



LA RÉVISION DES VALEURS DE RÉFÉRENCE POUR LES SPERMOGRAMMES POST- VASECTOMIE PAR CYTOMÉTRIE, PERMET D'ÉVITER L'ANALYSE DE MOTILITÉ.

Dre Lyne Massicotte, Biochimiste clinique PhD, CSPQ
Docteur Mathieu Boilard, Biologiste PhD

Nasci Biologie Médicale Inc. 794, rue Fréchette Suite 101,
Longueuil, Québec, J4J 5C9

Résumé

Objectif: Après une période d'utilisation du spermogramme haute sensibilité développé chez Nasci, la révision des valeurs de référence était incontournable.

Méthode: Les concentrations de spermatozoïdes (SPZ) ont été évaluées en parallèle par microscopie et par cytométrie en flux. Pour la cytométrie, 100 µl de sperme a été marqué au Hoechst et au DiOC6. Les SPZ ont été identifiés grâce à leur taille, leur réfringence et la quantité d'ADN. Les SPZ positifs au DiOC6 ont été considérés comme vivants et la concentration des SPZ vivants ([vivants]) a été déterminée. Les données ont été analysées à l'aide de StatisPro-CLSI.

Résultats : Après retrait des données aberrantes, 97.5% des concentrations de SPZ mesurées par cytométrie sont inférieures à 8480 SPZ/ml et 97,5% des concentrations de SPZ vivants sont inférieures à 1600 SPZ/ml. Aussi, 99% des échantillons de moins de 5000 SPZ/ml ont moins de 1600 SPZ vivants/ml.

Discussion : Aucune grossesse n'a encore été observée sous ces seuils.

Conclusion : Grâce à la haute sensibilité du spermogramme post-vasectomie, cette étude a permis de déterminer que la mesure précise de la concentration des spz permet d'éviter l'analyse de la motilité. En excluant la motilité de l'analyse, le délai entre le prélèvement et l'analyse peut excéder largement les 2h prescrits.

Introduction

- La vasectomie est une méthode de contraception masculine permanente.
- Vérification de la vasectomie: Spermogramme.
 - ▣ La partie du tractus en aval de la chirurgie peut contenir des spermatozoïdes quelques mois après l'intervention.
 - ▣ Attendre au moins 3 mois + environ 40 éjaculations pour les drainer.
- Présentement les valeurs de référence sont:
 - ▣ EAU: <10 000 spz/ml
 - ▣ AUA: <100 000 spz/ml
- OMS stipule qu'il est impossible d'avoir un CV inférieur à 20% à des concentrations inférieures à 56 000 spz/ml en utilisant un microscope à contraste et une chambre Neubauer.

Objectifs

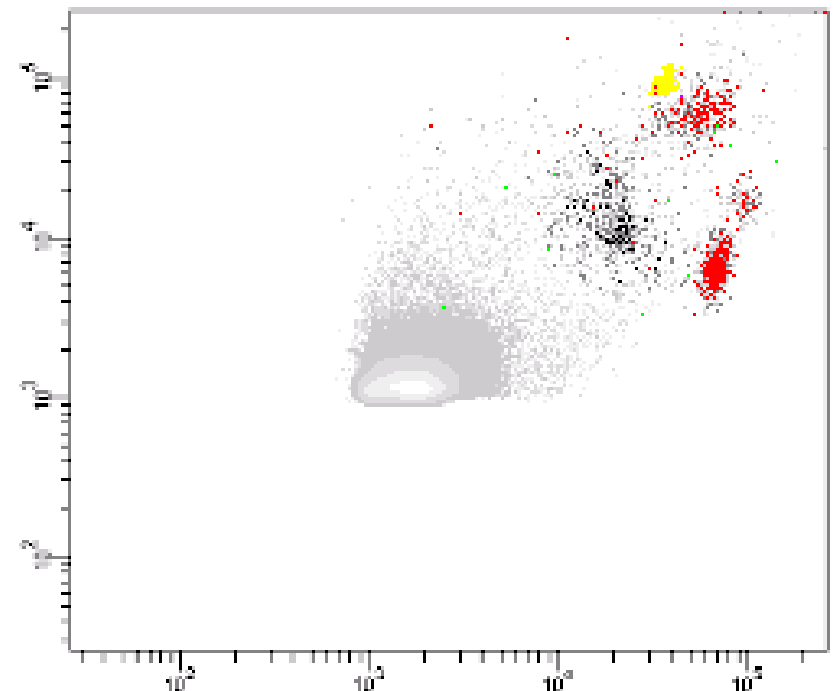
- ❑ Établir les vrais valeurs de référence du spermogramme post-vasectomie, grâce à une nouvelle méthode analytique objective, sensible, précise et exacte.
- ❑ Établir un seuil de concentration permettant de faire abstraction de la viabilité/motilité dans le but d'étendre le délai avant analyse.



Matériel et Méthode

- Spermogramme post-vasectomie par cytométrie de Nasci
 - ▣ Analyse de spécimen : 100µl
 - ▣ Analyse multiparamétrique (Fig.1)
 - Marqueur spermatozoïdes (Fig.2)
 - Quantité d'ADN: hoechst, taille et réfringence
 - Marqueur de viabilité (Fig.3)
 - Potentiel transmembranaire des mitochondrie: DiOC6
 - Marqueur leucocytes
 - Anti-CD45-PerCP
 - Standard interne
 - Billes arc-en-ciel

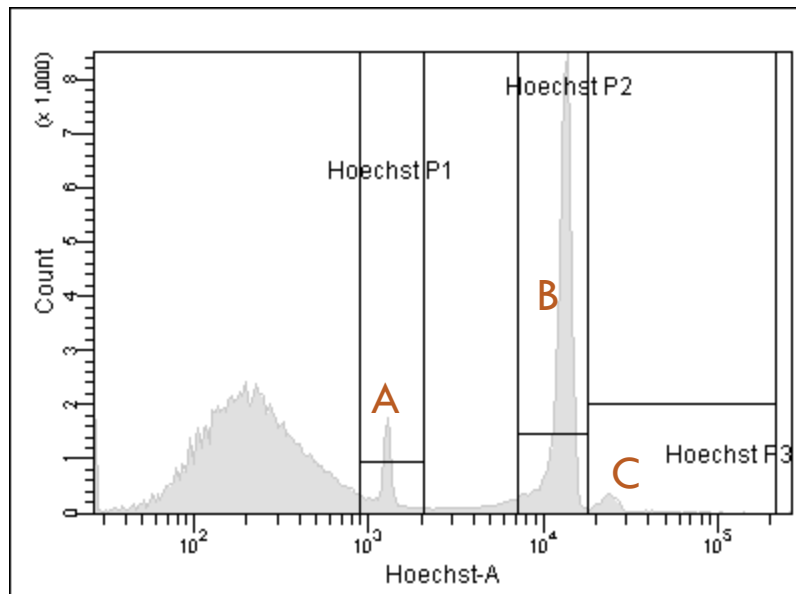
Figure 1: Side scatter versus Forward scatters.



Légende: ● Débris, ● Spermatozoïdes, ● Leucocytes, ● Standard interne

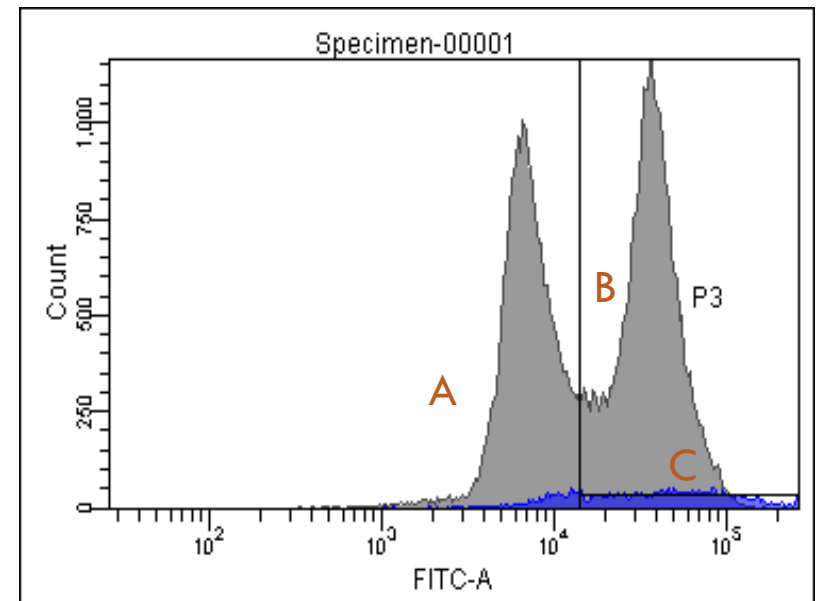
L'analyses par cytométrie Nasci

Figure 2: Marquage au Hoechst des cellules



Légende: A: Standard interne, B: Spermatozoïdes, C: Leucocytes

Figure 3: Marquage au DiOC6 pour la viabilité



Légende: A: Spermatozoïdes morts, B: Spermatozoïdes vivants, C: Leucocytes vivants (bleu)

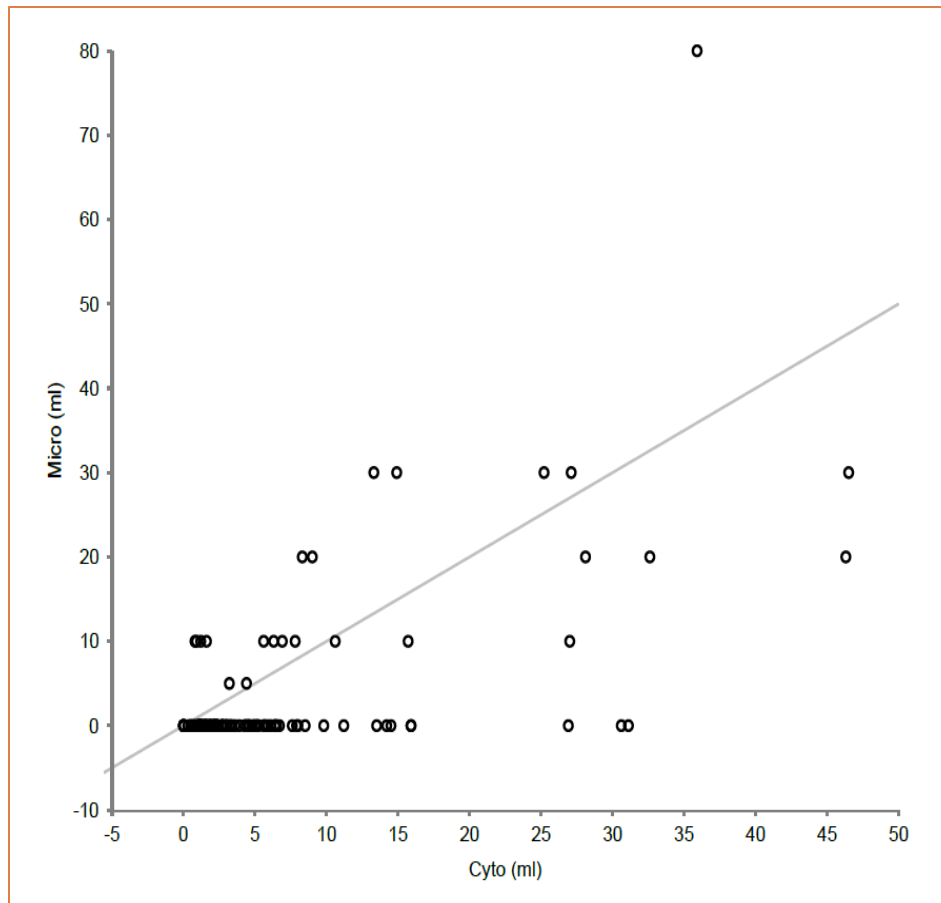
Méthode par microscopie Nasci

- Analyse d'un volume de 0,1 μ l (20 champs / chambre 20 μ m)
- Contraste de phase / « negative field » / assistée par caméra et écran LCD
- Observation de 1 spermatozoïde équivaut à 10 000 spz/ml
- Valeurs de référence rapportée par la littérature
 - EAU: <10 000 spz/ml
 - AUA: <100 000 spz/ml



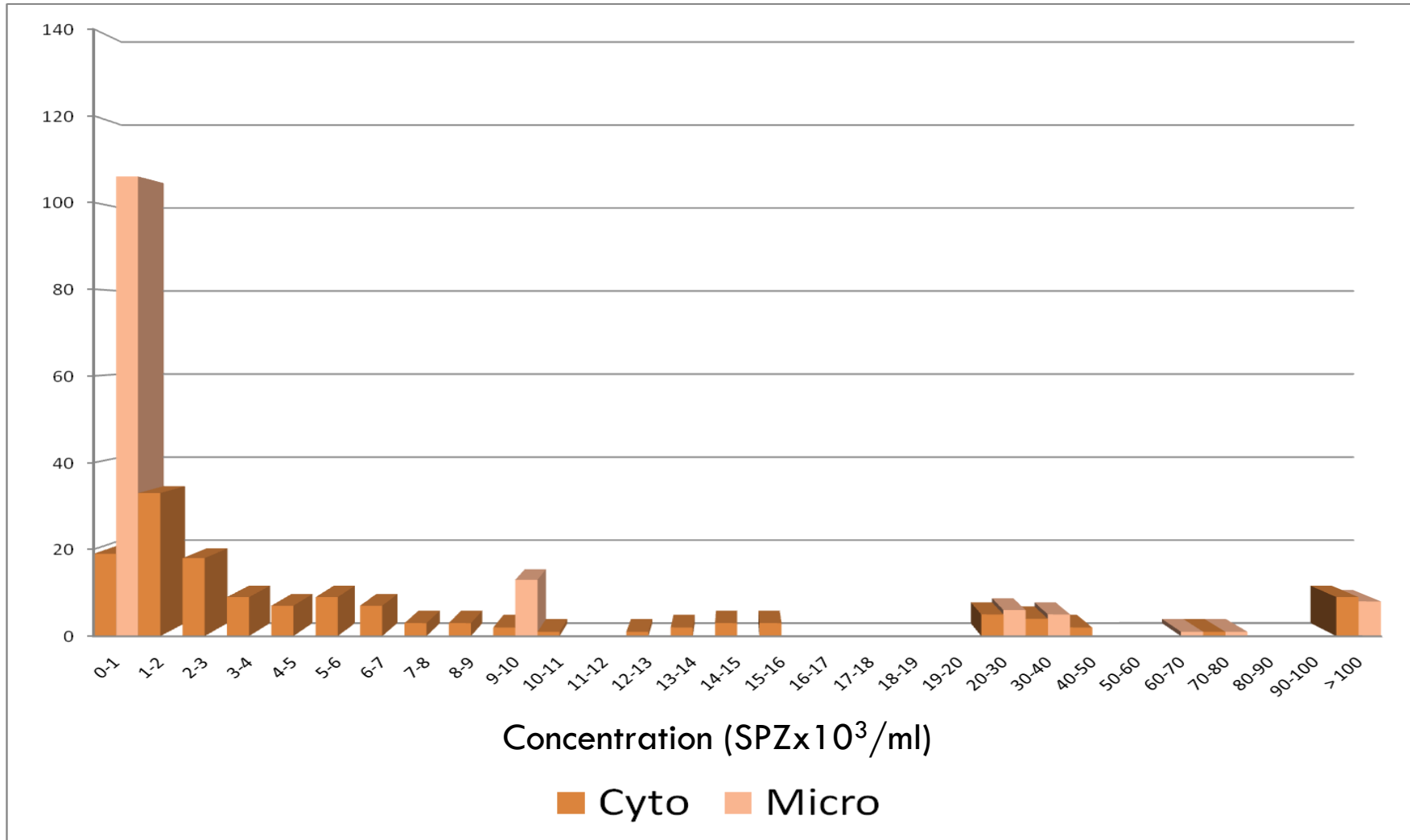
Où est Charlie?

Corrélation Micro vs Cyto

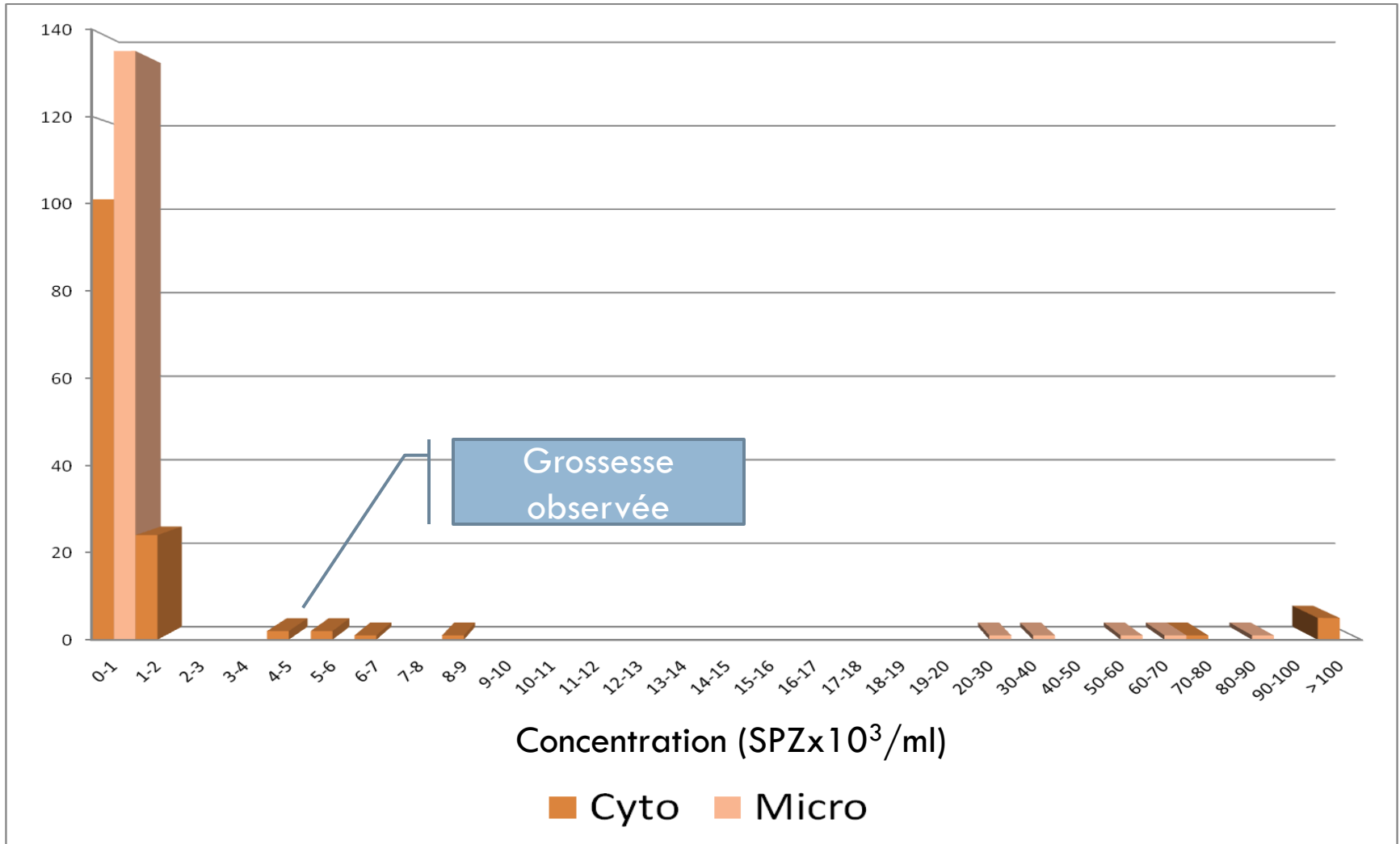


- $N = 131$
- Il y a 86 résultats plus petits que 5000spz/ml.
- Il reste 45 résultats au-dessus de ce seuil.
- De ces 45 résultats, à 26 reprises le microscope a donné 0.
- Dans 57% des cas le microscope ne détecte pas la présence de spermatozoïdes.

Distribution de la concentration

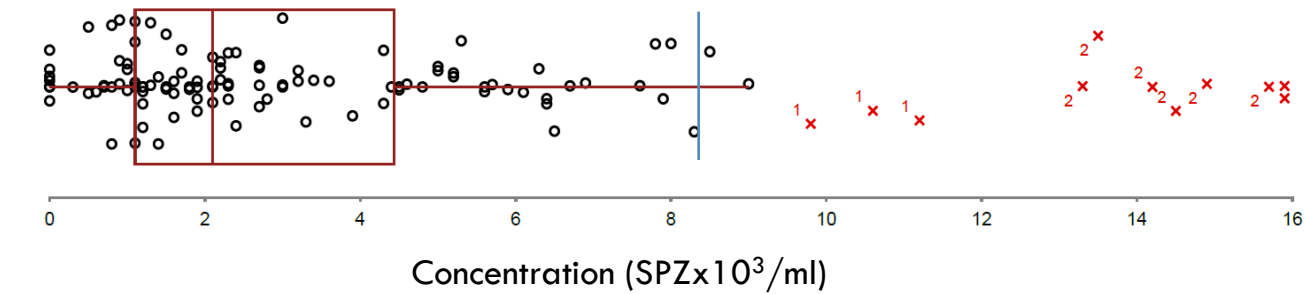


Distribution de la [vivants]

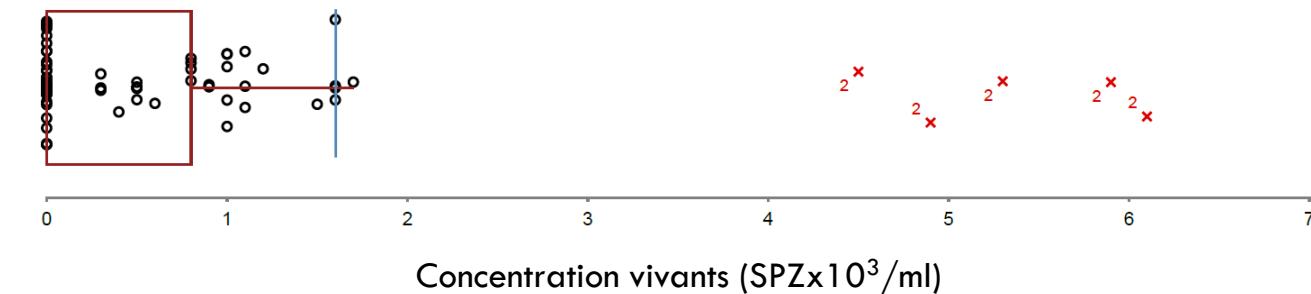


Valeurs de référence

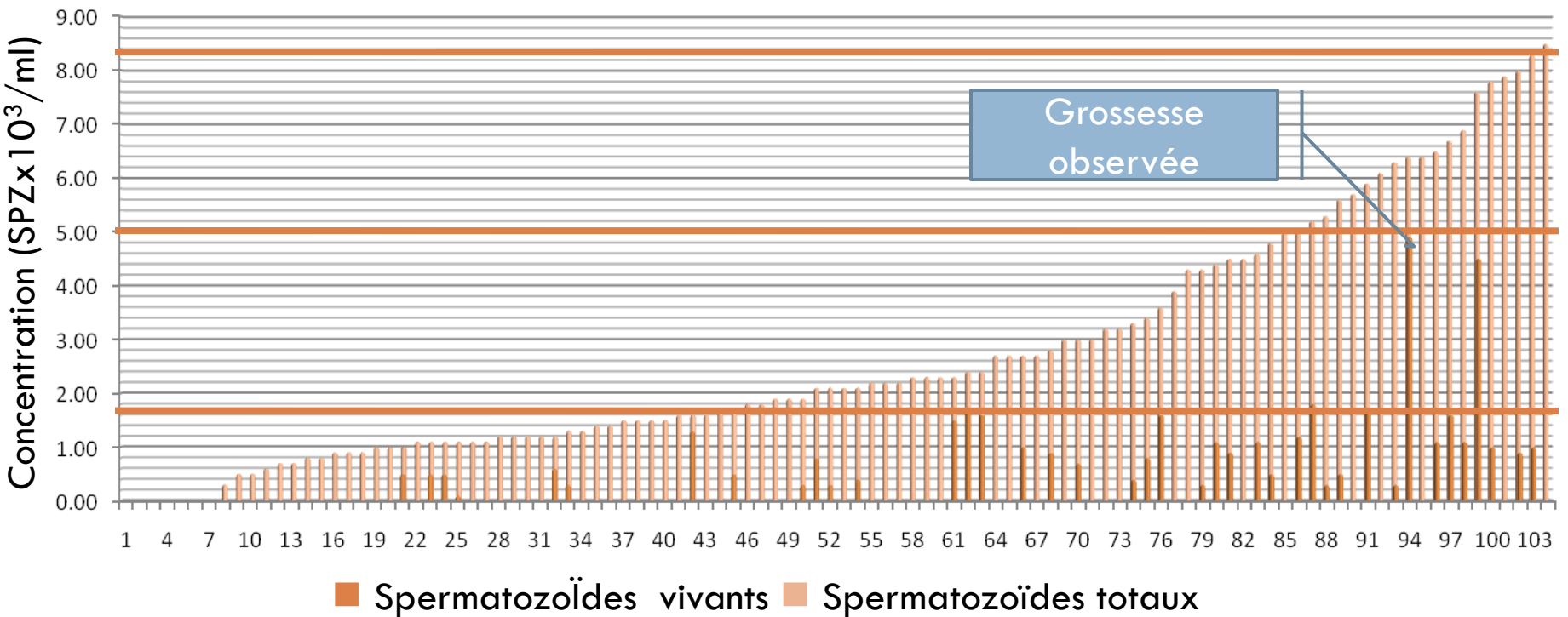
- Concentration Totale de spermatozoïdes



- Concentration de spermatozoïdes vivants



Établir un seuil sans la [vivants]



Discussion

- Le cytomètre nous permet de détecter des SPZ vivants longtemps après la vasectomie, ce qui est surprenant parce que:
 1. les SPZ ne sont pas connus pour survivre hors de l'épididyme
 2. la vasectomie ne devrait pas permettre à des SPZ fraîchement produits de se faufiler vers le canal déférent.
- La lumière du canal déférent est 1 000 fois plus grande qu'un SPZ (une fourmi dans un tuyau de 3 mètres). La moindre ouverture pourrait permettre le passage de quelques SPZ tel qu'ils le font dans les voies génitales féminines.
- Les médecins utilisent différentes techniques pour vasectomiser. Un suivi des statistiques par médecin devrait nous permettre de conclure si les spermatozoïdes survivent en aval ou s'ils trouvent leur chemin.

Conclusion

- En suivant les recommandations du CLSI pour établir un seuil unilatéral de décision, le seuil est établi à 1 600 SPZ vivants / ml.
- À l'aide du seuil de 1 600 SPZ vivants/ml, une correction peut être apportée au seuil de la concentration totale, c'est à dire, descendre le seuil de 8350 SPZ/ml au seuil sécuritaire de 5000 SPZ total / ml et d'éliminer ainsi la nécessité de mesurer la viabilité/motilité.
- La fenêtre pré-analytique passe de 2h à 12h.
- Seuils valides seulement avec la méthode par cytométrie de Nasci.

Références

- Sharlip ID, et al.- Vasectomy: AUA Guideline - Journal of Urology. 2012 Oct 19
- Jungwirth, et al. - EAU Guidelines on male infertility 2012
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5e édition. 2010
- Boilard M et Massicotte L (WO2014059548) Methods and compositions for assessing spermatozoa in a semen sample.
- Lyne Massicotte, Nicolas Nélisse, Mathieu Boilard. Raising the bar for postvasectomy spermograms: A new high-sensitivity method by cytometry. Clinical Biochemistry 47(12): 1153.