

# 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 $\mu$ 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 $\mu$ L de solution d'antibiotique étalon diluée au 1/5 (donc ajouter 4mL par tube; on négligera les 10 $\mu$ 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