

Première édition
2006-11-15

Version corrigée
2007-02-15

Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro — Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes —

Partie 1:

Méthode de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831d-d019547522>

Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices —

Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases



Numéro de référence
ISO 20776-1:2006(F)

© ISO 2006

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20776-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-d3f7dfb77942/iso-20776-1-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-d3f7dfb77942/iso-20776-1-2006>

© ISO 2006

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Modes opératoires	4
3.1 Généralités	4
3.2 Milieu	4
3.3 Agents antimicrobiens	4
3.4 Préparation de l'inoculum	10
3.5 Inoculation des plaques de microdilution	11
3.6 Incubation des plaques de microdilution	11
3.7 Résultats des lectures	11
3.8 Situations spécifiques pour lesquelles le résultat de la CMI peut donner des résultats peu fiables	11
4 Contrôle de qualité	13
Annexe A (normative) Exigences relatives au bouillon Mueller-Hinton	17
Bibliographie	19

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.itech.ai)

ISO 20776-1:2006
<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-d3f7dfb77942/iso-20776-1-2006>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 20776-1 a été élaborée par le comité technique CEN/TC 140, *Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 212, *Laboratoires d'analyses de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne)..

L'ISO 20776 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro — Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes*:

- *Partie 1: Méthode de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses*
- *Partie 2: Évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes*

La présente version corrigée de l'ISO 20776-1:2006 inclut les corrections suivantes:

- page de titre: le titre français a été modifié;
- p. iv, Avant-propos: les titres français des deux parties ont été modifiés;
- Le terme «réceptivité» a été remplacé dans tout le document par le terme «sensibilité» et divers autres changements de terminologie, d'ordre général, ont été effectués dans le document.

Introduction

Les essais de sensibilité in vitro sont conduits sur les micro-organismes suspectés de provoquer une maladie, en particulier si l'on pense que l'organisme appartient à une espèce qui peut montrer une résistance aux agents antimicrobiens fréquemment employés. Les essais sont également importants pour la surveillance de la résistance, pour les études épidémiologiques de la sensibilité et pour comparer les nouveaux agents antimicrobiens à ceux déjà existants.

Des méthodes de dilution sont employées pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des agents antimicrobiens et constituent la référence pour les essais de sensibilité antimicrobienne. Les méthodes de détermination des CMI sont employées dans la surveillance de la résistance, pour comparer l'activité des nouveaux agents antimicrobiens, pour établir la sensibilité des organismes qui donnent des résultats équivoques avec les méthodes de routine, dans le cadre d'essais réalisés sur des organismes pour lesquels les méthodes de routine peuvent ne pas être fiables et lorsqu'un résultat quantitatif est nécessaire à la décision clinique. Dans les essais de dilution, les micro-organismes sont soumis à essai afin de déterminer leur capacité à produire une croissance visible sur une série de boîtes de gélose (dilution en gélose) ou dans un bouillon (dilution en bouillon) contenant des dilutions en série de l'agent antimicrobien.

La concentration la plus faible d'un agent antimicrobien (en mg/l) qui, dans des conditions in vitro définies, inhibe l'apparition d'une croissance visible d'un micro-organisme au cours d'une période définie est connue sous le nom de CMI. Pour le clinicien, la CMI constitue un guide de la sensibilité de l'organisme à l'agent antimicrobien et facilite les décisions de traitement. Un strict contrôle de la méthode et une normalisation sont nécessaires à la reproductibilité intralaboratoires et interlaboratoires car les résultats peuvent être significativement influencés par la méthode utilisée. Il est généralement accepté que les essais de la CMI en bouillon sont reproductibles à plus ou moins une dilution (c'est-à-dire \pm une cupule ou un tube dans une série de raison 2).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-13f71875918/iso-20776-1-2006>

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-13f71875918/iso-20776-1-2006>

La **dilution en bouillon** est une technique dans laquelle des conteneurs comportant des volumes identiques de bouillon avec des solutions d'agent antibactérien à des concentrations augmentant de manière incrémentielle (généralement de manière géométrique) sontensemencés avec un nombre connu de micro-organismes.

La **microdilution en bouillon** indique une dilution en bouillon sur des plaques de microdilution.

La méthode décrite dans ce document est conçue pour soumettre à essai des cultures pures de bactéries aérobies qui sont facilement cultivables en bouillon Mueller-Hinton, possiblement enrichi en les incubant une nuit dans un bouillon gélosé. La méthode de microdilution en bouillon décrite dans ce document est essentiellement la même que celles utilisées dans de nombreux pays, y compris la France [1], l'Allemagne [2], la Suède [3], le Royaume-Uni [4], et les États-Unis [5]. La méthode est également essentiellement la même que la méthode de microdilution en bouillon publiée par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [6]. Toutes ces méthodes sont basées sur la méthode décrite par Ericsson et Sherris [7].

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20776-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-d3f7dfb77942/iso-20776-1-2006>

Systemes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro — Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes —

Partie 1:

Méthode de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses

AVERTISSEMENT L'utilisation de la présente partie de l'ISO 20776 peut impliquer des matériaux, des opérations et des équipement dangereux. La présente partie de l'ISO 20776 n'est pas destinée à traiter tous les problèmes de sécurité associés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de cette partie de l'ISO 20776 d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des limites réglementaires avant utilisation.

iTeh STANDARD PREVIEW

1 Domaine d'application (standards.iteh.ai)

La présente partie de l'ISO 20776 décrit une méthode de référence, la microdilution en bouillon, pour déterminer les CMI. La CMI reflète l'activité du médicament dans les conditions d'essai décrites, et peut être interprétée pour une recommandation clinique en tenant compte d'autres facteurs tels que la pharmacologie du médicament ou les mécanismes de résistance bactérienne. Cela permet de classer les bactéries comme étant «sensibles» (S), «intermédiaires» (I), ou «résistantes» (R). En outre, les distributions de CMI peuvent être utilisées pour définir les populations bactériennes de type sauvage ou non sauvage. Bien que l'interprétation clinique de la valeur de la CMI se trouve au-delà du domaine d'application de la présente partie de l'ISO 20776, des modifications de la méthode de base sont nécessaires pour certaines combinaisons agent antimicrobien-bactérie afin de faciliter l'interprétation clinique. Ces modifications sont incluses dans un tableau séparé. Il est recommandé de comparer les autres méthodes d'essai de sensibilité (par exemple les méthodes conduites en routine ou les essais de diagnostic) à cette méthode de référence à des fins de validation et pour garantir des résultats comparables et fiables.

2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

agent antimicrobien

substance d'origine biologique, semi-synthétique ou synthétique qui inhibe la croissance d'une bactérie ou l'élimine, et qui est par conséquent potentiellement utilisée dans le traitement des infections

NOTE Les désinfectants, les antiseptiques et les conservateurs ne sont pas inclus dans cette définition.

2.2 Agents antimicrobiens — propriétés

2.2.1

titre

fraction d'une substance d'essai ayant une action antimicrobienne, déterminée dans le cadre d'une analyse biologique par rapport à une poudre de référence de la même substance

NOTE Le titre est exprimé en fraction massique en milligrammes par gramme (mg/g) ou en activité en unités internationales (UI) par g ou en fraction volumique ou en fraction massique en pourcentage ou en concentration de quantité de substance (fraction massique) en mole par litre d'ingrédients dans la substance d'essai.

2.2.2

concentration

quantité d'un agent antimicrobien dans un volume défini de liquide

NOTE 1 La concentration est exprimée en mg/l.

NOTE 2 $\text{mg/l} \equiv \mu\text{g/ml}$ mais il n'est pas recommandé d'utiliser l'unité $\mu\text{g/ml}$.

2.3

solution mère

solution initiale utilisée pour des dilutions ultérieures

2.4

concentration minimale inhibitrice

CMI

concentration la plus faible qui, dans des conditions in vitro définies, empêche la croissance visible de bactéries pendant une période définie

NOTE La CMI est exprimée en mg/l.

[ISO 20776-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c-d3f7dfb77942/iso-20776-1-2006)

2.5

concentration critique

valeurs spécifiques de CMI sur la base desquelles une bactérie peut être affectée aux catégories cliniques «sensible», «intermédiaire» et «résistante»

NOTE Pour les concentrations critiques actuelles, se référer aux dernières publications des organisations employant cette méthode de référence (par exemple le CLSI et l'EUCAST).

2.5.1

sensible

S

souche bactérienne inhibée in vitro par une concentration d'un agent antimicrobien qui est associée à une forte probabilité de succès thérapeutique

NOTE 1 Les souches bactériennes sont classées «sensibles» en appliquant la concentration critique appropriée dans un système d'essai phénotypique défini.

NOTE 2 Cette concentration critique peut être modifiée à cause de modifications des circonstances (par exemple modifications des posologies habituelles des médicaments, émergence de nouveaux mécanismes de résistance).

2.5.2

intermédiaire

I

souche bactérienne inhibée in vitro par une concentration d'un agent antimicrobien qui est associée à un effet thérapeutique imprévisible

NOTE 1 Les souches bactériennes sont classées «intermédiaires» en appliquant les concentrations critiques appropriées dans un système d'essai phénotypique défini.

NOTE 2 Cette classe de sensibilité implique qu'une infection due à l'isolat peut être traitée de manière appropriée dans les sites corporels où les médicaments sont physiologiquement concentrés ou lorsqu'une posologie plus importante peut être utilisée.

NOTE 3 Cette classe indique également une «zone tampon» empêchant tout facteur technique, incontrôlé, de faible importance, de provoquer des écarts d'interprétation majeurs.

NOTE 4 Ces concentrations critiques peuvent être modifiées à cause de modifications des circonstances (par exemple modifications des posologies habituelles des médicaments, émergence de nouveaux mécanismes de résistance).

2.5.3

résistante

R

souche bactérienne inhibée in vitro par une concentration d'un agent antimicrobien qui est associée à une forte probabilité d'échec thérapeutique

NOTE 1 Les souches bactériennes sont classées «résistantes» en appliquant la concentration critique appropriée dans un système d'essai phénotypique défini.

NOTE 2 Cette concentration critique peut être modifiée à cause de modifications des circonstances (par exemple modifications des posologies habituelles des médicaments, émergence de nouveaux mécanismes de résistance).

2.6

souche sauvage

absence de mécanisme de résistance acquis par l'agent antimicrobien pour une souche donnée

2.7

souche de référence

bactérie répertoriée, caractérisée avec des phénotypes et/ou des génotypes de sensibilité antimicrobienne définis

NOTE Les souches de référence sont conservées comme des cultures mères dont les cultures de travail sont issues. Elles peuvent être obtenues à partir de collections de culture et utilisées pour le contrôle de la qualité.

2.8 Méthode d'essai de sensibilité

2.8.1

dilution en bouillon

technique dans laquelle les conteneurs sont remplis avec les volumes appropriés d'une solution antimicrobienne, employant des concentrations de l'agent antimicrobien et des volumes appropriés de bouillon avec un inoculum défini, qui augmentent de façon incrémentielle (en général de raison 2)

NOTE L'objectif de cette méthode est de déterminer la CMI.

2.8.2

microdilution

réalisation de la dilution en bouillon sur des plaques de microdilution ayant une capacité de $\leq 200 \mu\text{l}$ par cupule

2.9

bouillon

milieu liquide utilisé pour la croissance in vitro de bactéries

2.10

inoculum

nombre de bactéries dans une suspension, calculé par rapport au volume final

NOTE L'inoculum est exprimé en unités formant colonie par millilitre (UFC/ml).

2.11

effet de l'inoculum

modification de la CMI liée à une modification de l'inoculum

3 Modes opératoires

3.1 Généralités

Les essais sont réalisés sur des plaques de microdilution. La méthode est basée sur la préparation de solutions de travail d'agent antimicrobien dans des volumes de 50 µl (avec l'ajout d'un inoculum également dans un volume de 50 µl) ou dans un volume de 100 µl (avec l'ajout d'un maximum de 5 µl de volume d'inoculum) par cupule.

3.2 Milieu

Un bouillon Mueller-Hinton doit être utilisé (voir l'Annexe A pour plus de détails).

3.3 Agents antimicrobiens

3.3.1 Généralités

Les agents antimicrobiens doivent être obtenus directement du fabricant ou de sources commerciales fiables; les préparations pharmaceutiques à usage clinique ne sont pas acceptables. Les agents antimicrobiens doivent être fournis avec un numéro de lot, un titre, une date de péremption et des détails concernant les conditions de stockage recommandées. Sauf recommandation contraire du fabricant, les substances doivent être conservées dans des conteneurs hermétiquement fermés, dans l'obscurité, à une température de 4 °C à 8 °C avec un agent hygroscopique. Il convient de préparer les agents hygroscopiques en parties aliquotes, dont une est utilisée lors de chaque essai.

NOTE Laisser les conteneurs se réchauffer à température ambiante avant de les ouvrir afin d'éviter toute condensation.

3.3.2 Préparation des solutions mères

ISO 20776-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6a0880df-60cd-427e-831c->

L'utilisation d'une balance analytique étalonnée est nécessaire pour peser les agents antimicrobiens. Il doit être tenu compte du titre de la poudre en utilisant la formule suivante pour obtenir la quantité de substance d'agent antimicrobien ou le volume de diluant nécessaire pour une solution normalisée:

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \quad (1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho} \quad (2)$$

où

ρ est la concentration de la solution mère, en mg/l;

m est la masse de l'agent antimicrobien (poudre), en g;

P est le titre de l'agent antimicrobien (poudre), en mg/g;

V est le volume de diluant, en l.

Les concentrations de solutions mères doivent être de 1 000 mg/l ou plus, même si la solubilité de certains agents est limitée. Les concentrations réelles de solutions mères dépendront de la méthode de préparation de la solution de travail (dilution en série). Il convient de dissoudre et de diluer les agents dans de l'eau distillée stérile, sauf indication contraire du fabricant. Certains agents nécessitent d'autres solvants (voir Tableau 1). Il n'est pas toujours nécessaire de stériliser les solutions. Si nécessaire, la stérilisation doit être effectuée par filtration sur membrane. Les échantillons avant et après stérilisation doivent être comparés par analyse afin de garantir qu'aucune adsorption n'est survenue.

Sauf si des informations sur la stabilité des solutions mères dans des conditions de stockage spécifiées sont disponibles, il convient de les préparer au dernier moment pour chaque lot d'essai.

Tableau 1 — Exemples de solvants et de diluants destinés à fabriquer les solutions mères d'agents antimicrobiens sélectionnés

Agent antimicrobien	Solvant	Diluant
Amikacine	Eau	
Amoxicilline	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0
Ampicilline	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 8,0	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0
Azithromycine	Éthanol à une fraction volumique de 95 % ou acide acétique glacial ^a	Eau
Azlocilline	Eau	
Aztréonam	Solution saturée de bicarbonate de sodium	Eau
Carbénicilline	Eau	
Céfaclor	Eau	
Céfamandole	Eau	
Céfazoline	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0
Cefdinir	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Eau
Cefditoren	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Eau
Céfépime	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0
Céfétamet	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Eau
Céfixime	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 7,0	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 7,0
Cefmétazone	Eau	
Céfonicide	Eau	
Céfopérazone	Eau	
Céfotaxime	Eau	
Céfotétan	Sulfoxyde de diméthyle	Eau
Céfoxitine	Eau	
Céfpodoxime	Solution de bicarbonate de sodium à une concentration massique de 0,1 %	Eau
Céfprozile	Eau	
Céftazidime	Solution saturée de bicarbonate de sodium	Eau
Céftibuten	1/10 volume de sulfoxyde de diméthyle	Eau
Céftizoxime	Eau	
Céftobiprole	Sulfoxyde de diméthyle plus acide acétique glacial ^b	Eau, à agiter de manière vigoureuse
Céftriaxone	Eau	
Céfuroxime	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0
Céphalothine	Tampon phosphate 0,1 mol/l, pH 6,0	Eau
Chloramphénicol	Éthanol à une fraction volumique de 95 %	Eau
Cinoxacine	La moitié d'un volume d'eau, volume minimal 1 mol/l de NaOH pour la dissolution, puis reconstituer le volume total avec de l'eau	Eau