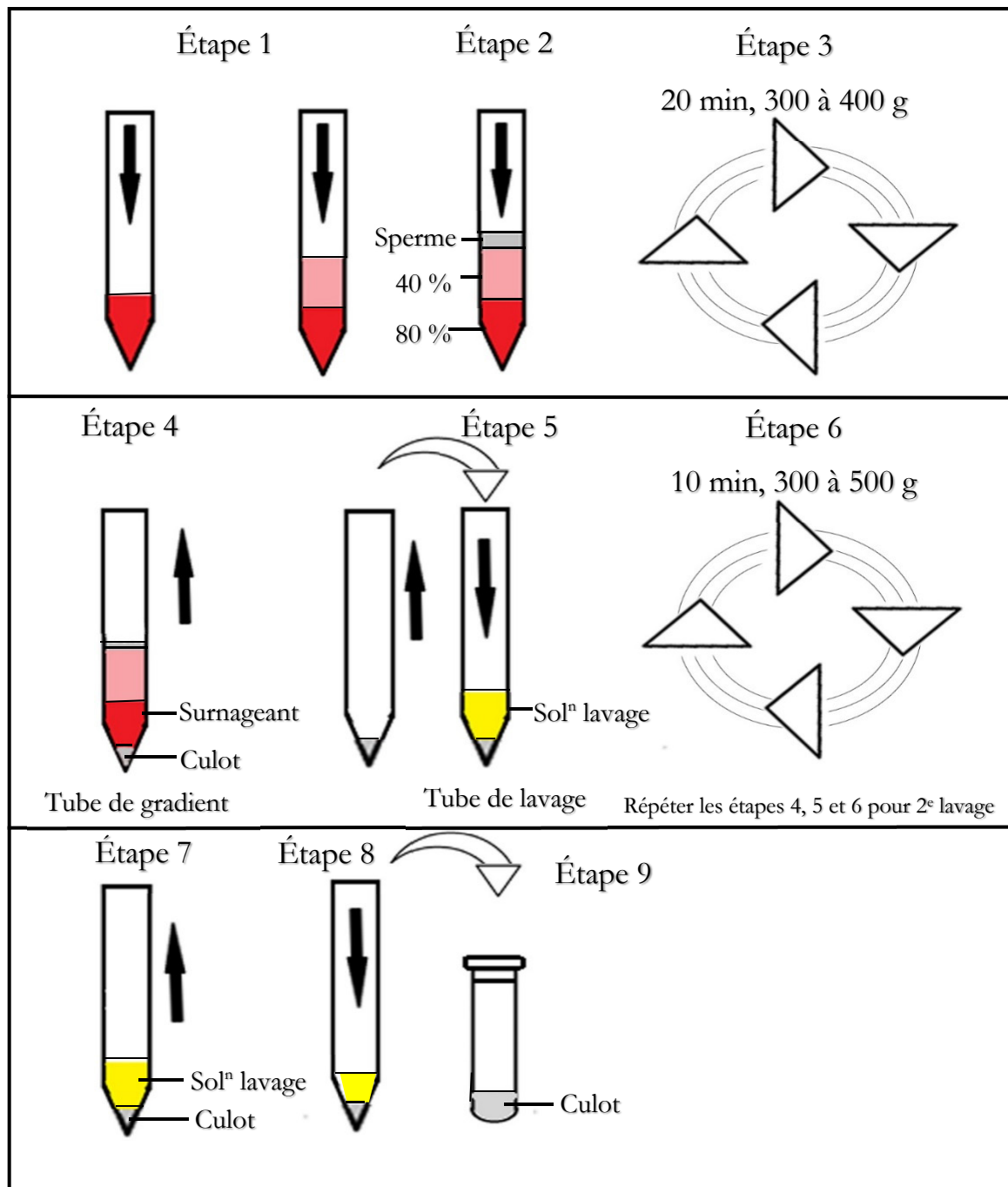
Étape 8 : Ajout de la solution de lavage

Ajouter assez de solution de lavage pour obtenir un volume final de 0,5 ml.

Étape 9 : Transfert du culot

Avec une nouvelle pipette Pasteur stérile, homogénéiser délicatement le culot. Déposer le culot dans un tube stérile de 5 ml portant le nom du patient et déposer une goutte sur la chambre de comptage en vue de l'évaluation du sperme après sa séparation dans le tube de gradient (voir le point 14.4.3).

Figure 17. Préparation du sperme par la méthode des gradients



Dessins de Francine Cloutier, T.M., au laboratoire d'andrologie du CHUL, CHU de Québec - Université Laval. Reproduits avec permission.

14.4.3 Évaluation après la séparation

Après le lavage de l'éjaculat, évaluer la concentration et la motilité des spermatozoïdes (voir les points 12.3.4 et 12.3.6) sur hématimètre de Neubauer ou avec un système CASA.

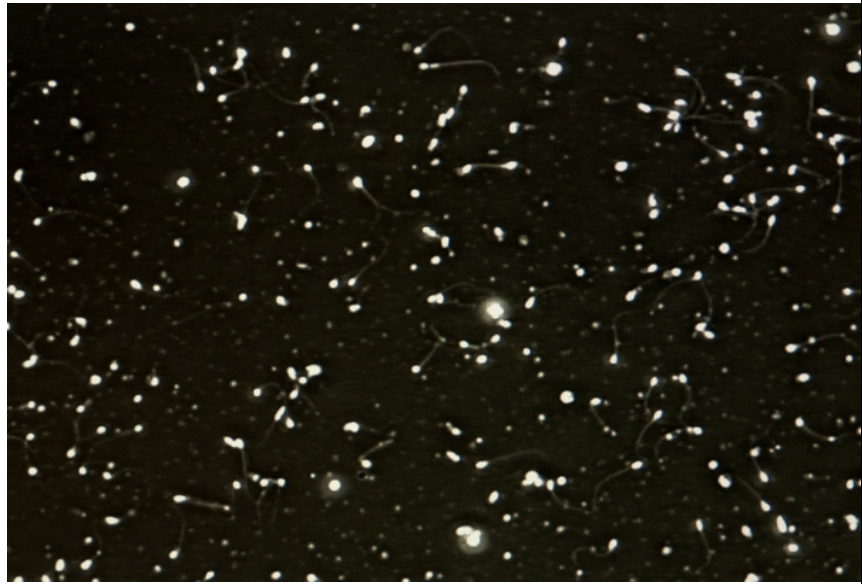
Calculer la concentration des spermatozoïdes mobiles en $10^6/\text{ml}$.

Conserver l'échantillon à la température de la pièce jusqu'au moment de l'insémination⁽²⁾ (stable pour quelques heures).

La figure 18 présente des photos d'éjaculat prises avant (a) et après (b et c) le traitement, avec un microscope à contraste de phase.

Figure 18. Photos d'éjaculat avant et après le traitement

a) Avant le traitement (noter la présence de débris et de cellules)



b) Après le traitement, récupération d'un grand nombre de spermatozoïdes (milieu propre)

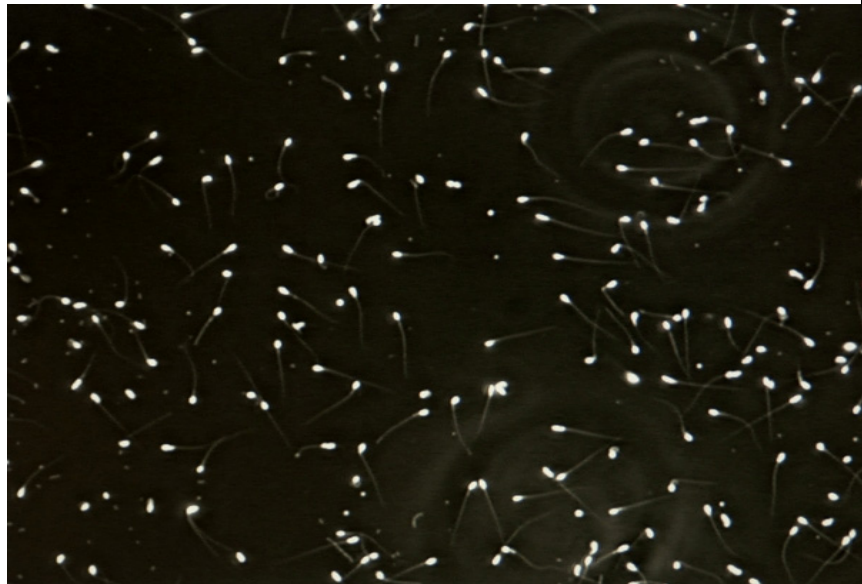


Figure 18 (suite)

c) Après le traitement, récupération d'un moins grand nombre de spermatozoïdes (milieu propre)



Photos prises par Francine Cloutier, T.M., au laboratoire d'andrologie du CHUL, CHU de Québec - Université Laval. Reproduites avec permission.

14.4.4 Validation de la méthode

En contexte clinique, chaque laboratoire doit valider et adapter au besoin les recommandations du fabricant ⁽¹⁾ en corrigeant les paramètres suivants un à un afin de maximiser la récupération des spermatozoïdes :

- volume de solution optimal, pour limiter la distance de migration des spermatozoïdes (le plus souvent, entre 0,5 et 2 ml).
- temps de centrifugation des échantillons visqueux ⁽¹⁾.
- force centrifuge nécessaire à l'obtention d'un culot satisfaisant ⁽¹⁾ (n'excédant pas 800 g ⁽⁵⁾).

14.5 Méthode du simple lavage

Cette méthode suppose le retrait du liquide séminal et la concentration des spermatozoïdes dans un petit volume, par centrifugation en milieu de culture tamponné. Elle permet de concentrer les spermatozoïdes, mais pas de les sélectionner. Les débris et les cellules sont toujours présents dans le culot puisque seul le plasma séminal est éliminé⁽⁵⁾.

La concentration de débris et de cellules (incluant les spermatozoïdes morts) peut favoriser la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) dans le culot. Les DRO peuvent causer la dégradation de l'ADN des spermatozoïdes que l'on tente de récupérer et nuire à leur pouvoir fécondant. Il ne faut donc recourir à cette méthode que si le sperme contient très peu de débris et de cellules⁽²⁾.

Le lecteur peut consulter la cinquième édition du manuel de l'OMS pour se renseigner sur la méthode du simple lavage⁽¹⁾.

14.6 Méthode de la migration ascendante (Swim-Up)

On recourt moins souvent à la méthode de la migration ascendante, car elle nécessite de l'équipement additionnel et du sperme contenant un grand nombre de spermatozoïdes mobiles⁽¹⁾⁽²⁾. De plus, la technique est plus difficile à uniformiser que la méthode des gradients⁽¹⁾. Cette méthode permet d'obtenir moins de spermatozoïdes que la méthode des gradients, mais elle permet d'isoler les spermatozoïdes les plus mobiles⁽²⁾.

Le lecteur peut consulter la cinquième édition du manuel de l'OMS pour se renseigner davantage sur la méthode de la migration ascendante⁽¹⁾.

15.0 Exigences du processus postanalytique

15.1 Format du rapport

Comme le prescrit la norme ISO15189, un format de rapport clair et concis doit être élaboré⁽⁹⁾. Des exemples de rapports sont présentés aux annexes 3, 11 et 15.

Les termes descriptifs comme asthénozoospermie, oligozoospermie et térazoospermie sont plutôt larges et simplificateurs. Ils ajoutent peu de valeur clinique à l'analyse. Il est préférable d'éviter leur utilisation dans le rapport ou de les utiliser de manière à ce qu'ils ne soient pas confondus avec un diagnostic⁽¹⁾⁽⁵⁴⁾. En effet, le but du rapport est de permettre au médecin d'évaluer la fertilité de son patient ou de confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie et non d'émettre un diagnostic.

Le tableau 3 rassemble les éléments du spermogramme abordés dans le présent guide.

Tableau 3. Éléments figurant sur le rapport

Élément	Évaluation de la fertilité		Confirmation du succès ou de l'échec de la vasectomie	
	Obligatoire*	Recommandé	Obligatoire*	Recommandé
Identification du patient et du prescripteur	✓		✓	
Nombre de jours d'abstinence	✓		✓	
Date et heure de la collecte	✓		✓	
Date et heure de réception	✓		✓	
Aspect de l'éjaculat	✓			✓
Volume de l'éjaculat	✓			✓
Viscosité de l'éjaculat	✓			✓
pH de l'éjaculat	✓			✓
Éléments figurés (cellules rondes), autres éléments cellulaires et débris si nombreux	✓			✓
Motilité des spermatozoïdes observés	✓		✓	
Concentration des spermatozoïdes observés	✓		✓	
Nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat	✓			
Méthode de mesure de la concentration et de valeur absolue		✓		✓
Liquéfaction de l'éjaculat si anormale	✓			
Morphologie (% de spermatozoïdes normaux)	✓			
Vitalité si mesurée	✓			
Nom de la conjointe du patient		✓		
Toute autre observation cliniquement importante		✓		✓

*Obligatoire pour assurer l'optimisation de la prise en charge du patient et bien documenter la qualité de l'échantillon reçu.

Toute information pouvant avoir une incidence sur l'interprétation du résultat doit apparaître dans le rapport (p. ex., retard, perte d'une partie de l'échantillon) ⁽⁹⁾ ⁽¹⁶⁾. Les valeurs de référence applicables sont également indiquées ⁽⁹⁾. Les paramètres cliniquement importants devraient être mis en évidence. Chaque laboratoire établit une nomenclature des paramètres qui pourraient figurer dans le rapport ⁽⁹⁾.

Il peut être utile d'inclure le nom de la conjointe du patient sur le rapport d'évaluation de la fertilité afin de faciliter le repérage du dossier par le médecin.

Si un volume de sperme précis (10 µl) a servi au calcul de la concentration des spermatozoïdes, ce volume devrait être indiqué dans le rapport.

15.2 Valeurs de référence

Le tableau 4 présente les valeurs de références de tous les paramètres d'évaluation de la fertilité présentés dans ce guide. Ces valeurs correspondent au 5^e percentile établi dans la cinquième édition du manuel de l'OMS. L'OMS a mesuré ces paramètres dans une population précise et a calculé les limites inférieures du 5^e percentile. Les limites supérieures n'ont pas été retenues, car elles ne risquent pas d'avoir une incidence défavorable sur la fertilité ⁽¹⁾.

Tableau 4. Valeurs de référence des paramètres d'évaluation de la fertilité, correspondant au 5^e percentile.

Paramètre	Limite inférieure de référence (5 ^e percentile; OMS)
Volume	1,5 ml*
pH	≥ 7,2
Motilité totale (PR+NP)	40 %
Motilité progressive (PR)	32 %
Vitalité (spermatozoïdes vivants)	58 %
Concentration de spermatozoïdes	15 x 10 ⁶ /ml
Valeur absolue	39 x 10 ⁶ /éjaculat
Morphologie (formes normales)	4 %

*Note : Selon l'OMS, la limite supérieure de référence du volume de l'éjaculat est de 6,8 ml (correspondant au 95^e percentile). Le dépassement de cette valeur peut être un signe d'hyperspermie et avoir une incidence clinique ⁽¹⁾. Dans un tel cas, il faudrait indiquer la limite supérieure de référence dans le rapport.

15.3 Conservation des échantillons et des rapports d'analyse

Le laboratoire conserve les échantillons et les rapports d'analyse conformément à la réglementation en vigueur ainsi qu'au calendrier de conservation de l'établissement ou de la clinique de fertilité ⁽⁹⁾. En outre, la norme CAN/CSA-Z900.2.1-12 intitulée *Tissus destinés à la reproduction assistée* stipule que les dossiers des donneurs et des receveurs doivent être conservés indéfiniment et de manière à préserver leur intégrité et leur confidentialité au fil des ans ⁽⁷¹⁾.

À titre indicatif, l'*Association of Biomedical Andrologists* recommande de conserver les échantillons de sperme ainsi que les lames colorées jusqu'à l'émission du rapport ⁽²⁹⁾. L'Association canadienne des pathologistes recommande de conserver les lames colorées qui ont servi à évaluer la fertilité pendant un an ⁽⁷³⁾.

Comme le prescrit la norme ISO 15189, les échantillons et les rapports doivent être conservés dans un endroit accessible seulement au personnel autorisé ⁽⁹⁾.

15.4 Élimination des échantillons

Il faut éliminer les échantillons conformément au *Règlement sur les déchets biomédicaux* et aux exigences de protection des renseignements personnels figurant sur leur support ou contenant ^{(74) (75)}.

Annexe 1

Exemple d'instructions

Votre médecin a ordonné la réalisation d'un examen de votre sperme (spermogramme). Ce test peut viser à évaluer votre fertilité ou à vérifier le succès de votre vasectomie, si vous en avez subi une. Il permettra d'examiner la quantité, la motilité et l'aspect général de vos spermatozoïdes. Il est très important que vous respectiez les instructions et les délais exposés ci-dessous pour nous permettre d'examiner les spermatozoïdes rapidement et avec précision.

Nom du laboratoire ou du centre de prélèvement : _____

Adresse et numéro de téléphone pour renseignement ou prise de rendez-vous (ajouter itinéraire au besoin) : _____

Jours et heures de réception des échantillons : _____

Se préparer avant la collecte : Respectez le nombre de jours d'abstinence recommandés par votre médecin. Normalement, vous devriez être abstinent de 2 à 5 jours. À moins d'avis contraire de votre médecin, ne dépassez pas 7 jours d'abstinence. L'abstinence est une période SANS éjaculation, y compris par masturbation. Si vous devez passer le test plus d'une fois, respectez le nombre de jours entre deux tests spécifié par votre médecin.

Comment faire la collecte

1. Présentez-vous à votre rendez-vous avec les articles et renseignements suivants :
 - votre ordonnance pour le test;
 - votre carte d'assurance maladie;
 - la date de votre dernière éjaculation;
 - votre échantillon si vous l'avez produit avant de venir à la clinique.
2. On vous remettra un contenant (sinon vous pouvez vous procurer un contenant stérile à la pharmacie).
3. Prenez garde de ne pas contaminer votre échantillon avec des lubrifiants ou de la salive.
4. Éjaculez dans le contenant fourni.
5. N'éjaculez pas plus d'une fois dans le contenant.
6. Si vous ne recueillez pas tout l'éjaculat (même si vous ne perdez que quelques gouttes), dites-le au personnel.
7. Refermez bien le contenant.
8. Remettez immédiatement votre contenant au personnel.

Note : Si vous produisez votre échantillon à la maison, apportez-le immédiatement au laboratoire ou au centre de prélèvement. Pendant le transport, gardez le contenant au contact de votre peau en tout temps pour qu'il reste à la température du corps. Le test doit débiter moins d'une heure après l'éjaculation.

Annexe 2

Mesures visant à mettre le patient à l'aise et à préserver son intimité

Les mesures suivantes visent à mettre à l'aise les hommes qui doivent produire leur échantillon en établissement ou qui viennent porter leur échantillon au laboratoire ou au centre de prélèvement. Elles visent également à préserver la confidentialité des échanges et l'intimité du patient. Ces mesures simples, peu coûteuses et rapides à mettre en place sont susceptibles de mettre le patient plus à l'aise de fournir un éjaculat.

En tant que professionnels, les technologistes médicaux doivent avoir une conduite irréprochable. Ils doivent notamment agir avec courtoisie, dignité, modération et objectivité ⁽³¹⁾. Ce comportement s'applique à toute relation avec les patients et prend toute son importance dans ce contexte particulier.

En remettant le contenant au patient :

- Assurer le patient que la pièce est bien insonorisée et qu'il peut en verrouiller la porte pour préserver son intimité (lors de collecte en établissement).
- Si cela est possible, informer le patient que sa conjointe peut l'accompagner s'il le souhaite (lors de collecte en établissement).
- Donner au patient un contenant et des instructions verbales et écrites, dans un vocabulaire précis et sans équivoque. Donner ces instructions à l'écart des autres patients, à l'abri des regards et des oreilles indiscrètes.
- Dire au patient où et comment remettre son échantillon une fois la collecte terminée.

Après que le patient ait quitté la pièce (lors de collecte en établissement) :

- Désinfecter la pièce (plancher, chaise, lavabo, distributeurs, poignées) suivant les directives de prévention des infections. Aucune trace du passage du patient précédent ne doit subsister.
- Vider la poubelle ou changer le sac qui la double entre chaque patient.

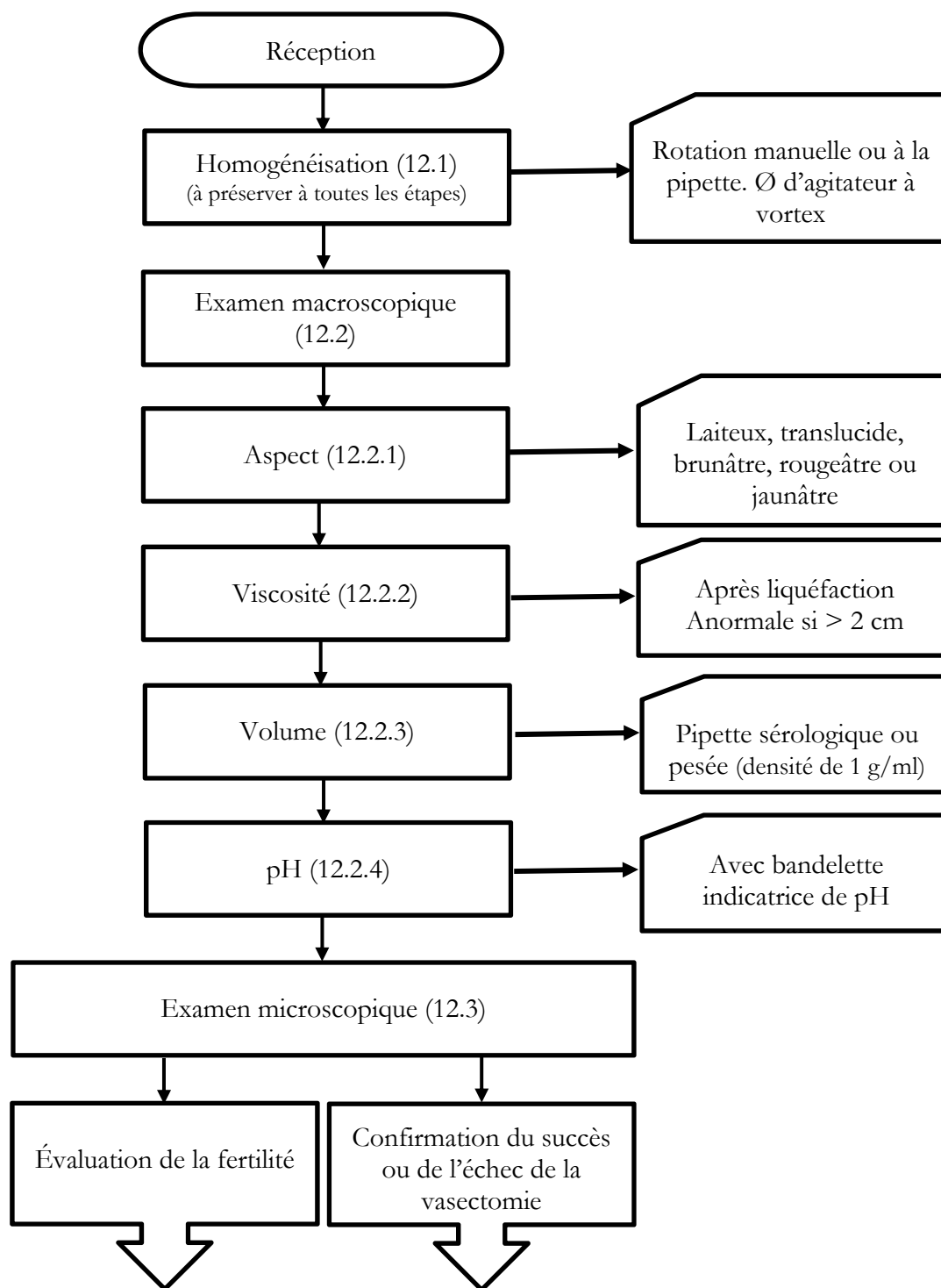
Annexe 3

Exemple de rapport d'évaluation de la fertilité (spermogramme)

Nom et adresse du laboratoire :	Logo
Identifiants du patient :	Identifiants du médecin :
Nom de la conjointe :	Nombre de jours d'abstinence :
Date et heure de la collecte :	Date et heure de l'arrivée au laboratoire :
Conformité de l'échantillon :	Heure du début de l'analyse :
Examen macroscopique	Valeurs de référence (5 ^e percentile; 5 ^e édition du manuel de l'OMS)
Aspect :	
Viscosité :	
Volume : ml	De 1,5 à 6,8 ml (95 ^e percentile)
pH :	≥ 7,2
Examen microscopique	
Temps de liquéfaction : (> ou < 60 minutes)	< 60 minutes
Observations générales :	
Concentration : spermatozoïdes/ml	≥ 15 x 10 ⁶ /ml
Valeur absolue : spermatozoïdes/éjaculat	≥ 39 x 10 ⁶ /éjaculat
Motilité :	
Progressifs (P) : %	> 32 %
Non progressifs (NP) : %	
Immobiles : %	
Motilité totale (P et NP) : %	> 40 %
Vitalité : %	> 58 % de spermatozoïdes vivants
Spermatozoïdes morphologiquement normaux : %	≥ 4 %
Notes :	
Effectué par :	Date :
Validé par :	Date :

Annexe 4

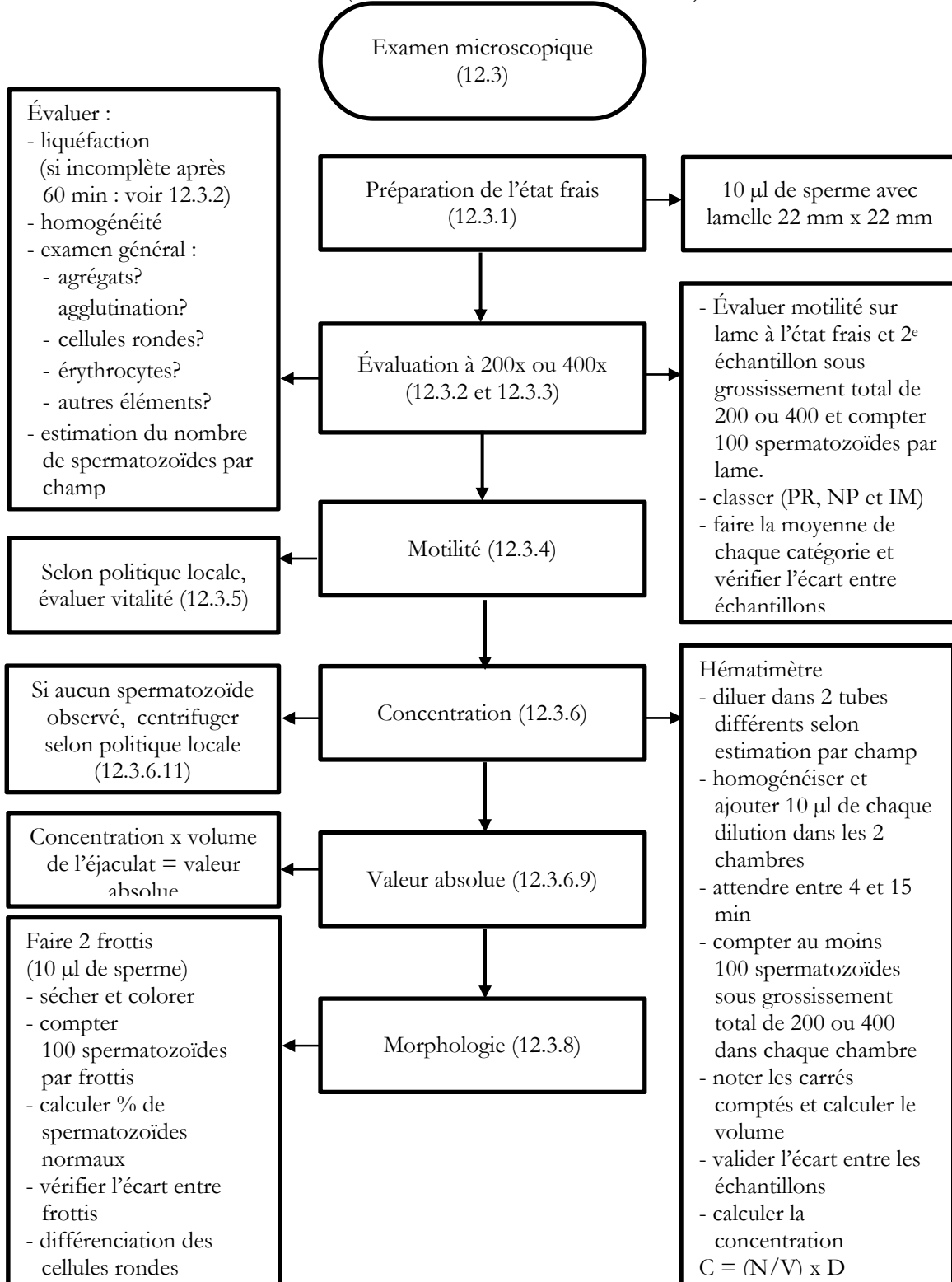
Aide-mémoire : Examen macroscopique de l'éjaculat



Annexe 5

Aide-mémoire : Examen microscopique visant l'évaluation de la fertilité

(CASA, voir instructions du fabricant)



Annexe 6

Estimé de la concentration des cellules rondes par champ dans 10 µl de sperme

Le tableau 5 à la page 85 peut servir à vérifier si la concentration des cellules rondes (leucocytes et spermatozoïdes immatures) dépasse le seuil de 1 million/ml, à partir d'un échantillon de 10 µl de sperme frais.

Ce tableau est valide pour les préparations de sperme à l'état frais faites avec 10 µl de sperme étalé entre lame et lamelle de 22 mm x 22 mm, examinées sous un microscope dont l'ouverture de champ est de 20 mm (volume d'un champ de 16,26 et 4,06 nl respectivement pour facteur de grossissement total de 200 et 400) ⁽¹⁾. **Pour adapter le calcul aux paramètres du microscope utilisé, consulter la grille fournie à l'annexe 7.**

Ces valeurs sont fondées sur le grossissement total spécifié (200 ou 400); si le grossissement et l'ouverture de champs des oculaires sont différents, il faut adapter le calcul en conséquence.

Les concentrations sont exprimées en spermatozoïdes par ml ($1\ 000/\text{ml} = 0,001 \times 10^6$ par ml).

Les cases grises représentent les valeurs qui dépassent le seuil de 1 million de cellules/ml. Si le résultat se situe dans les cases blanches, il n'est pas nécessaire d'ajouter une note au rapport. Si le résultat se situe dans les cases grises, rapporter comme suit : **« > 1 x 10⁶ cellules rondes/ml. Évaluation fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 µl prélevé sur le volume total de l'éjaculat ».**

En présence de plus de 1×10^6 cellules rondes par ml, la note suivante pourrait fournir plus d'indications à certains prescripteurs : **« Concentration des leucocytes possiblement > 1 x 10⁶/ml; à valider avec les données cliniques ».**

Exemple : Vous comptez 5 cellules rondes par champ sous grossissement total de 400, à l'évaluation de 10 µl de sperme à l'état frais étalé entre lame et lamelle de 22 mm x 22 mm sous un microscope dont l'ouverture de champ est de 20 mm. Vous estimez la concentration à 1 232 336. Vous rapportez le résultat comme suit : **« > 1 x 10⁶ cellules rondes/ml. Évaluation fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 µl prélevé sur le volume total de l'éjaculat ».**

Annexe 6 (suite)

Évaluation de la concentration des cellules rondes par champ dans 10 µl de sperme

Tableau 5 : **Concentration estimative des cellules rondes par ml d'éjaculat, fondé sur le nombre de cellules observées par champ dans 10 µl de sperme** (voir instructions d'utilisation à la page précédente).

Note : Calculs effectués en utilisant 2 décimales et arrondis par la suite.

Nombre de cellules rondes par champ examiné	Concentration estimative par ml	
	Grossissement total de 200	Grossissement total de 400
0/10	< 6 150	< 24 631
1/10	6 150	24 631
1/9	6 833	27 367
1/8	7 688	30 788
1/7	8 786	35 186
1/6	10 250	41 050
1/5	12 300	49 261
1/4	15 375	61 576
1/3	20 500	82 102
1/2	30 750	123 153
1	61 500	246 305
2	123 001	492 611
3	184 502	738 916
4	246 002	985 222
5	307 503	1 231 527
6	369 004	1 477 833
7	430 504	1 724 138
8	492 005	1 970 443
9	553 506	2 216 749
10	615 006	2 463 054
11	676 507	2 709 360
12	738 007	2 955 665
13	799 508	3 201 970
14	861 009	3 448 276
15	925 509	3 694 581
16	984 010	3 940 887
17	1 045 510	4 187 192
18	1 107 011	4 433 498
19	1 168 512	4 679 803
20	1 230 012	4 926 108

Tableau de Marc Bronsard et Ann Villeneuve, embryologistes, CHUS, CIUSSS de l'Estrie. Reproduit et adapté avec permission.

Annexe 7

Calcul estimatif du nombre de cellules rondes par ml, selon le facteur de grossissement

Pour corriger le calcul estimatif de la concentration de cellules rondes par ml pour le facteur de grossissement utilisé, suivre les étapes suivantes ou consulter la grille de calcul simplifiée à la page suivante.

Étape 1 : Calculer la profondeur de la préparation

Profondeur de la préparation (mm) = volume de l'échantillon en μl divisé par la surface de la lamelle en mm (longueur x largeur).

Exemple suivant les recommandations du guide, pour 10 μl de sperme sous lamelle de 22 mm x 22 mm :

$$10 \div (22 \times 22) = 0,02066 \text{ mm, équivariant à } 20,7 \mu\text{m}.$$

Étape 2 : Calculer le diamètre de champ

Diamètre de champ (mm) = ouverture de champ de l'oculaire en mm divisé par (facteur de grossissement de l'objectif x 1000).

Exemple pour un objectif 40x ayant une ouverture de 20 mm :

$$20 \div (40 \times 1000) = 0,0005 \text{ mm, équivariant à } 500 \mu\text{m}.$$

Étape 3 : Calculer le volume observé par champ

- 1) calculer le rayon (r) en μm , au moyen de la formule suivante : Diamètre de champ en μm (voir étape 2) divisé par 2 :

$$500 \div 2 = 250 \mu\text{m}$$

- 2) calculer la surface du champ en μm^2 , au moyen de la formule suivante : π multiplié par r^2 :

$$\text{Sachant que } r^2 = 250 \times 250 = 62\,500 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Alors, } 3,142 \times 62\,500 = 196\,375 \mu\text{m}^2$$

- 3) calculer le volume en μm^3 observé sous le champ, en multipliant la surface du champ en μm^2 par la profondeur de la préparation en mm (étape 1) :

$$196\,375 \times 20,7 = 4\,064\,962 \mu\text{m}^3.$$

- 4) convertir le volume du champ en nl (sachant que 1 nl = 1 000 000 μm^3) en le divisant par 1 000 000 :

$$4\,064\,962 \div 1\,000\,000 = 4,06 \text{ nl}$$

Étape 4 : Calculer la concentration des cellules rondes par ml

La concentration est égale au nombre de cellules rondes observées par champ divisé par le volume du champ en nl, puis multiplié par 1 000 000.

Si 2 cellules rondes sont observées :

$$(2 \div 4,06) \times 1\,000\,000 = 492\,611 \text{ cellules rondes/ml}$$

Annexe 7 (suite)

Calcul estimatif du nombre de cellules rondes par ml, selon facteur de grossissement

Grille de calcul simplifié

Échantillon à l'état frais de 20,7 µm d'épaisseur (volume de 10 µl sous lamelle de 22 mm x 22 mm)	
$(OC \div FG) \times 1000 = DC$	Ex : $(20 \div 40) \times 1000 = 500 \mu m$
$DC \div 2 = r$	Ex : $500 \div 2 = 250 \mu m$
$\{[\pi \times (r \times r)] \times P\} \div 1\,000\,000 = \text{volume observé par champ (VO)}$	Ex : $\{[3,142 \times (250 \times 250)] \times 20,7\} \div 1\,000\,000 = 4,06 \text{ nl}$
Nombre de cellules rondes par champ $\div VO \times 1\,000\,000 = \text{Concentration par ml}$	Ex : Si 2 cellules rondes sont observées par champ : $(2 \div 4,06) \times 1\,000\,000 = 492\,611 \text{ spermatozoïdes/ml}$

Légende

OC : ouverture de champ de l'oculaire (inscrit sur l'oculaire, ex., 20 mm) (voir figures 19 et 20)

FG : facteur de grossissement de l'objectif (inscrit sur l'objectif, ex., 40x)

DC : diamètre de champ (obtenu par calcul)

P : profondeur de la préparation

r : rayon du champ (obtenu par calcul)

VO : volume observé par champ (obtenu par calcul)

Figure 19. Éléments du microscope

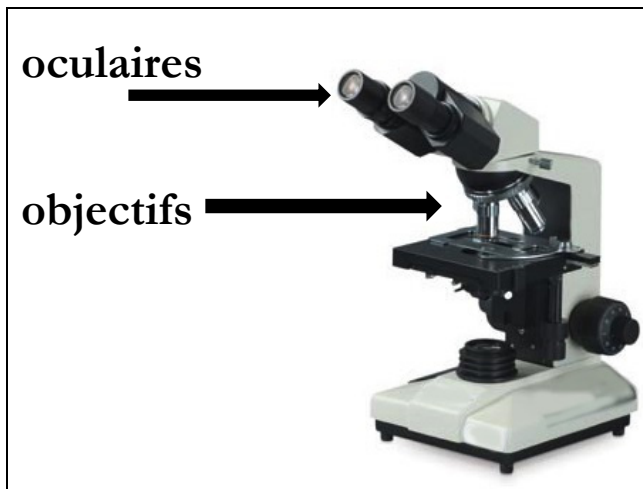


Figure 20. Oculaire dont le facteur de grossissement est de 10 x et le coefficient (ouverture) de champ est de 20 mm



Annexe 8

Tableaux des écarts acceptables entre échantillons

Le tableau 6 sert à comparer les valeurs moyennes obtenues dans chaque échantillon à l'évaluation de la motilité (point 12.3.4.4), de la vitalité (point 12.3.5.2) et de la morphologie (point 12.3.8.4).

Tableau 6. Écart acceptable entre les pourcentages obtenus à l'examen de 2 échantillons de 100 spermatozoïdes (total de 200 spermatozoïdes).

Moyenne (%)	Différence*	Moyenne (%)	Différence*
0	2	67 à 74	13
1	3	75 à 80	12
2	4	81 à 84	11
3	5	85 à 87	10
4	6	88 à 90	9
5 ou 6	7	91 à 93	8
7 à 9	8	94 à 95	7
10 à 12	9	96	6
13 à 15	10	97	5
16 à 19	11	98	4
20 à 25	12	99	3
26 à 33	13	100	2
34 à 66	14		

*Basé sur un intervalle de confiance à 95 %.

Tableau reproduit et traduit avec la permission non transférable de l'éditeur du *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, cinquième édition, Organisation mondiale de la Santé, Tableau A7.2, page 259, 2010 ⁽¹⁾.

Exemple : On évalue à 54 % et 50 % la proportion de spermatozoïdes progressifs sur le premier et le deuxième échantillon (100 spermatozoïdes par lame). La moyenne est de 52 % et l'écart, de 4. D'après le tableau 6, l'écart acceptable pour une moyenne allant de 34 à 66 % est égal ou inférieur à 14. L'écart de 4 est donc acceptable.

Annexe 8 (suite)

Tableaux des écarts acceptables entre échantillons

Le tableau 7 sert à calculer l'erreur d'échantillonnage suivant le nombre de spermatozoïdes comptés à l'hématimètre (point 12.3.6.5).

Tableau 7. Erreur d'échantillonnage arrondie (%) selon le nombre total de spermatozoïdes

Total (nombre)	Erreur d'échantillonnage (%)	Total (nombre)	Erreur d'échantillonnage (%)	Total (nombre)	Erreur d'échantillonnage (%)
1	100	25	20	88	10,8
2	70,7	30	18,3	90	10,5
3	57,7	35	16,9	95	10,3
4	50	40	15,8	100	10
5	44,7	45	14,9	150	8,2
6	40,8	50	14,1	200	7,1
7	37,8	55	13,5	250	6,3
8	35,4	60	12,9	300	5,8
9	33,3	65	12,4	350	5,3
10	31,6	70	12	400	5
15	25,8	75	11,5	450	4,7
20	22,4	80	11,2	500	4,5

Tableau reproduit et traduit avec la permission non transférable de l'éditeur du *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, cinquième édition, Organisation mondiale de la Santé, Tableau 2.2, page 37, 2010⁽¹⁾.

Exemple : On compte 100 spermatozoïdes dans chaque chambre de l'hématimètre. D'après le tableau 7, l'erreur d'échantillonnage est de 7,1 % pour 200 spermatozoïdes.

Annexe 8 (suite)

Tableaux des écarts acceptables entre échantillons

Le tableau 8 sert à établir l'acceptabilité de l'écart de nombre de spermatozoïdes comptés dans deux échantillons à l'hématimètre (point 12.3.6.6).

Tableau 8. Écart acceptable entre les valeurs obtenues dans deux échantillons, compte tenu du nombre total de spermatozoïdes

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

*Basé sur un intervalle de confiance arrondi de 95 %.

Tableau reproduit et traduit avec la permission non transférable de l'éditeur du *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, cinquième édition, Organisation mondiale de la Santé, Tableau A7.1, page 255, 2010⁽¹⁾.

Exemple : Premier échantillon : 126 spermatozoïdes; deuxième échantillon: 134 spermatozoïdes, totalisant 260. Différence de 8.

D'après le tableau 8, pour un total de 260 spermatozoïdes, l'écart doit être égal ou inférieur à 32. L'écart de 8 est donc acceptable.

Annexe 9

Protocole de coloration à l'éosine-nigrosine en vue de l'évaluation de la vitalité

A. Préparation des réactifs

- Éosine Y : Dissoudre 0,67 g d'éosine Y (indice de couleur 45380) et 0,9 g de chlorure de sodium (NaCl) dans 100 ml d'eau purifié en chauffant la solution modérément.
- Éosine-nigrosine : ajouter 10 g de nigrosine (indice de couleur 50420) à la solution d'éosine Y.
- Faire bouillir la suspension, puis laisser refroidir à la température ambiante.
- Filtrer avec un papier filtre (proposition : 90 g/m²) pour enlever les dépôts grossiers et gélatineux. Conserver dans une bouteille scellée en verre sombre.

B. Procédure

- Bien homogénéiser l'éjaculat.
- Retirer un échantillon de 50 µl de l'éjaculat et mélanger avec une partie égale de la suspension éosine-nigrosine; laisser reposer 30 secondes.
- Mélanger et étaler un frottis sur une lame.
- Préparer un deuxième échantillon en répétant les étapes précédentes.
- Examiner les lames dès qu'elles sont sèches ou les monter avec un milieu de montage permanent non aqueux.

C. Examen de la lame

- Examiner chaque lame au microscope ordinaire (à fond clair) sous grossissement total de 1000 en immersion à l'huile.
- Compter les spermatozoïdes colorés (morts) et non colorés (vivants).
- Évaluer 200 spermatozoïdes par échantillon afin d'obtenir une erreur d'échantillonnage suffisamment faible.
- Calculer les pourcentages de spermatozoïdes vivants sur chaque lame et la différence entre les deux pourcentages obtenus. Calculer les pourcentages moyens.
- Établir si l'écart entre les pourcentages est acceptable (tableau 6 de l'annexe 8).
- Si l'écart est acceptable, rapporter la moyenne des pourcentages de spermatozoïdes vivants, arrondie au plus proche nombre entier.
- Si la différence est trop grande pour être acceptée, recommencer la dilution de deux autres échantillons, en prenant soin de bien homogénéiser l'éjaculat à chaque étape et refaire le comptage.

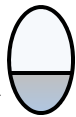
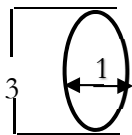
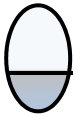
Protocole traduit et adapté de la cinquième édition du manuel de l'OMS ⁽¹⁾.

Note : Certaines références et procédures internes proposent des recettes différentes pour la préparation. Ces recettes, ainsi que celle de l'OMS, doivent être validées et adaptées au besoin avant leur usage.

Annexe 10

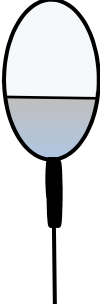
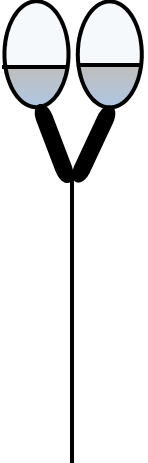
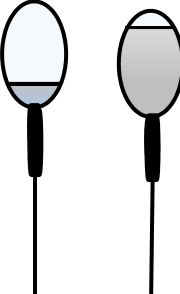
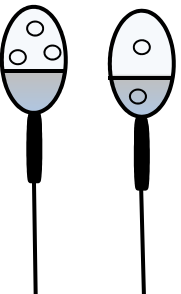
Anomalies morphologiques du spermatozoïde

L'algorithme qui suit peut aider à établir si un spermatozoïde est normal ou anormal et à le classer par catégorie d'anomalie. Il peut être plus facile d'évaluer les spermatozoïdes un à un à partir de ces simples critères que de tenter de les évaluer tous en même temps. Dès qu'une anomalie est constatée, on peut considérer le spermatozoïde comme étant anormal. S'il faut également calculer la fréquence (pourcentage) de chaque anomalie, on évaluera le spermatozoïde pour chaque catégorie d'anomalie, car un même spermatozoïde peut avoir plus d'une anomalie⁽¹⁾.

Critères de normalité de la tête ⁽¹⁾ :		
Parties de la tête -acrosome →  -région post-acrosomique → 	-La tête est ovale dans une proportion de 3 : 1	
-Le contour de la tête est lisse et régulier		
L'acrosome occupe entre 40 et 70 % de la tête	70 % 	40% 
-Absence de vacuole dans la région post-acrosomique		
-Absence de grosse vacuole dans l'acrosome (ou si présence, ne doit pas occuper plus de 20 % de la tête)		
-Pas plus de 2 vacuoles dans l'acrosome		
-Les 2 vacuoles dans l'acrosome n'occupent pas plus de 20 % de la tête		

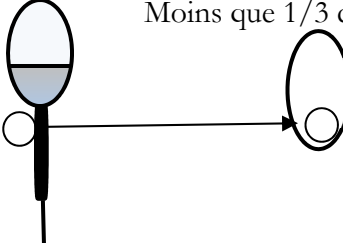
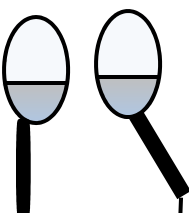
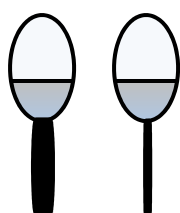
Annexe 10 (suite)

Anomalies morphologiques du spermatozoïde

Questions à se poser :				
L'acrosome occupe-t-il moins de 40 % ou plus de 70 % de la tête?				
Y a-t-il une vacuole dans la région post-acrosomique?				
Y a-t-il une grosse vacuole (qui occupe plus de 20 % de la tête) dans l'acrosome?				
Y a-t-il plus de 2 vacuoles?				
S'il y a 2 vacuoles, occupent-elles ensemble plus de 20 % de la tête?				
Est-ce que la tête est d'une autre forme que la forme ovale? La proportion de 3 : 1 est-elle respectée?				
Le contour de la tête est-il irrégulier (non lisse)?				
Est-ce que la tête est pyriforme (en forme de V)?				
Si l'on répond oui à n'importe laquelle de ces questions, on peut considérer que le spermatozoïde est anomal.				
Si l'on répond non à toutes ces questions, on continue l'analyse morphologique en observant la pièce intermédiaire.				
Défauts de la tête				
S'il faut indiquer le type d'anomalie, on précisera si la tête est :				
petite (microcéphalie)	grosse (macrocéphalie)	ronde	allongée (effilée)	amorphe (forme non définie).
				
double (bicéphalie)	pyriforme (tête en poire ou forme de cornet)	dépourvue d'acrosome ou pourvue d'un acrosome anormal (< 40 % ou > 70 % de sa surface)	vacuolée (plus que 2 vacuoles ou > 20 % de la tête) ou s'il y a des vacuoles dans la région post-acrosomique;	
				

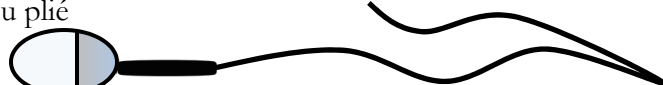
Annexe 10 (suite)

Anomalies morphologiques du spermatozoïde

Critères de normalité de la pièce intermédiaire ⁽¹⁾ :			
La pièce intermédiaire est environ de la même longueur que la tête	La pièce intermédiaire n'est pas pliée.	La pièce intermédiaire se situe dans l'axe central de la tête	La pièce intermédiaire est environ 3 fois plus épaisse que le flagelle
			
La présence d'une goutte cytoplasmique est normale, tant que la goutte n'est pas plus grande que le tiers de la tête		 Moins que 1/3 de la tête :	
Questions à se poser :			
La pièce intermédiaire est-elle trop longue ou trop courte?			
La pièce intermédiaire est-elle pliée?			
La pièce intermédiaire est-elle décentrée?			
La pièce intermédiaire est-elle trop mince ou trop épaisse?			
La goutte cytoplasmique est-elle trop grosse?			
Si l'on répond oui à n'importe laquelle de ces questions, on peut considérer que le spermatozoïde est anomal.			
Si l'on répond non à toutes ces questions, on continue l'analyse morphologique en observant le flagelle.			
Défauts de la pièce intermédiaire			
S'il faut indiquer le type d'anomalie, on précisera si la pièce intermédiaire est :			
pliée (angulée ou tordue)	décentrée ou désaxée	trop épaisse ou trop mince	goutte cytoplasmique plus grande que le tiers de la tête ⁽⁶⁰⁾
			

Annexe 10 (suite)

Anomalies morphologiques du spermatozoïde

Critères de normalité du flagelle ⁽¹⁾ :			
Le flagelle est environ 10 fois plus long que la tête (45 µm)	Le flagelle peut être courbé, mais pas plié à angle net	Le bout du flagelle n'est pas tourné sur lui-même	L'épaisseur du flagelle est homogène sur toute sa longueur (en s'amincissant au bout)
			
Questions à se poser :			
Le flagelle est-il trop long ou trop court?			
Le flagelle est-il plié ou angulé?			
Le bout du flagelle est-il enroulé?			
L'épaisseur du flagelle varie-t-elle?			
Si l'on répond oui à n'importe laquelle de ces questions, on peut considérer que le spermatozoïde est anomal. Si l'on répond non à toutes ces questions, on peut considérer que le spermatozoïde est normal.			
Défauts du flagelle			
S'il faut indiquer le type d'anomalie, on précisera si le flagelle est :			
absent			
court			
enroulé			
multiple (plus d'un flagelle)			
angulé ou plié			
de calibre irrégulier			

Source : Isabelle Bégin, M.Sc., embryologiste, anciennement au CPA du CHU Ste-Justine.
Reproduit et adapté avec permission.

Annexe 11

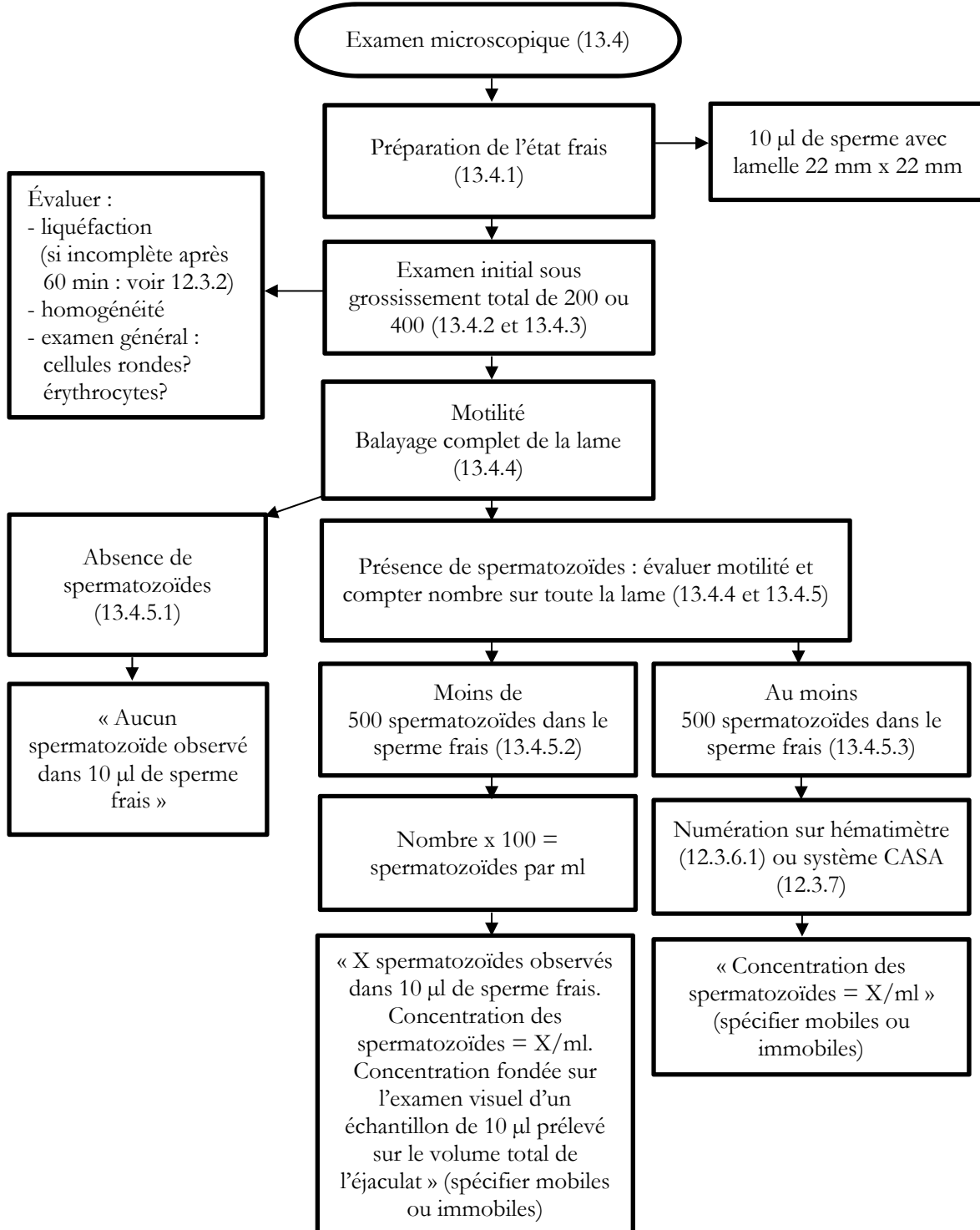
Exemple de rapport de confirmation du succès ou de l'échec de la vasectomie

Nom et adresse du laboratoire :	Logo :	
Identifiants du patient :	Identifiants du médecin :	
Date et heure de la collecte :	Date et heure de l'arrivée au laboratoire :	
Nombre de jours d'abstinence :		
Conformité de l'échantillon :	Heure du début de l'analyse :	
Examen macroscopique	Valeurs de référence (5 ^e percentile; 5 ^e édition du manuel de l'OMS)	
Aspect :		
Viscosité :		
Volume :	ml	De 1,5 à 6,8 ml (95 ^e percentile)
pH :	≥ 7,2	
Examen microscopique		
Motilité :	Selon les lignes directrices de l'Association européenne d'urologie (AEU) (2012) et de l'Association américaine d'urologie (AUA) (2012), l'efficacité occlusive de la vasectomie est confirmée quand les deux conditions suivantes sont réunies : aucun spermatozoïde mobile n'est observé et la concentration de spermatozoïdes est égale ou inférieure à 100 000/ml ($0,1 \times 10^6$ /ml).	
Observations générales (p. ex., éléments cellulaires) :		
Concentration : Sélectionner selon le résultat : -Aucun spermatozoïde observé dans 10 µl de sperme frais. -X spermatozoïdes immobiles observés dans 10 µl de sperme frais. Concentration des spermatozoïdes : X/ml. Concentration fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 µl prélevé sur le volume total de l'éjaculat. -X spermatozoïdes observés dans 10 µl de sperme frais. Présence de spermatozoïdes mobiles. Concentration des spermatozoïdes : X/ml. Concentration fondée sur l'examen visuel d'un échantillon de 10 µl prélevé sur le volume total de l'éjaculat. -Concentration de spermatozoïdes x/ml (si mesurée sur hématimètre de Neubauer). Spécifier si mobiles ou immobiles.		
Notes :		
Effectué par :	Date :	
Validé par :	Date :	

Annexe 12

Aide-mémoire : Examen microscopique du sperme en vue de confirmer le succès ou l'échec de la vasectomie

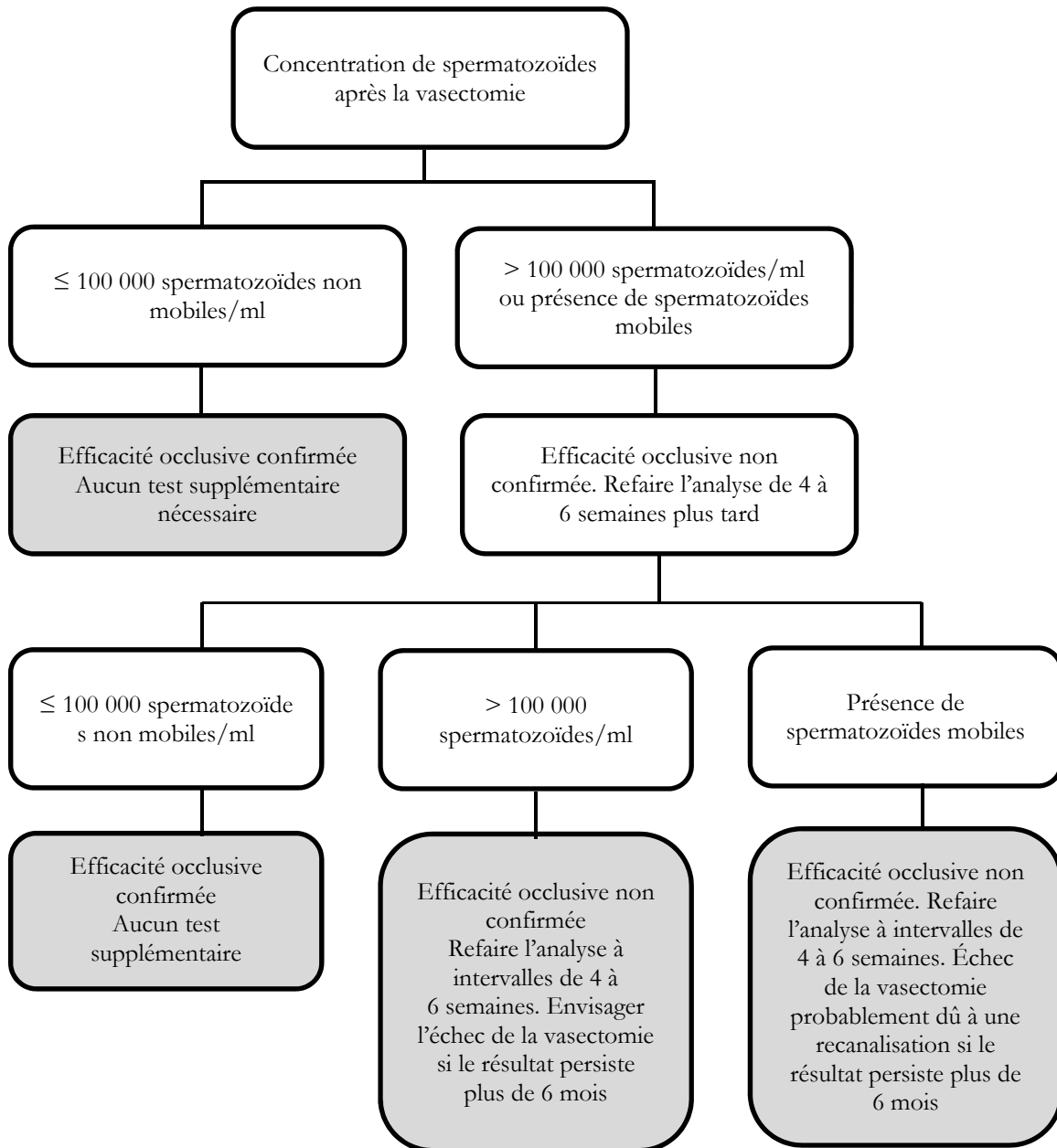
(CASA, voir instructions du fabricant)



Annexe 13

Algorithme d'interprétation du spermogramme post-vasectomie à l'intention du médecin

Le diagramme qui suit permet au médecin d'établir si l'intervention chirurgicale est un succès ou non. Il faut noter que les technologistes médicaux ne peuvent pas poser un diagnostic, c'est-à-dire affirmer si le patient est stérile ou non, ou si l'intervention est réussie. Ces renseignements sont fournis à titre informatif seulement afin d'aider le technologiste médical à comprendre les résultats obtenus.



Source : LABREQUE, Michel, et autres. Re : How Little is Enough? The Evidence for Post-Vasectomy Testing. *The Journal of Urology*. 2006, Vol. 175, N° 2, p. 791-792⁽⁷⁶⁾.

Annexe 13 (suite)

Algorithme d'interprétation du spermogramme post-vasectomie à l'intention du médecin

On envisage la possibilité que la vasectomie ait échoué quand la concentration de spermatozoïdes non mobiles est égale ou supérieure à 100 000/ml ($0,1 \times 10^6$ /ml) plus de 6 mois après la vasectomie⁽⁷⁶⁾.

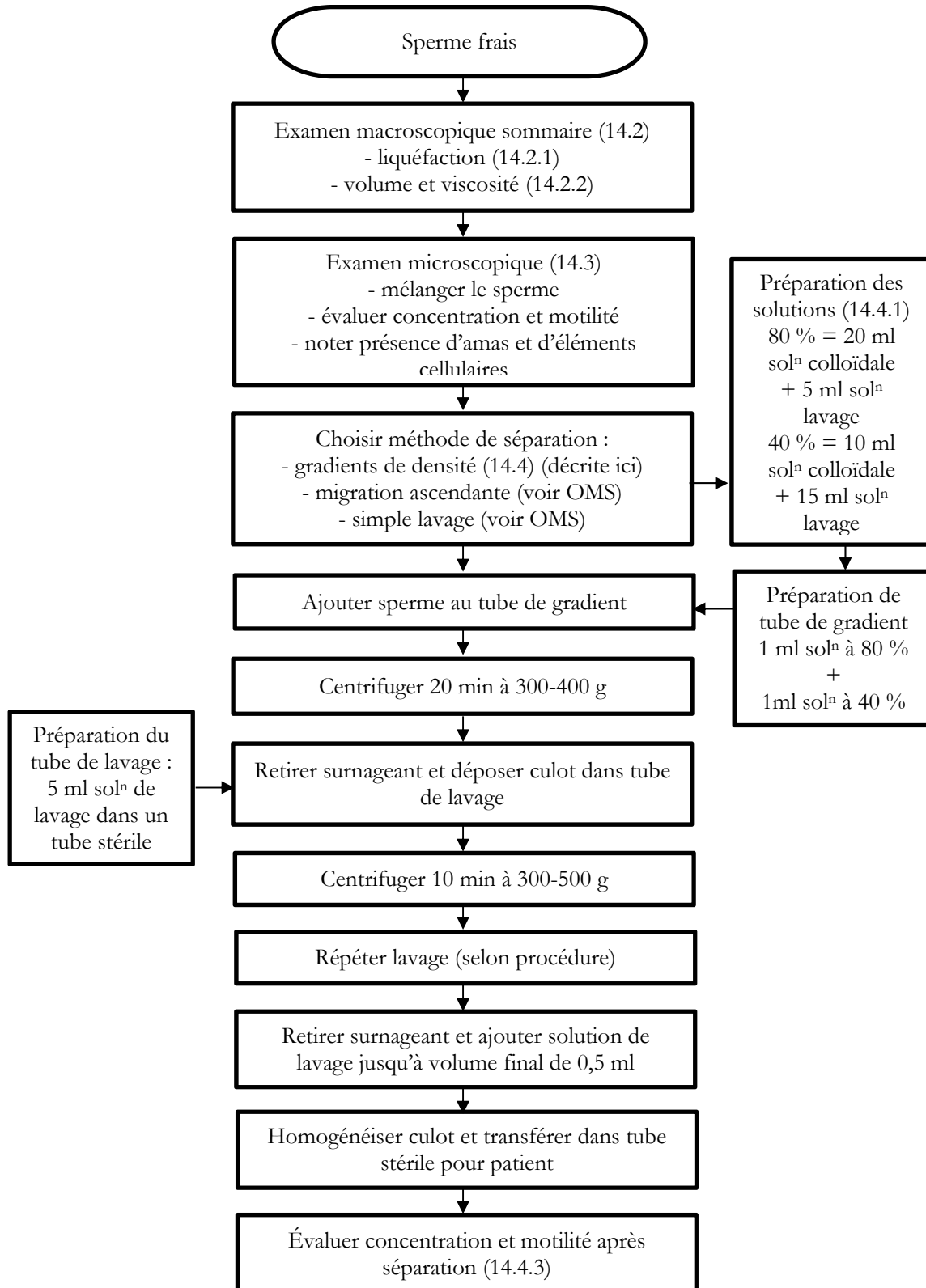
On considère que la vasectomie a échoué en présence de spermatozoïdes mobiles plus de 6 mois après la vasectomie **ou** si la conjointe du patient tombe enceinte de celui-ci après la confirmation du succès de l'intervention⁽⁴⁾.

L'échec de la vasectomie est généralement dû à la recanalisation spontanée d'un des canaux déférents. Il arrive moins souvent que l'échec de la vasectomie soit dû à une erreur chirurgicale (p. ex., intervention chirurgicale pratiquée deux fois sur le même canal et non sur chaque canal, non-reconnaissance de la rare duplication d'un canal)⁽⁷⁷⁾.

L'échec de la vasectomie due à une erreur chirurgicale se traduit généralement par la présence persistante de spermatozoïdes mobiles et en concentration normale. La recanalisation spontanée se caractérise souvent par une plus faible concentration de spermatozoïdes. Observée après la réalisation du premier spermogramme post-vasectomie, une telle situation peut être transitoire (la stérilité étant confirmée moins de 6 mois après la vasectomie) ou persistante (durer plus de 6 mois)⁽⁷⁷⁾.

Annexe 14

Aide-mémoire : Préparation du sperme en vue de l'insémination selon la méthode des gradients de densité



Annexe 15

Exemple de rapport de préparation de sperme

Nom et adresse du laboratoire :	Logo
Identifiants du patient :	Identifiants du médecin :
Nom de la conjointe :	Nombre de jours d'abstinence :
Date et heure de la collecte :	Date et heure de l'arrivée au laboratoire :
Conformité de l'échantillon :	Heure du début de l'analyse :
Examen macroscopique	Valeurs de référence (5 ^e percentile; 5 ^e édition du manuel de l'OMS)
Aspect :	
Viscosité :	
Volume : ml	De 1,5 à 6,8 ml (95 ^e percentile)
pH :	≥ 7,2
Examen microscopique initial	
Temps de liquéfaction : (> ou < 60 minutes)	< 60 minutes
Observations générales :	
Concentration : spermatozoïdes/ml	≥ 15 x 10 ⁶ /ml
Valeur absolue : spermatozoïdes/éjaculat	≥ 39 x 10 ⁶ /éjaculat
Motilité :	
Progressifs (P) : %	> 32 %
Non-progressifs (NP) : %	
Immobiles : %	
Motilité totale (P et NP) : %	> 40 %
Examen après la préparation	
Concentration : spermatozoïdes/ml	
Motilité :	
Progressifs (P) : %	
Non-progressifs (NP) : %	
Immobiles : %	
Motilité totale (P et NP) : %	
Préparation du sperme	
Concentration des spermatozoïdes mobiles injectés : x 10 ⁶ /ml (concentré dans 0,5 ml de solution de lavage (<i>ajouter nom du produit</i>))	
Gradient 40-80 % :	
Lot de solution de lavage (<i>ajouter nom du produit</i>)	
Lot de solution colloïdale (<i>ajouter nom du produit</i>)	
Effectué par :	Date :
Validé par :	Date :

BIBLIOGRAPHIE

1. WORLD HEALTH ORGANISATION. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, Fifth Edition, Genève, WHO, 2010, 271 p.
2. BJÖRNDAL, Lars, et autres. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*, New York, Cambridge University Press, 2010, 336 p.
3. DOHLE, Gert R., et autres. « European Association of Urology Guidelines on Vasectomy », *European Urology*, 2012, Vol. 61, p. 159-163.
4. SHARLIP, Ira D., et autres. *American Urological Association Guideline Vasectomy*, American Urological Association Education and Research Inc., May 2012, 60 p.
5. MORTIMER, David. *Practical Laboratory Andrology*, New York, Oxford University Press Inc., 1994, 393 p.
6. OFFICE QUÉBÉCOIS DE LA LANGUE FRANÇAISE. *Le grand dictionnaire terminologique*. [En ligne] <http://www.oqlf.gouv.qc.ca/ressources/gdt.html>. Consulté le 28 juillet 2016.
7. LAROUSSE. *Dictionnaire de français Larousse*. [En ligne] <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais>. Consulté le 28 juillet 2016.
8. ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO 9000:2005 (F) Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire*, quatrième édition, Genève, ISO, 2015, 53 p.
9. ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO15189:2012(F) Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence*, troisième édition (version corrigée 2014-08-15), Genève, ISO, 2012, 52 p.
10. CONSEIL CANADIEN D'AGRÈMENT DES SERVICES DE SANTÉ. *Programme d'agrément du CCASS: Glossaire*, sixième édition, Ottawa, CCASS, 2007, 43 p.
11. *Loi sur les services de santé et les services sociaux*. (RLRQ, chapitre S-4.2).
12. MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Conformité des laboratoires de biologie médicale à la norme CAN/CSA-15189 "Laboratoire d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence"*. 2005-03-21. Circulaire No 2005-007.
13. *Loi sur les activités cliniques et de recherche en matière de procréation assistée* (RLRQ, chapitre A-5.01).
14. ORDRE PROFESSIONNEL DES TECHNOLOGISTES MÉDICAUX DU QUÉBEC. *La qualité dans les laboratoires de biologie médicale: Règles de pratique*, deuxième édition, Montréal, OPTMQ, 2009, 98 p.
15. *Loi sur la santé et la sécurité du travail* (RLRQ, chapitre S-2.1).
16. ORDRE PROFESSIONNEL DES TECHNOLOGISTES MÉDICAUX DU QUÉBEC. quatrième édition *Normes de pratique du technologiste médical*, Montréal, OPTMQ, 2015, 18 p.
17. *Règlement sur la santé et la sécurité du travail* (RLRQ, chapitre S-2.1, r.13).
18. SHEMATEK, Gene, et Wayne WOOD. *La sécurité au laboratoire-Directives de la SCSLM*, septième édition, Hamilton, Société canadienne de science de laboratoire médical, 2012, 129 p.

19. ASSOCIATION CANADIENNE DE NORMALISATION. *CAN/CSA-Z15190 Medical laboratories - Requirements for safety (Laboratoires de médecine - Exigences pour la sécurité)*, Mississauga, Association canadienne de normalisation, 2005, 39 p.
20. AGENCE DE LA SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA. *Norme canadienne sur la biosécurité*, deuxième édition, Ottawa, Agence de la santé publique du Canada, 2015, 168 p.
21. AGENCE DE LA SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA. *Guide canadien sur la biosécurité*, deuxième édition, Ottawa, Agence de la santé publique du Canada, 2016, 264 p.
22. ASSOCIATION PARITAIRE POUR LA SANTÉ ET LA SÉCURITÉ DU TRAVAIL DU SECTEUR AFFAIRES SOCIALES (ASSTSAS). *Fiche technique ASSTSAS laboratoire: Travail au microscope*, Montréal, ASSTSAS, 2005, 4 p.
23. ASSOCIATION PARITAIRE POUR LA SANTÉ ET LA SÉCURITÉ DU TRAVAIL DU SECTEUR AFFAIRES SOCIALES (ASSTSAS). *Fiche technique ASSTSAS laboratoire: Pipettage*, Montréal, ASSTSAS, 2011, 4 p.
24. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Training and Competence Assessment; Approved Guideline - Third Edition*, CLSI document QMS03-A3, Wayne, PA, CLSI, 2009, 69 p.
25. CANADIAN FERTILITY AND ANDROLOGY SOCIETY. *Guidelines for the Evaluation and Development of Competencies for ART Laboratory Professionals*. [En ligne] http://www.cfas.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=945%3Aguidelines-evaluation-and-development-competencies-art-pro&catid=1000%3Aguidelines-art-lab-sig-&Itemid=254. Consulté le 4 décembre 2015.
26. MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Unité du laboratoire de biologie médicale - Répertoire des guides de planification immobilière*, 2014, 112 p.
27. GROUPE CSA. *Z316.7-12 Établissements effectuant la collecte d'échantillons primaires et laboratoires d'analyses de biologie médicale – Sécurité du patient et qualité des soins – Exigences pour la collecte, le transport et la conservation des échantillons*, Mississauga, Groupe CSA, Mise à jour No 1 mars 2014, 55 p.
28. *Code de construction du Québec* (RLRQ, chapitre B-1.1, r. 2).
29. ASSOCIATION OF BIOMEDICAL ANDROLOGISTS. « Laboratory Andrology Guidelines for Good Practice Version 3 -2012 », *Human Fertility*, 2012, Vol. 15, No 4, p. 156-173.
30. MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX. *Unité des cliniques externes - Répertoire des guides de planification immobilière*, 2012, 33 p.
31. *Code de déontologie des membres de l'Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec* (RLRQ, chapitre C-26, r. 243).
32. *Règlement d'application de la Loi sur les laboratoires médicaux, la conservation des organes et des tissus et la disposition des cadavres* (RLRQ, chapitre L-0.2, r.1).
33. *Règlement sur les normes relatives aux ordonnances faites par un médecin* (RLRQ, chapitre M-9, r.25).
34. COOPER, Trevor G., et autres. « Ejaculate Volume Is Seriously Underestimated When Semen Is Pipetted or Decanted Into Cylinders From the Collection Vessel », *Journal of Andrology*, January / February 2007, Vol. 28, No 1, p. 1-4.

35. COLLÈGE DES MÉDECINS DU QUÉBEC. *Les activités de procréation médicalement assistée, démarche clinique et thérapeutique*, Montréal, CMQ, 2015, 138 p.
36. ORDRE PROFESSIONNEL DES TECHNOLOGISTES MÉDICAUX DU QUÉBEC. *Transport et conservation des échantillons dans le domaine de la biologie médicale: Règles de pratique*, quatrième édition, Montréal, OPTMQ, 2010, 71 p.
37. *Règlement sur le transport des marchandises dangereuses*, Ottawa, Ministère de la Justice du Canada, dernière modification le 1er juin 2016, DORS/2016-95.
38. CHROMSRIMEK, Natta, et autres. « Effect of Time between Ejaculation and Analysis on Sperm Motility », *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*, avril 2008, Vol. 16, No 2, p. 109-114.
39. KAMISCHKE, A., et NIESCHLAG, E. « Treatment of Retrograde Ejaculation and Anejaculation. *Human Reproduction Update* », 1999, Vol. 5, No 5, p. 448-474.
40. SUCKCHAROEN N., et autres. « A comparison of Mackler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement », *J Med Assoc Thai*, septembre 1994, Vol. 77, No 9, p. 471-476.
41. CHRISTENSEN, P., et autres. « Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers », *Theriogenology*, mars 2005, Vol. 63, No 4, p. 992-1003.
42. Leja. "Leja disposable counting chambers". [En ligne] <http://www.leja.nl/tekst/31/>. consulté le 20 juillet 2016.
43. MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX DU QUÉBEC. *Obligation pour tous les laboratoires de biologie médicale du Québec de mettre en place des contrôles internes de qualité et participer à des contrôles externes de qualité, notamment ceux offerts par le Laboratoire de santé publique du Québec*, Circulaire No 2010-020, 2010.
44. American Urological Association. *The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement*, Linthicum, Maryland, American Urological Association Education and Research Inc, 2010, 38 p.
45. HAMAMAH, S. et BARTHELEMY, C. Spermogramme et tests de fécondance: Intérêt et limites. *JTA Chapitre V- Fertilité et stérilité masculine*. [En ligne] 1997. http://www.lesjta.com/article.php?ar_id=185. Consulté le 28 juillet 2016.
46. ESTEVES, Sandro C. « Clinical relevance of routine semen analysis and controverses surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination », *Int Braz J Urol*, 2014, Vol. 40, No 4, p. 443-453.
47. VASAN, S. S. « Semen analysis and sperm function tests: How much to test? », *Indian J Urol*, 2011, Vol. 27, No 1, p. 41-48.
48. McPHERSON, Richard, A., et PINCUS, Matthew, R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21e édition, Philadelphia, PA, Saunders Elsevier Inc., 2007, 1450 p.
49. RINGSRUD, Karen Munson, et LINNÉ, Jean Jorgenson. *Urinalysis and Body Fluids A ColorText and Atlas*, Philadelphia, PA, Mosby, 1995, 249 p.
50. JOHANISSON, E., et autres. « Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study », *Human Reproduction Update*, 2000, Vol. 6, No 4, p. 404-412.

51. KRUGER, Thinus F. et FRANKEN, Daniel R. *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*, London, Taylor & Francis, CRC press, 2004, 86 p.
52. BARRATT, C.L.R., et autres. « ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance », *Human Reproduction*, 2011, Vol. 26, No 12, p. 3207-3212.
53. MEHTA, Jayant et WOODWARD, Bryan. *Male Infertility: Sperm Diagnosis, Management and Delivery*, London, JP Medical Ltd., 2014, 135 p.
54. COOPER, T.G., et autres. « Azoospermia: Virtual Reality or Possible to Quantify? », *Journal of Andrology*, 2006, Vol. 27, No 4, p. 483-490.
55. SHEKARRIZ, Mohammad, et autres. « A Method of Human Semen Centrifugation to Minimize the Iatrogenic Sperm Injuries Caused by Reactive Oxygen Species », *Eur Urol*, 1995, Vol. 28, p. 31-35.
56. MORTIMER, David et MENKVELD, Roelof. « Sperm Morphology Assessment-Historical Perspective and Current Opinions », *Journal of Andrology*, 2001, Vol. 22, No 2, p. 192-205.
57. ESHRE Andrology Special Interest Group. « Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa », *Human Reproduction*, 1998, Vol. 13, No 1, p. 142-145.
58. MORTIMER, SHARON T., et autres. « The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* », 2015, Vol. 17, p. 545-553.
59. ADELMAN, Marilyn M., et CAHILL, Eileen M. *Atlas of Sperm Morphology*, Chicago, ASCP Press, 1989. 111 p.
60. SCHILL, Wolf-Bernhard, et autres. *Traité d'andrologie à l'usage des cliniciens*, France, Springer-Verlag, 2008, 635 p.
61. STRASINGER, Susan King, et DI LORENZO, Marjorie Schaub. *Urinalysis and Body Fluids*, Fifth Edition, Philadelphia, PA, F. A. Davis Company, 2008, 292 p.
62. LABRECQUE, Michel, et autres. « Delayed vasectomy success in men with a first postvasectomy semen analysis showing motile sperm », *Fertility and Sterility*, mai 2005, Vol. 83, No 5, p. 1435-1441.
63. HANCOCK, P., et autres. « 2016 Laboratory guideline for postvasectomy semen analysis: Association of Biomedical Andrologists, the British Andrology Society and the British Association of Urological Surgeons », *J Clin Pathol*, juillet 2016, Vol. 69, No 7, p. 655-660.
64. STEWARD, Bonika, et autres. « Diagnostic Accuracy of an Initial Azoospermic Reading Compared With Results of Post-Centrifugation Semen Analysis After Vasectomy », *The Journal of Urology*, novembre 2008, Vol. 180, p. 2119-2123.
65. KORTHORST, Ruben A., et autres. « Clearance after vasectomy with a single semen sample containing < than 100 000 immotile sperm/mL: analysis of 1073 patients », *BJU International*, 2009, Vol. 105, p. 1572-1575.
66. Institut national d'excellence en santé et en services sociaux. *Procréation assistée*, Gouvernement du Québec, février 2015, 65 p.

67. *Loi sur les aliments et drogues*. Ottawa, Ministère de la Justice du Canada, dernière modification le 6 novembre 2014, L.R.C. (1985), ch. F-27.
68. *Règlement sur le traitement et la distribution du sperme destiné à la reproduction assistée*. Ottawa, Ministère de la Justice du Canada, dernière modification le 15 juin 2016, DORS/96-254.
69. Santé Canada, Programme des produits thérapeutiques. *Directive de Santé Canada: Exigences techniques en matière d'insémination thérapeutique avec sperme de donneur*. Ottawa, Santé Canada, juillet 2000, 21 p.
70. *Règlement sur les activités cliniques en matière de procréation assistée* (RLRQ, chapitre A-5.01, r. 1).
71. Groupe CSA. *CAN/CSA-Z900.2.1-12 Tissus destinés à la reproduction assistée*, deuxième édition, Mississauga, Groupe CSA, 2012, 56 p.
72. BOTROS, Rizk, et autres. *Medical & surgical management of male infertility*, New Delhi, Philadelphia, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2014, 330 p, Chapter 29 Sperm Preparation and Selection Techniques.
73. ASSOCIATION CANADIENNE DES PATHOLOGISTES. *The Retention and Use of Human Biologic Material*. [En ligne] novembre 2005. http://stage.cap-acp.org/guide_retention-human-biologic-material.php. Consulté le 15 février 2016.
74. *Règlement sur les déchets biomédicaux* (RLRQ, chapitre Q-2, r.12).
75. *Loi sur l'accès aux documents des organismes publics et sur la protection des renseignements personnels* (RLRQ, chapitre A-2.1).
76. LABRECQUE, Michel, et autres. « Re: How Little is Enough? The Evidence for Post-Vasectomy Testing », *The Journal of Urology*, 2006, Vol. 175, No 2, p. 791-792.
77. SOKAL, David, C., et LABRECQUE, Michel. « Effectiveness of Vasectomy Techniques », *Urol Clin N Am*, 2009, Vol. 36, p. 317-329.

COMMENTAIRES

Compte tenu de l'évolution technologique, ce guide fera l'objet de révisions périodiques. Nous vous invitons à nous faire part de toute suggestion susceptible d'améliorer le contenu.

DOCUMENT : *Guide sur l'examen et la préparation de sperme, 2016*

COMMENTAIRES :

SIGNATURE : _____ DATE : _____

NOM : _____