

---

---

**Laboratoires d'analyses de biologie  
médicale et systèmes de diagnostic  
in vitro — Méthode de référence de  
microdilution en milieu liquide pour  
soumettre à essai l'activité in vitro des  
agents antimicrobiens par rapport aux  
levures impliquées dans les maladies  
infectieuses**

*Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems —  
Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity  
of antimicrobial agents against yeast fungi involved in infectious  
diseases*

ISO 16256:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ff6375cf-6d0e-4e44-9730-9e6a91e3b786/iso-16256-2021>



**iTeh Standards**  
**(<https://standards.iteh.ai>)**  
**Document Preview**

ISO 16256:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ff6375cf-6d0e-4e44-9730-9e6a91e3b786/iso-16256-2021>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +41 22 749 01 11  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b>	<b>iv</b>
<b>Introduction</b>	<b>vi</b>
<b>1 Domaine d'application</b>	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b>	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b>	<b>1</b>
<b>4 Modes opératoires d'essai</b>	<b>3</b>
4.1 Généralités	3
4.1.1 Plaques et méthode	3
4.1.2 Conditions d'utilisation des plaques de microdilution jetables	3
4.2 Milieu	4
4.2.1 Généralités	4
4.2.2 Lecture visuelle	4
4.2.3 Lecture spectrophotométrique	4
4.3 Agents antifongiques	4
4.3.1 Généralités	4
4.3.2 Préparation des solutions mères	4
4.3.3 Préparation des solutions de travail	5
4.4 Préparation des plaques de microdilution en milieu liquide	6
4.4.1 Préparation pour les essais à lecture visuelle – Lecture visuelle	6
4.4.2 Préparation pour les essais à lecture spectrophotométrique – Lecture spectrophotométrique	7
4.5 Stockage des plaques de microdilution	7
4.6 Préparation de l'inoculum	7
4.6.1 Généralités	7
4.6.2 Préparation de l'inoculum pour des essais à lecture visuelle	7
4.6.3 Préparation de l'inoculum pour des essais à lecture spectrophotométrique	8
4.7 Inoculation des plaques de microdilution	8
4.8 Incubation des plaques de microdilution	8
4.8.1 Généralités	8
4.8.2 Lecture visuelle	8
4.8.3 Lecture spectrophotométrique	9
4.9 Lecture des résultats de CMI	9
4.9.1 Généralités	9
4.9.2 Méthode de lecture visuelle	9
4.9.3 Méthode de lecture spectrophotométrique	9
4.10 Interprétation des CMI	9
<b>5 Contrôle qualité (CQ)</b>	<b>9</b>
<b>Annexe A (informative) Milieu RPMI-1640</b>	<b>13</b>
<b>Annexe B (informative) Étalon de turbidité de 0,5 McFarland au sulfate de baryum</b>	<b>15</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>16</b>

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 212, *Laboratoires de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 140, *Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 16256:2012), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- dans le titre, ajout de «microdilution en milieu liquide»;
- suppression de la lecture à 48 h pour l'espèce *Candida* par la méthode de lecture visuelle;
- suppression des définitions de sensibilité et de résistance qui sont en dehors du domaine d'application du présent document relatif au déroulement des essais;
- inclusion de considérations relatives aux essais de sensibilité aux agents antifongiques d'espèces de levure, avec des plaques de microdilution «traitées» par des fabricants de plaques avant utilisation dans les essais;
- mise à jour des méthodes de dénombrement de cellules viables pour les méthodes de lecture visuelle et spectrophotométrique;
- ajout de nouveaux agents antifongiques (isavuconazole, rezafungine) dans les tableaux répertoriant les plages pour les essais et le contrôle qualité;

- caractérisation détaillée des composés d'une formulation de RPMI-1640 connue pour donner des résultats reproductibles aux essais de sensibilité aux agents antifongiques des espèces de *Candida* et de *Cryptococcus neoformans*;
- réaffectation des annexes;
- mise à jour de la bibliographie avec des informations plus pertinentes sur le déroulement des essais de sensibilité aux agents antifongiques des levures.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

ISO 16256:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ff6375cf-6d0e-4e44-9730-9e6a91e3b786/iso-16256-2021>

## 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 modes opératoires de 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 boîtes de gélose (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 milieu liquide 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 micro-organismes.

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 le présent document sont destinées aux essais sur des cultures pures de levures. Les méthodes de microdilution en milieu liquide décrites dans le présent document sont essentiellement identiques à celles décrites par le Clinical et Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>[1][5]</sup> et par le Comité européen des antibiogrammes (EUCAST)<sup>[2][10]</sup>. Au départ, ces méthodes se sont révélées présenter des CMI du fluconazole similaires, si ce n'est identiques, à 2 mg/l près<sup>[3]</sup>. Ensuite, les méthodes se sont avérées présenter des CMI pour deux souches de contrôle qualité d'agents antifongiques autorisés qui étaient similaires à celles décrites dans le présent document, même si les résultats du contrôle qualité obtenus pour la méthode spectrophotométrique peuvent avoir tendance à être légèrement inférieurs à ceux obtenus pour la méthode de lecture visuelle. Le laboratoire qui souhaiterait utiliser le présent document pour des études sur de nouveaux agents antifongiques ou comme méthode de référence pour des comparaisons avec des CMI obtenues par un dispositif de diagnostic, peut choisir les options du mode opératoire à employer en fonction du mode de lecture de la CMI, selon qu'elle se fasse par inspection visuelle (méthode CLSI)<sup>[5]</sup> ou par spectrophotométrie (méthode EUCAST)<sup>[2][10]</sup>. Quel que soit son choix, il convient de respecter scrupuleusement le mode opératoire de l'option choisie. Dans la première édition du présent document, c'est-à-dire l'ISO 16256:2012, les essais de contrôle qualité rapportés ont été effectués en utilisant des plaques de microdilution en milieu liquide non traitées par les fabricants de plaques en plastique, que ce soit pour la méthode de lecture visuelle ou pour la méthode spectrophotométrique.

Dans le présent document, les formes verbales suivantes sont utilisées:

— «doit» indique une exigence;

- «il convient de/que» indique une recommandation;
- «peut/il est admis/permis» indique une autorisation;
- «peut/il est possible que» indique une possibilité ou une capacité.

**iTeh Standards**  
**(<https://standards.iteh.ai>)**  
**Document Preview**

ISO 16256:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ff6375cf-6d0e-4e44-9730-9e6a91e3b786/iso-16256-2021>





# Laboratoires d'analyses de biologie médicale et systèmes de diagnostic in vitro — Méthode de référence de microdilution en milieu liquide pour soumettre à essai l'activité in vitro des agents antimicrobiens par rapport aux levures impliquées dans les maladies infectieuses

**AVERTISSEMENT** — Le présent document peut impliquer l'utilisation de produits dangereux et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillage à caractère dangereux. Le présent document n'est pas destiné à traiter de tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document 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

Le présent document décrit une méthode d'essai de la sensibilité aux agents antifongiques des levures pathogènes, dont *Candida spp.* et *Cryptococcus neoformans*. La méthode de référence décrite ici n'a pas été utilisée dans des études sur les phases levures de champignons dimorphes tels que *Blastomyces dermatitidis* et/ou *Histoplasma capsulatum* variété *capsulatum*. En outre, les essais sur les champignons filamenteux (moisissures) posent d'autres problèmes de normalisation qui ne sont pas traités par le présent mode opératoire. Ces méthodes vont au-delà du domaine d'application du présent document.

Le présent document décrit la méthode de référence de microdilution en milieu liquide qui peut être réalisée de deux façons. La première implique une détermination visuelle de la CMI (méthode CLSI)<sup>[1]</sup><sup>[5]</sup>; la seconde implique une détermination spectrophotométrique de la CMI (méthode EUCAST)<sup>[2]</sup><sup>[10]</sup>. 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. 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 du présent document. 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<sup>[5]</sup><sup>[15]</sup>. Dans le cadre d'une validation ou d'un enregistrement, les méthodes d'essai de sensibilité de routine ou les dispositifs de diagnostic peuvent être comparés avec la présente méthode de référence, afin de garantir des résultats comparables et fiables.

## 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

## 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

### 3.1

#### **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

Note 1 à l'article: Cette définition n'inclut pas les produits désinfectants, antiseptiques et conservateurs.

### 3.2 Agents antifongiques — Propriétés

#### 3.2.1

##### **teneur**

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

Note 1 à l'article: La teneur peut être exprimée par une fraction massique en milligrammes par grammes (mg/g), par un contenu actif en unités internationales (UI) par gramme, par un pourcentage volumique ou massique ou par une concentration massique en moles d'ingrédient par litre de la substance d'essai.

#### 3.2.2

##### **concentration**

quantité d'*agent antifongique* (3.1) dans un volume spécifié de liquide

Note 1 à l'article: La concentration est exprimée en mg/l.

Note 2 à l'article: mg/l = µg/ml, mais l'emploi de l'unité µg/ml n'est pas recommandé.

#### 3.3

##### **solution mère**

solution initiale servant aux dilutions

#### 3.4

##### **concentration minimale inhibitrice**

##### **CMI**

*concentration* (3.2.2) la plus faible qui, dans des conditions d'essai in vitro spécifiées, réduit la croissance dans une mesure donnée sur une période spécifiée

Note 1 à l'article: La CMI est exprimée en mg/l.

#### 3.5

##### **type sauvage**

absence, chez une souche fongique donnée, de mécanisme acquis phénotypiquement détectable de résistance à l'*agent antifongique* (3.1)

#### 3.6

##### **souche de référence**

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

Note 1 à l'article: Les souches de référence sont conservées sous forme de cultures mères desquelles sont obtenues des cultures de travail. Elles proviennent de collections de cultures et servent au contrôle qualité.

### 3.7 Méthode d'essai de sensibilité

#### 3.7.1

##### **dilution en milieu liquide**

technique selon laquelle des conteneurs sont remplis de volumes appropriés d'une solution antifongique aux *concentrations* (3.2.2) croissantes (souvent d'un facteur de 2) en *agent antifongique* (3.1), puis complétés de volumes adaptés de *bouillon* (3.8) contenant un *inoculum* (3.9) spécifié

Note 1 à l'article: Cette méthode a pour but de déterminer la *concentration minimale inhibitrice* (3.4).