
**Essais de laboratoire clinique et
systèmes de diagnostic in vitro —
Méthode de référence pour
soumettre à essai l'activité in vitro
des agents antimicrobiens par
rapport aux levures impliquées dans
les maladies infectieuses**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
*Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems —
Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial
agents against yeast fungi involved in infectious diseases*
ISO 16256:2012
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16256:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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 antifongiques.....	5
3.4 Stockage des plaques de microdilution.....	8
3.5 Préparation de l'inoculum — Généralités.....	8
3.6 Inoculation des plaques de microdilution.....	9
3.7 Incubation des plaques de microdilution.....	9
3.8 Lecture des résultats de CMI.....	10
3.9 Interprétation des CMI.....	10
4 Contrôle qualité	10
Annexe A (informative) Milieu RPMI-1640	13
Annexe B (informative) Étalon de turbidité de 0,5 McFarland au sulfate de baryum	15
Annexe C (informative) Moments de lecture acceptables pour les interprétations de CMI en cas de lecture visuelle	16
Bibliographie	17

ISO 16256:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

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 16256 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 212, *Laboratoires d'analyses de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16256:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

Introduction

Les essais de sensibilité *in vitro* sont réalisés sur des micro-organismes soupçonnés d'être pathogènes; particulièrement s'ils sont supposés appartenir à des espèces pouvant avoir développé une résistance à des agents antimicrobiens courants. Ces essais sont également utilisés dans le cadre de la surveillance de résistance, des études épidémiologiques de sensibilité, ainsi que pour comparer les nouveaux agents avec ceux existants.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des agents antimicrobiens se fait via des protocoles par dilution qui constituent la méthode de référence pour les essais de sensibilité aux agents antifongiques. Les méthodes de détermination de CMI servent à surveiller la résistance, aux essais comparatifs de nouveaux agents à des fins de recherche ou d'enregistrement, à établir la sensibilité des organismes produisant des résultats ambigus lors d'essais de routine, aux essais sur les organismes lorsque les essais de routine sont peu fiables et à obtenir des résultats quantitatifs nécessaires à un traitement clinique. Dans des essais par dilution, on éprouve la capacité des micro-organismes à se développer de façon discernable sur une série de plaques gélosées (dilution en milieu solide) ou de bouillons de culture (dilution en milieu liquide) renfermant des dilutions consécutives d'agents antimicrobiens.

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien (en mg/l) qui, dans des conditions d'essai *in vitro* données, réduit de façon mesurable visuellement ou optiquement, la croissance d'un micro-organisme sur une durée donnée. La CMI est un indicateur de la sensibilité de l'organisme à l'agent antimicrobien et aide à la prise de décision de traitement clinique. Les résultats pouvant être influencés par la méthode utilisée, un contrôle et une normalisation soigneux sont nécessaires pour maintenir une reproductibilité intra- et interlaboratoires. Il est généralement reconnu que les déterminations de CMI en bouillon sont reproductibles jusqu'à une dilution au demi de la concentration critique (c'est-à-dire à plus ou moins une cupule ou un tube dans une série de dilutions au demi).

La dilution en milieu liquide est une technique dans laquelle des contenants renfermant des volumes identiques de solutions d'agent antimicrobien aux concentrations croissantes (généralement au-demi) sontensemencés d'une quantité connue de microorganismes.

La microdilution en milieu liquide correspond à un essai de dilution en milieu liquide sur une plaque de microdilution.

Les méthodes de référence décrites dans la présente partie de l'ISO 16256 sont destinées aux essais sur des cultures pures de levures. Les méthodes de microdilution en milieu liquide décrites dans la présente partie de l'ISO 16256 sont essentiellement identiques à celles décrites par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)^[1] et par le Comité européen des antibiogrammes (EUCAST)^[2]. Ces méthodes se sont révélées présenter des CMI du fluconazole globalement, si ce n'est exactement, identiques à 2 mg/l près^[3]. Des études avec divers autres agents antifongiques sont prévues ou en cours. Il convient que le laboratoire qui souhaiterait utiliser la présente Norme internationale pour des études sur de nouveaux agents antifongiques ou pour des comparaisons avec des CMI obtenues par un dispositif diagnostique choisisse les options du protocole à employer en fonction du mode de lecture de la CMI, selon qu'elle se fasse par inspection visuelle (méthode CLSI) ou par spectrophotométrie (méthode EUCAST). Quel que soit son choix, le mode opératoire de l'option choisie doit être scrupuleusement observé.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16256:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

Essais de laboratoire clinique et systèmes de diagnostic in vitro — Méthode de référence pour soumettre à essai l'activité in vitro des agents antimicrobiens par rapport aux levures impliquées dans les maladies infectieuses

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer des matériaux, opérations et équipements dangereux. La présente Norme internationale ne prétend pas examiner tous les problèmes de sécurité associés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente Norme internationale d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode d'essai de la sensibilité aux agents antifongiques des levures pathogènes, dont *Candida spp.* et *Cryptococcus neoformans*. La méthode de référence ici décrite n'a pas été utilisée dans des études sur les phases levures de champignons dimorphes tels que *B. dermatitidis* et ou *H. capsulatum* variété *capsulatum*. En outre, les essais sur les champignons filamenteux (moisissures) posent d'autres problèmes de normalisation qui ne sont pas traités par la présente procédure. Des méthodes de référence pour les essais de détermination de sensibilité antifongique des champignons filamenteux par dilution en milieu liquide ont été élaborées et sont maintenant consignées dans le document M38 du CLSI et le document E-DEF 9.1 de l'EUCAST^{[4][5][6][7][8]}.

La présente Norme internationale décrit la méthode de référence pour la microdilution en milieu liquide qui peut être réalisée de deux façons. La première implique une détermination visuelle de la CMI (méthode CLSI)^[1]; la seconde implique une détermination spectrophotométrique de la CMI (méthode EUCAST)^[2]. La CMI reflète l'activité de l'agent antimicrobien dans les conditions d'essai décrites et peut, avec d'autres facteurs tels que la pharmacologie de l'agent ou les mécanismes de résistance antifongique, servir dans la prise de décision de traitement clinique. Les CMI permettent de classer les organismes comme «sensible» (S), «sensible selon la dose» (SFD), «intermédiaire» (I), «non sensible» (NS) ou «résistant» (R). Par ailleurs, les CMI peuvent servir à définir les populations en types sauvage ou non sauvage. L'interprétation clinique de la CMI sort du domaine d'application de la présente Norme internationale. Des critères d'interprétation catégoriels spécifiques aux méthodes du CLSI et de l'EUCAST sont donnés dans les derniers tableaux d'interprétation édités par ces organismes^{[2][9]}. Dans le cadre d'une validation ou d'un enregistrement, il est recommandé de comparer les méthodes d'essai de sensibilité de routine ou les dispositifs de diagnostic à la présente méthode de référence, afin de 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 antifongique

substance d'origine biologique, semi-synthétique ou synthétique qui inhibe la croissance des champignons ou les tue et peut, par conséquent, servir au traitement des infections

2.2 Agents antifongiques — Propriétés

NOTE Cette définition n'inclut pas les produits désinfectants, antiseptiques et conservateurs.

2.2.1

teneur

fraction active d'une substance d'essai, déterminée par dosage par rapport à une poudre de référence de la même substance

NOTE La teneur peut être exprimée par une fraction massique en milligrammes par grammes (mg/g) ou par un contenu actif en unités internationales (UI) par gramme ou par un pourcentage volumique ou massique ou par une concentration massique en moles d'ingrédient par litre de la substance d'essai.

2.2.2

concentration

quantité d'agent antifongique dans un volume défini de liquide

NOTE 1 La concentration est exprimée en mg/l.

NOTE 2 mg/l = µg/ml, mais l'emploi de l'unité µg/ml n'est pas recommandé.

2.3

solution mère

solution initiale servant aux dilutions

2.4

concentration minimale inhibitrice

CMI

concentration la plus faible qui, dans des conditions d'essai in vitro données, réduit la croissance dans une mesure donnée sur une période donnée

NOTE La CMI est exprimée en mg/l.

2.5

concentration critique

CC

valeur précise de la CMI qui permet d'affecter un champignon à l'une des catégories cliniques «sensible», «sensible selon la dose», «intermédiaire», «non sensible» et «résistant»

2.5.1 Lecture visuelle

NOTE Pour les concentrations critiques en vigueur, se référer aux dernières publications des organisations employant la méthode de référence (par exemple le CLSI et l'EUCAST)[1][2][9].

2.5.1.1

sensible

S

qualificatif d'une souche fongique inhibée in vitro par une concentration en un agent antifongique, qui est associée à une forte probabilité de succès thérapeutique

NOTE 1 Les souches fongiques sont classées «sensibles» en considérant la concentration critique appropriée dans un système d'essais phénotypiques défini.

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

2.5.1.2

sensible selon la dose

S-SD

qualificatif d'une souche fongique inhibée in vitro par une concentration en agent antifongique atteinte in vivo au moyen de doses d'agent plus élevées que la normale, lorsque ces accroissements de dose restent sûrs

NOTE 1 Les souches fongiques sont classées «sensibles selon la dose» en considérant les concentrations critiques appropriées dans un système d'essais phénotypiques défini.

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

2.5.1.3 à sensibilité intermédiaire

I

micro-organisme défini comme intermédiaire par un niveau d'activité d'agent antimicrobien associée à un effet thérapeutique incertain

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

2.5.1.4 non sensible

NS

qualificatif des levures n'ayant encore été catégorisées que comme sensibles, non connues, dose dépendantes, intermédiaire ni résistantes (c'est-à-dire uniquement sensibles) et est souvent affecté aux nouveaux agents antifongiques pour lesquels aucun isolat résistant n'a encore été rencontré

2.5.1.5 résistante

R

qualificatif d'une souche fongique inhibée in vitro par une concentration en agent antifongique, qui est associée à une forte probabilité d'échec thérapeutique

2.5.2 Lecture spectrophotométrique

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

NOTE 1 Les souches fongiques sont classées «résistantes» en considérant les concentrations critiques appropriées dans un système d'essais phénotypiques défini.

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

2.5.2.1 sensible

S

micro-organisme défini comme sensible par un niveau d'activité antimicrobienne associée à une forte probabilité de succès thérapeutique

2.5.2.2 à sensibilité intermédiaire

I

micro-organisme défini comme intermédiaire par un niveau d'activité d'agent antimicrobien associée à un effet thérapeutique incertain

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

2.5.2.3 résistant

R

micro-organisme défini comme résistant par un niveau d'activité antimicrobienne associée à une forte probabilité d'échec thérapeutique

2.6

type sauvage

absence, chez une souche fongique donnée, de mécanisme acquis de résistance à l'agent antifongique donné

2.7

souche de référence

souche fongique répertoriée, bien connue, aux phénotypes et/ou génotypes de sensibilité antifongique stables et définis

2.8 Méthode d'essai de sensibilité

NOTE Les souches de référence sont conservées sous forme de cultures mères desquelles sont obtenues des cultures d'essai. Elles proviennent de collections de cultures et servent au contrôle qualité.

2.8.1

dilution en milieu liquide

technique selon laquelle des conteneurs sont remplis de volumes appropriés d'une solution antifongique aux concentrations croissantes (souvent d'un facteur de 2) en agent antifongique, puis complétés de volumes adaptés de bouillon contenant un inoculum défini

NOTE Cette méthode a pour but de déterminer la CMI.

2.8.2

microdilution

réalisation d'une dilution en milieu liquide dans des plaques de microdilution d'une capacité ≤ 300 μl par cupule

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2.9

bouillon

milieu liquide employé pour cultiver les levures in vitro

[ISO 16256:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012)

2.10

inoculum

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/668f3852-5166-4c84-a866-ac8d384865f9/iso-16256-2012>

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 dans des plaques de microdilution en plastique jetables. Le protocole consiste à préparer des solutions d'essai d'agent antifongique doublement concentrées, à raison de 100 μl par cupule, puis de leur ajouter un inoculum lui aussi de 100 μl .

3.2 Milieu

3.2.1 Généralités

Le milieu à employer est un bouillon RPMI-1640 (voir l'Annexe A pour la préparation des deux versions du bouillon glucosé RPMI-1640).

3.2.2 Lecture visuelle

Il convient que le milieu RPMI-1640 contienne 0,2 % de glucose. Le bouillon RPMI-1640 est préparé simplement concentré, puis mélangé à des dilutions d'agent antifongique doublement concentrées et à la suspension de levures contenant l'inoculum désiré, le volume de suspension étant égal au volume de bouillon.

3.2.3 Lecture spectrophotométrique

Il convient que le milieu RPMI-1640 contienne 2 % de glucose. Le bouillon RPMI-1640 comme l'agent antifongique sont tous deux préparés doublement concentrés et l'inoculum est ensuite ajouté dans un volume égal d'eau distillée.

3.3 Agents antifongiques

3.3.1 Généralités

Les agents antifongiques doivent être obtenus directement auprès de leur fabricant ou de sources commerciales fiables. Les préparations pharmaceutiques pour usage clinique ne sont pas acceptables. Les agents antifongiques doivent être fournis avec un numéro de lot, une teneur, une date d'expiration et des indications sur les conditions de stockage recommandées. Sans consigne particulière du fabricant, les substances doivent être conservées dans des conteneurs hermétiques, à l'obscurité, à -20 °C, avec un dessiccateur. Il convient que les agents hygroscopiques soient répartis en aliquotes, dont un est utilisé à chaque essai.

Afin d'éviter toute condensation et perte de teneur, laisser les conteneurs se réchauffer à température ambiante avant de les ouvrir.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

3.3.2 Préparation des solutions mères

La pesée des agents antifongiques doit se faire au moyen d'une balance analytique étalonnée. En fonction de la teneur de la poudre, la formule suivante donne la quantité de substance antifongique ou le volume de diluant nécessaire pour obtenir la solution mère:

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

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

où

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

m est la masse d'agent antifongique (poudre), en g;

P est la teneur en agent antifongique (poudre), en mg/g;

V est le volume de diluant, en l.

Bien que la solubilité de certains agents soit un facteur limitant, il convient que la concentration des solutions mères soit de 1 000 mg/l. Les concentrations des solutions mères dépendent de la méthode de préparation des solutions d'essai (dilutions en série). Certains agents réclament des solvants alternatifs (voir Tableau 1). Généralement, la stérilisation des solutions n'est pas nécessaire. Si elle est nécessaire, il convient que la stérilisation soit réalisée par filtration sur membrane et que des échantillons avant et après stérilisation soient comparés pour vérifier qu'aucune adsorption ne se soit produite.