

PROCÉDURE DE PRÉPARATION DES SPERMOGRAMMES D'INFERTILITÉ

1. OBJECTIFS

- Effectuer une analyse macroscopique de l'éjaculat, ainsi qu'une analyse microscopique afin de déterminer la concentration en spermatozoïdes, leur vitalité, leur mobilité et leur morphologie;
- Émettre un diagnostic fonctionnel quant à la cause possible d'infertilité permettant d'orienter vers une anomalie quantitative ou qualitative des spermatozoïdes.

2. CONTEXTE/DOMAINE D'APPLICATION

À la demande du médecin prescripteur, habituellement dans les cas où le couple essaie sans succès d'avoir des enfants et ce, depuis plus de 12 mois.

3. DÉFINITIONS/ABRÉVIATIONS

Abstinence :	Absence d'éjaculation soit lors d'une relation sexuelle, soit lors de masturbation
Spermogramme :	Dans le présent document, le terme spermogramme réfère à tout spermogramme effectué afin de déterminer la fertilité (contrairement à un spermogramme post-vasectomie permettant de déterminer la présence ou l'absence de spermatozoïdes)
Spécimen :	Dans le présent document, le terme spécimen réfère à l'éjaculat
Liquide de dilution :	Utilisé ici comme synonyme de liquide d'immobilisation des spermatozoïdes
RAMQ :	Régie de l'Assurance Maladie du Québec
MI :	Millilitre ou $1 \times 10^{-3} \text{L}$
μl :	Microlitre ou $1 \times 10^{-6} \text{L}$
Feuille de travail :	Il s'agit du formulaire de la feuille de travail des spermogrammes d'infertilité sur laquelle les cytologistes consignent toutes les informations nécessaires pour l'interprétation du spermogramme d'infertilité
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé

4. ÉNONCÉ/SYSTÈME DE FONCTIONNEMENT

4.1 Généralité

- L'analyse des spécimens de spermogramme est effectuée une fois par semaine, selon un horaire préétabli par le département de cytologie;
- Les clients doivent prendre un rendez-vous au centre de prise de rendez-vous de l'hôpital;
- La veille de leur rendez-vous, le centre de prise de rendez-vous doit fournir au secrétariat du laboratoire médical la requête (bleue) de chacun des patients cédulés pour le lendemain;
- On demande au client 3 jours d'abstinence afin de maximiser les résultats;
- Le client doit apporter son spécimen dans un délai d'une heure suivant l'éjaculation et le maintenir à la température du corps pendant le transport;
- Le (pot contenant le) spécimen doit comporter une double identification, soit le nom, prénom et numéro de dossier de l'hôpital ou de RAMQ du patient;
- Lors de la réception du spécimen au laboratoire médical, la secrétaire recevant le spécimen doit apposer une étiquette sur la requête et compléter les informations suivantes :
 - 1) Date de réception du spécimen;
 - 2) Heure de l'éjaculation;
 - 3) Date de la dernière éjaculation;

- 4) Nom et prénom du patient;
 - 5) Numéro de dossier de l'hôpital ou de RAMQ du patient;
 - 6) Nom et prénom de la conjointe;
 - 7) Numéro de dossier de l'hôpital ou de RAMQ de la conjointe;
 - 8) Numéro de téléphone du patient.
 - 9) Nom du médecin requérant.
- La cytologiste désignée doit récupérer les spécimens à la réception du secrétariat médical avant de se rendre au laboratoire afin d'effectuer les analyses.

4.2 Principe

- La cytologiste doit d'abord évaluer macroscopiquement le volume, la couleur, la viscosité et le pH du spécimen (frais). Elle doit également noter toute autre information pertinente observée;
- La cytologiste doit ensuite procéder à un étalement frais du spécimen afin d'évaluer le pourcentage (%) de vitalité, la mobilité des spermatozoïdes, la quantité de façon qualitative, ainsi que la présence d'autres éléments cellulaires;
- La cytologiste effectue une dilution lui permettant de faire le décompte des spermatozoïdes, ainsi que l'évaluation du pourcentage (%) de spermatozoïdes présentant une morphologie normale;
- La cytologiste doit finalement émettre un diagnostic fonctionnel selon l'ensemble des résultats obtenus.

4.3 Type de spécimen

L'analyse relative au spermogramme est effectuée à partir du sperme obtenu suite à une éjaculation complète.

4.4 Type de récipient

Le spécimen doit parvenir au laboratoire dans un contenant (pot) stérile. Le patient peut se procurer un tel contenant au centre de prélèvement ou à la pharmacie.

4.5 Précautions de sécurité

- Appliquer les mesures de protection universelle (port du sarrau, des gants en nitrile et des lunettes de sécurité);
- Une fois les analyses terminées, désinfecter la surface de travail avec une solution aqueuse d'eau de javel à 10% et désinfecter le microscope à l'aide d'une lingette désinfectante prévue à cet effet.

4.6 Matériel et réactifs nécessaires

- Spécimens et requêtes;
- Pipette semi-automatique de 10 µl et embouts;
- Pipette semi-automatique de 100 µl et embouts;
- Cylindres gradués 10 ml (un par spécimen);
- Liquide de dilution pour spermogramme;
- Pipettes pasteur en plastique;
- Hématimètres de Neubauer et lamelles pour hématimètre;
- Boîtes de pétri (quelques-unes);
- Papier imbibé d'eau (un par boîte de pétri);
- Petites cupules (provenant du département de biochimie) (une par spécimen, plus une pour le liquide de dilution)

- Séchoir à lames réglé à 37°C;
- Lames de verre à bout dépoli;
- Lamelles no. 2;
- Microscope;
- Compteur de cellules;
- Feuilles de travail (une par spécimen).

4.7 Étapes techniques

4.7.1 Réception des spécimens

La cytologiste doit récupérer les spécimens, accompagnés de leur requête respective, à la réception du secrétariat du laboratoire médical et les apporter au laboratoire de cytologie.

4.7.2 Remplir le formulaire de la feuille de travail des spermogrammes d'infertilité

- a) Pour chacun des spécimens, prendre une feuille de travail des spermogrammes d'infertilité;
- b) Pour chacun des spécimens, retranscrire toutes les informations suivantes sur la feuille de travail:
 - ◆ Date de réception du spécimen;
 - ◆ Heure de l'éjaculation;
 - ◆ Date de la dernière éjaculation;
 - ◆ Nom et prénom du patient;
 - ◆ Numéro de dossier de l'hôpital ou de RAMQ du patient;
 - ◆ Nom de la conjointe du patient;
 - ◆ Numéro de dossier de l'hôpital ou de RAMQ de la conjointe;
 - ◆ Numéro de téléphone du patient;
 - ◆ Nom du médecin requérant.
- c) Selon l'ordre d'arrivée des spermogrammes, la cytologiste numérote les contenants (pots) et les requêtes, en commençant toujours par « 1 »;
- d) Procéder ensuite à l'examen macroscopique.

4.7.3 Examen macroscopique à l'état frais (pour chacun des spécimens)

- a) Mesurer **le volume** de spécimen frais reçu à l'aide d'un cylindre gradué de 10ml. Le volume normal de l'éjaculat pour 3 jours d'abstinence se situe entre 1,5ml et 6ml;
- b) Évaluer **la couleur** du spécimen. Un spécimen normal doit être blanc laiteux, légèrement opalescent et visqueux. Notez que l'opalescence est proportionnelle à la concentration en spermatozoïdes;
- c) Évaluer **la viscosité** du spécimen de la façon suivante :
 1. À l'aide d'une pipette Pasteur, bien mélanger le sperme;
 2. Aspirer doucement environ 5ml;
 3. Évaluer la viscosité du sperme en le laissant s'écouler par simple gravité :
 - ◆ Viscosité normale (N): Le spécimen s'écoule sous forme de gouttes bien séparées;
 - ◆ Viscosité augmentée (↑): Le spécimen s'écoule en formant des filaments de plus de 2 cm de long ou sous forme d'un filet continu;
 - ◆ Viscosité très augmentée (↑↑): Le spécimen est tellement visqueux qu'il ne peut s'écouler de la pipette;
 - ◆ Viscosité diminuée (↓): Le spécimen est tellement liquide qu'il s'écoule rapidement sans former de gouttes visibles.

- d) Mesurer le **pH** du spécimen à l'aide d'un papier-bandelette à usage unique conçu à cet effet.
1. Deux façons de procéder sont possibles (selon notamment la quantité de spécimen reçu) :
 - ♦ Soit en déposant une goutte de spécimen sur le carré indicateur de la bandelette à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique (si suffisamment de spécimen est reçu);
 - ♦ Soit en mettant le carré indicateur de la bandelette directement en contact avec le spécimen (dans le contenant de réception ou le cylindre gradué).
 2. Noter le pH obtenu après 60 secondes (1 minute) en comparant la couleur obtenue avec la légende du fabricant ou selon les recommandations du fabricant. Un pH normal se situe entre 7,2 et 8,0.
 - Un pH anormal témoigne indirectement d'une anomalie des sécrétions des glandes annexes (sécrétions prostatiques acides et sécrétions des vésicules séminales basiques).
- e) Noter toute **observation particulière** jugée pertinente telle que :
- ♦ La présence d'agglutinats;
 - ♦ Sang visible macroscopiquement;
 - ♦ Informations relatives à la préparation du spécimen;
 - ♦ Etc.

4.7.4 Examen microscopique à l'état frais (pour chacun des spécimens)

À l'aide d'une pipette Pasteur, déposer une goutte de spécimen frais sur une lame numérotée ou identifiée au nom du patient, puis la recouvrir d'une lamelle. Toutes les observations sont effectuées à 10X.

4.7.4.1 La vitalité ou le pourcentage des spermatozoïdes vivants (en %)

- a) Faire une lecture précisément une (1) heure et deux (2) heures suivant l'éjaculation;
 - Une valeur « une (1) heure » obtenue jusqu'à 75 minutes (maximum) après l'éjaculation demeure acceptable. Le cas échéant, procéder uniquement à la lecture deux (2) heures.
- b) En observant entre 4 et 5 champs microscopiques, approximer en % le nombre de spermatozoïdes mobiles par rapport à l'ensemble des spermatozoïdes (mobiles + immobiles);
- c) Inscrire le résultat **en %** sur la feuille de travail.
 - Pour que la vitalité d'un spécimen soit considérée « normale », on doit observer plus de 50% de spermatozoïdes mobiles une (1) heure après l'éjaculation ou plus de 40% de spermatozoïdes mobiles deux (2) heures après l'éjaculation.

4.7.4.2 La mobilité

- a) Faire une lecture précisément une (1) heure et deux (2) heures suivant l'éjaculation;
 - Une valeur « une (1) heure » obtenue jusqu'à 75 minutes (maximum) après l'éjaculation demeure acceptable. Le cas échéant, procéder uniquement à la lecture deux (2) heures;
- a) Évaluer la mobilité des spermatozoïdes en observant la vitesse et la direction empruntée comme suit :
 - ♦ Excellente : Mobilité rapide (vitesse > 25µm/s) et les spermatozoïdes se déplacent en ligne droite à travers le champ du microscope;

- ♦ Bonne : Mobilité lente (vitesse de 5 à 25µm/s) et/ou les spermatozoïdes bougent en zigzagant;
- ♦ Faible : Mobilité sur place – les spermatozoïdes bougent, mais n'avancent pas (seules les flagelles bougent);
- ♦ Nulle : Immobilité – tous les spermatozoïdes sont complètement immobiles (ce qui est extrêmement rare).

b) Incrire le résultat relatif à la mobilité sur la feuille de travail.

- Une mobilité normale correspond à 50% ou plus de spermatozoïdes avec une excellente ou une bonne mobilité OU à 25% ou plus de spermatozoïdes avec une excellente mobilité.

4.7.4.3 Évaluation qualitative de la quantité

Procéder à une évaluation qualitative de la quantité observée par champ, tel que :

- ♦ ∅ : Absence de spermatozoïdes;
- ♦ – : Quelques spermatozoïdes sont présents;
- ♦ 1+ à 2+ : Une quantité appréciable de spermatozoïdes sont présents;
- ♦ 3+ : Les spermatozoïdes forment un tapis presque continu;
- ♦ 4+ : Les spermatozoïdes forment un tapis multicouches.

4.7.4.4 Les éléments cellulaires

Pour chacun des types de cellules énumérés ci-dessous, indiquer leur présence :

- ♦ De la spermatogenèse : Cellules mononuclées;
- ♦ Inflammatoires : Leucocytes polynucléaires (noyaux lobés);
- ♦ Sang : Érythrocytes (disques anucléés);
- ♦ Autres : Tout autre élément tel que cristaux, corpuscules de lécithine, corps amylicés, champignons, etc.

4.7.5 Examen microscopique à l'hématimètre (pour chacun des spécimens)

4.7.5.1 Préparation du liquide de dilution ou d'immobilisation des spermatozoïdes

- a) Dissoudre **5 grammes de bicarbonate de sodium** dans **100ml d'eau distillée** en mélangeant jusqu'à l'obtention d'une solution homogène;
- b) Ajouter **1ml de formol tamponné à 10%** à la solution obtenue.

4.7.5.2 Dilution

- a) Si le spécimen est trop visqueux, le mettre environ 30 minutes dans le séchoir à lames préalablement réglé à 37°C afin de le liquéfier;
 - Il est important que la température du séchoir soit à 37°C au moment de la mise en place du spécimen, car une température trop basse ou trop élevée résulterait en la mort des spermatozoïdes.
- b) Sortir le spécimen du séchoir, puis l'homogénéiser à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique;
- c) Prendre une petite cupule (provenant du département de biochimie) et y inscrire le numéro préalablement attribué correspondant au spécimen;
- d) Remplir une cupule de liquide de dilution qui servira pour les étapes de dilution qui suivent;
- e) À l'aide de la pipette semi-automatique de 100µl, déposer un volume total de 190µl de liquide de dilution dans chacune des cupules correspondantes aux spécimens
 - Il faudra évidemment procéder en deux étapes : d'abord déposer un volume de 100µl dans chacune des cupules, puis y ajouter un volume de 90µl.

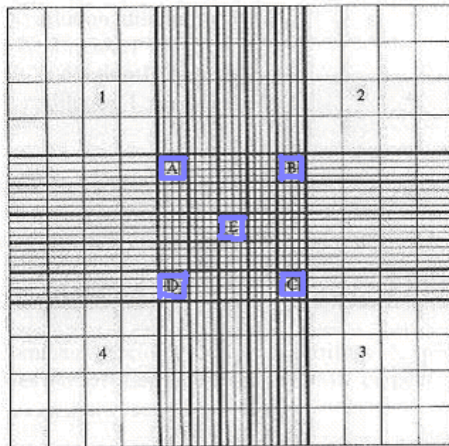
- f) À l'aide de la pipette semi-automatique de 10 μ l, ajouter à chacune des cupules un volume de 10 μ l du spécimen correspondant;
- o Note : Bien que la pipette de 100 μ l puisse également mesurer un volume de 10 μ l, il est déconseillé de le faire à cause de l'erreur de mesure qui y est associée (à cause de la petitesse du volume).
- g) À l'aide de l'embout de pipette utilisé, mélanger le contenu de chacune des cupules en aspirant et en expulsant le liquide à quelques reprises;
- o **Attention d'utiliser des embouts différents pour chacune des cupules !**
- h) Chacune des cupules contient à présent un spécimen dilué 1/20 (10 μ l de spécimen + 190 μ l de liquide de dilution).

4.7.5.3 Hématimètre de Neubauer

- a) Pour chacun des spécimens, remplir les 2 côtés de l'hématimètre à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique;
- b) Déposer délicatement les hématimètres dans des boîtes de Pétri contenant un papier imbibé d'eau, recouvrir du couvercle et attendre 10 minutes afin de permettre la sédimentation des éléments cellulaires.
- o Les hématimètres doivent reposer dans un milieu humide afin de prévenir le dessèchement du spécimen.

4.7.5.4 Calcul du nombre total de spermatozoïdes (**exprimé en millions/ml**)

- a) À l'aide du microscope, faire d'abord la mise au point à 3,2X, puis procéder au décompte à 40X des spermatozoïdes dans les carrés de chacun des quatre (4) coins, ainsi que dans celui du centre, tel qu'illustré sur **l'image ci-dessous** à l'aide des carrés bleus. Effectuer le décompte pour chacune des 2 chambres.



Hématimètre de Neubauer

- b) Inscrire les résultats obtenus sur la ligne correspondant au « Nombre total de spermatozoïdes », puis calculer la moyenne (pour le résultat informatisé). Cette valeur représente le nombre de millions de spermatozoïdes retrouvés par millilitre (ml)*. Selon les normes de l'OMS de mai 2010 (les dernières en vigueur), une numération normale de spermatozoïdes est supérieure à 15 millions/ml.

- Si moins de 15 millions de spermatozoïdes/ml sont comptés à l'intérieur des 5 carrés, alors dénombrer les spermatozoïdes à l'intérieur des 25 carrés et diviser (÷) le nombre obtenu par 5 pour obtenir le « Nombre total de spermatozoïdes ».

4.7.5.5 Calcul des spermatozoïdes de formes normales (**en %**)

Toujours à l'aide du microscope, ainsi que d'un compteur de cellules, procéder au recensement des spermatozoïdes normaux et anormaux (pour chacune des 2 chambres). Pour ce faire, il faut :

- a) Classifier chaque spermatozoïde rencontré comme étant de « formes normales » ou de « formes anormales* » en appuyant sur le bouton correspondant** sur le compteur de cellules;
 - *Dès qu'une (1) anomalie est recensée, le spermatozoïde est considéré de « forme anormale ».
 - **Déterminer préalablement, par exemple, que le 1^{er} bouton rouge représente les spermatozoïdes de formes normales et que le 1^{er} bouton blanc représente ceux de formes anormales.
- b) Lorsqu'un dénombrement total de 100 spermatozoïdes sera atteint***, la cloche du compteur de cellules émettra un tintement;
 - ***Si moins de 100 spermatozoïdes sont présents dans l'échantillon observé, effectuer le calcul suivant afin d'obtenir le résultat en pourcentage (%) :

$$\frac{\text{Nombre de spermatozoïdes de formes normales} \times 100}{\text{Nombre total de spermatozoïdes observés}} = \text{Le pourcentage (\%)} \text{ de formes normales}$$
- c) Inscrire les résultats obtenus pour le nombre de formes normales observées sur la ligne « Morphologie normale », puis calculer la moyenne (pour le résultat informatisé). Le résultat ainsi obtenu représente le pourcentage (%) de spermatozoïdes de formes normales par 100 spermatozoïdes observés.
 - Un pourcentage normal générant un bon pronostic est de $\geq 15\%$;
 - Un pourcentage se situant entre 4% et 14% représente une plage sous-optimale dont le pronostic est de faible à bon (diminuant les chances de fertilisation).

4.7.6 Diagnostic fonctionnel (pour chacun des spécimens)

Suite à l'obtention de l'ensemble des paramètres énoncés précédemment (nombre, mobilité, morphologie), émettre un diagnostic fonctionnel des spermatozoïdes présents dans le spécimen observé. Pour ce faire, sélectionner parmi les diagnostics fonctionnels suivants :

- ♦ Normozoospermie : Spécimen dont les paramètres entrent dans les normes des valeurs de référence de l'OMS;

ANOMALIE DU VOLUME

- ♦ Hypospermie : Volume de l'éjaculat inférieur à 1,5 ml;
- ♦ Hyperspermie : Volume de l'éjaculat supérieur à 6 ml;

ANOMALIE DU NOMBRE

- ♦ Azoospermie : Absence de spermatozoïdes dans le spécimen;
- ♦ Oligospermie (ou oligozoospermie) : Anomalie du nombre de spermatozoïdes correspondant à une numération de spermatozoïdes inférieure à 15 millions par ml;
- ♦ Polyzoospermie : Anomalie du nombre de spermatozoïdes correspondant à une numération supérieure à 250 millions par ml;

ANOMALIE DE LA VITALITÉ

- ♦ Asthénozoospermie : Anomalie de la vitalité des spermatozoïdes. On parle d'asthénozoospermie lorsque l'on observe moins de 50% de spermatozoïdes mobiles une (1) heure après l'éjaculation ou moins de 40% deux (2) heures après l'éjaculation;

ANOMALIE DE LA MORPHOLOGIE

- ♦ Tératozoospermie : Anomalie de la morphologie des spermatozoïdes. On parle de tératozoospermie lorsque l'on observe moins de 15% de spermatozoïdes de morphologie normale (ou plus de 85% de spermatozoïdes anormaux);
- ♦ OAT (oligoasthénotératospermie) : Il s'agit de l'association de 3 pathologies spermatiques soit : l'oligozoospermie, l'asthénozoospermie et la tératozoospermie.

4.7.8 Nettoyage du matériel de laboratoire et de l'espace de travail

4.7.8.1 Nettoyage de la surface de travail

- a) Jeter le matériel souillé à usage unique dans les poubelles jaunes prévues à cet effet;
- b) Apporter les cylindres gradués souillés à la salle de lavage pour les faire nettoyer;
- c) Nettoyer les surfaces de travail avec une solution aqueuse d'eau de javel 10%;
- d) Nettoyer le microscope à l'aide d'une lingette désinfectante prévue à cet effet.

4.7.8.2 Nettoyage des hématimètres de Neubauer et des lamelles

- a) Dans le contenant prévu à cet effet, procéder à un mélange d'environ 10 ml d'Extran pour $\frac{3}{4}$ du contenant d'eau du robinet;
- b) Déposer délicatement les hématimètres à plat dans le contenant ainsi préparé, ainsi que les lamelles;
- c) Laisser tremper environ 24 heures;
- d) Rincer délicatement à l'aide du flacon d'eau distillée les hématimètres et les lamelles, en procédant une à la fois;
- e) Essuyer délicatement – sans frotter – chacun des hématimètres et des lamelles à l'aide d'un papier blanc prévu à cet effet;
- f) Laisser finir de sécher à l'air libre les hématimètres et les lamelles en les déposant délicatement à plat sur un papier brun à mains pendant une dizaine de minutes;
- g) Ranger ensuite à l'abri de la poussière.

5. RÉFÉRENCES

ABBARA, Dr Aly. « Sperme et spermocytogramme ».

[En ligne]. http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/sperme.html (page consultée le 28 avril 2014)

CENTRE SUISSE DE CONTRÔLE DE QUALITÉ, « Fiche technique - Numération cellulaire sur l'hématimètre de Neubauer ».

[En ligne]. http://www.cscq.ch/SiteCSCQ/FichierPDF_FR/neubauer.pdf (page consultée le 5 mai 2014)

CLAVERT, André. « Spermiologie ».

[En ligne]. <http://spermiologie.u-strasbg.fr/spermiologie/> (page consultée le 29 avril 2014)

COOPER, Trevor G. et al. «World Health Organization reference values for human semen characteristics », *Human Reproductive Update*, Volume 16, numéro 3, 2010, p.231-245.

DUSSAULT, Johanne. « Le spermogramme ». *Sommaire Scientifique* (OPTMQ, Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec), Volume 16, numéro 2, février 2009.

ISO, ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION, Normes 15189 ; Laboratoires d'analyses de biologie médicale-Exigences particulières concernant la qualité et la compétence, 1^{ère} édition révisée 2003-07-15; Suisse; Norme 5.05.03.

REPRODUCTIVE CARE CENTER, The Regions Leader. « Fertility Tests ».

[En ligne]. <http://fertilitydr.com/male-infertility-semen-analysis-kruger.html> (page consultée le 5 mai 2014)