

TP7 Dosage d'antibiotique par une méthode microbiologique en milieu liquide

1. Préparation de la souche test

On dispose d'une souche de *Staphylococcus aureus* sensible à l'ampicilline, cultivée en milieu Müller-Hinton et en phase de croissance exponentielle.

Évaluer la concentration en biomasse par mesure de l'absorbance à 620nm ($0,2\text{UA} \rightarrow 10^8$ cellules/mL).
Ensemencer un tube de 10 mL bouillon Müller-Hinton de façon à obtenir un inoculum à 0,06 UA.

2. Étalonage du dosage

Un étalonage est réalisé avec une solution de titre connu en ampicilline à $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Préparer par dilution les solutions stocks nécessaires dans le diluant.

cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ampicilline $4\mu\text{g.mL}^{-1}$	100	80	60	40	20	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilline $0,4\mu\text{g.mL}^{-1}$	-	-	-	-	-	100	80	60	40	20	10	-
diluant	0	20	40	60	80	-	20	40	60	80	90	100
Inoculum à $0,04\text{UA en } \mu\text{L}$	100											
Lire l'absorbance A_0 au lecteur de microplaque à 620 nm												
Incuber à 37°C avec agitation pendant 4h												
Lire l'absorbance A_t au lecteur de microplaque à 620 nm												

3. Dosage d'une solution d'ampicilline

On dispose d'une solution d'ampicilline de titre inconnu.

Réaliser dans la microplaque les dilutions en cascade de cette solution.

Réaliser le dosage en testant $100\mu\text{L}$ des différentes concentrations avec le même protocole que celui de l'étalonage.

cupule	1	2	3	4	5	6
Ampicilline à doser μL	10	20	20	20	20	20
Diluant μL	0	100				
Dilution effectuée						
Inoculum $0,04\text{UA en } \mu\text{L}$	100					
Lire l'absorbance A_0 au lecteur de microplaque à 620 nm						
Incuber à 37°C avec agitation pendant 4h						
Lire l'absorbance A_t au lecteur de microplaque à 620 nm						

4. Compte rendu

1) Présenter les résultats de l'étalonage sous forme de tableau (A_0 , A_t , A_t-A_0 , croissance relative, concentration en ampicilline, Ln (concentration en ampicilline))

2) Tracer la courbe de la fonction croissance relative = $f(\text{Ln}(\text{concentration en ampicilline}))$.

Vérifier qu'il existe bien une zone de linéarité.

3) Déterminer la CI50.

4) Pourquoi réalise t-on plusieurs dilutions de la solution à doser ? déterminer si c'est possible le titre de la solution à doser.