

TP8 Dosage d'antibiotique par une méthode microbiologique en milieu gélose

1. Préparation du milieu

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 flacon de 50 mL de milieu Müller Hinton gélose en surfusion, de façon à ce que le volume d'inoculum introduit puisse être considéré négligeable. La concentration cellulaire finale doit être de l'ordre de 10^6 cellules/mL.

Ajouter 1 mL de solution de TTC à 0,2% aux 50mL de milieu.

Couler le milieu dans une boîte adaptée (12 x 12 cm), laisser durcir puis faire bien sécher la gélose (important).

2. Étalonnage du dosage

La solution mère d'ampicilline fournie est titrée à $1024\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Réaliser en tubes à hémolyse, avec de l'eau stérile, les dilutions permettant d'obtenir exactement 1mL de solutions étalons à 256 ; 128 ; 64 ; 32 ; 16 et $8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (on pourra conserver la même pipette pour les dilutions en cascade de l'antibiotique). Tester chaque point de la gamme par les deux techniques ; méthode des disques et méthode des puits. Il faudra donc 12 dépôts pour l'étalonnage.

Méthode des disques :

Déposer les disques stériles à l'aide d'une pince. L'imprégner rapidement avec 10 μ L de la solution d'antibiotique à l'aide d'une pipette automatique.

Méthode des puits :

Réaliser les puits à l'aide d'un emporte pièce stérile. Introduire dans chaque puits 50 μ L de solution d'antibiotique étalon diluée au 1/5 (donc ajouter 4mL par tube; on négligera les 10 μ L prélevés pour imprégner le disque).

Laisser ensuite diffuser l'antibiotique 1/2h à température ambiante. Incuber 24h à 37°C.

3. Dosage d'une solution d'ampicilline

On dispose d'une solution d'ampicilline de titre estimé entre 50 et $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Réaliser le dosage en procédant de façon analogue à la gamme d'étalonnage. Doubler chaque essai. Il faudra donc 4 dépôts pour les essais (2 disques ; 2 puits).

Important: prévoir un plan des dépôts sur la boîte avant le début de la manipulation.

Penser à alterner les dépôts pour lesquels la zone d'inhibition est prévue grande avec des dépôts pour lesquels cette zone sera faible.

Compte rendu

- 1) Préparation de l'inoculum : mesure de l'absorbance : calcul du volume, introduit.
- 2) Tableau des dilutions réalisées de la solution mère d'ampicilline pour l'étalonnage.
- 3) Plan des dépôts effectués
- 4) Résultats : tableau et courbe d'étalonnage diamètre = f (ln[Amp]) pour les deux méthodes
- 5) Détermination du titre de la solution inconnue d'ampicilline

Matériel

- 1 flacon de gélose MH en surfusion
- 1 échantillon d'ampicilline à $1024\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- 1 échantillon d'ampicilline X de titre inconnu
- 16 disques stériles - emporte pièce
- Tubes hémolyse - eau stérile
- P 20 - 1 pipette 5 mL – pipettes 1mL - pipettes 2mL