

CETRIMIDE AGARDETECTION AND ENUMERATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***1 INTENDED USE**

Cetrimide Agar is a selective medium for the isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in biological samples of animal origin and in pharmaceutical and cosmetic products.

Its typical composition is that of the United States Pharmacopoeia and of the Directive NF EN ISO 22717 for the control of cosmetic products.

2 HISTORY

The formula of this medium was derived from the King A medium, favoring pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa*. In 1951, Lowbury recommended the use of cetrimide in a selective medium for the isolation of *Pseudomonas*. The concentration of the inhibitor was reduced by Lowbury and Collins (1955) as a result of its improved purity.

3 PRINCIPLES

Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) is a quaternary ammonium compound which inhibits a large number of bacteria including species of *Pseudomonas* other than *Pseudomonas aeruginosa*.

The production of pyocyanin (a blue, non-fluorescent pigment soluble in water and chloroform) is stimulated by magnesium chloride and potassium sulfate.

The medium also favors the production of fluorescent pigments (pyoverdins) by some strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

Most *Pseudomonas aeruginosa* can be identified by the characteristic grapelike odor of aminoacetophenone.

4 TYPICAL COMPOSITION

The composition can be adjusted in order to obtain optimal results. .

For 1 liter of optimized media :

- Pancreatic digest of gelatin	20,0 g
- Glycerol	10 mL
- Cetrimide	0,3 g
- Magnesium chloride	1,4 g
- Sulfate de potassium.....	10,0 g
- Bacteriological agar.	13,6 g

pH of the media ready-to-use at 25 °C : 7,2 ± 0,2.

For 45,3 g of dehydrated base BK049

- Pancreatic digest of gelatin	20,0 g
- Cetrimide	0,3 g
- Magnesium chloride.....	1,4 g
- Potassium sulfate	10,0 g
- Bacteriological agar	13,6 g

Glycerol not supplied

For 1 liter of ready-to-melt media (BM184)

- Pancreatic digest of gelatin.....	20,0 g
- Glycerol	10 mL
- Cetrimide	0,3 g
- Magnesium chloride.....	1,4 g
- Potassium sulfate.....	10,0 g
- Bacteriological agar.....	13,6 g

5 PREPARATION

- Suspend 45,3 g of dehydrated media (BK049) in 1 liter of distilled or deionized water.
- Add 10 mL of glycerol.
- Slowly bring to boiling, stirring with constant agitation until complete dissolution.
- Dispense in tubes or flasks.
- Sterilize in an autoclave at 121°C for 15 minutes.
- Cool and maintain the medium at 44-47°C.
- Pour into sterile Petri dishes and Let solidify on a cold surface.

✓ **Reconstitution :**
45,3 g/L
+ 10 mL of glycerol

✓ **Sterilization :**
15 min at 121 °C

Use of ready-to-melt media :

- Melt the media (if it was prepared in advance) or use the ready-to-melt media containing glycerol (BM184), for the minimum amount of time necessary to achieve total liquefaction.
- Cool and maintain at 44-47 °C.

6 INSTRUCTIONS FOR USE

- Dry the plates in an incubator with the covers partially removed.
- Inoculate by streaking with the aid of a sterile loop onto the surface of the agar.
- Incubate at 30-35 °C
 - for 24 to 48 hours, as defined in the Directive NF EN ISO 22717 for cosmetic products.
 - for 18 to 72 hours following the Pharmacopoeia, in the case of pharmaceutical products.

✓ **Inoculation :**
Surface streaking

✓ **Incubation :**
18 h to 72 h at 30-35 °C

7 RESULTS

Pseudomonas aeruginosa can present the following aspects :

- characteristic yellow-green pigmentation and a fluorescence under UV light at 254 nm.
- grayish, mucoid colonies, with or without pigmentation.

Note :

Occasionally, strains of *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Alcaligenes* and *Aeromonas* may also grow, causing a slight yellowing of the medium. This color is easily differentiated from fluorescein production, since the former does not fluoresce.

8 QUALITY CONTROL

Dehydrated media : cream-white powder, free-flowing and homogeneous.

Complete prepared media : whitish agar.

Typical culture response after 48 hours of incubation at 32,5 °C, inoculum $\leq 10^2$ microorganisms

Microorganisms	Theoretical growth (P_R : Productivity Ratio)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00026	$P_R \geq 50 \%$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00024	$P_R \geq 50 \%$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025	$P_R \geq 50 \%$
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	Inhibited
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	Inhibited

9 STORAGE / SHELF LIFE

Dehydrated media : 2-30 °C.

Media ready-to-melt in vials : 2-8 °C.

The expiration dates are indicated on the labels.

Complete, prepared media in vials (*) : 180 days at 2-8 °C.

Complete, prepared media in plates (*) : 30 days at 2-8 °C.

(*) Benchmark value, determined in standard conditions of preparation, following manufacturer's instructions.

10 PACKAGING

Dehydrated media (base) :

500 g bottle BK049HA

Ready-to-melt media :

10 x 100 mL BM18408

11 BIBLIOGRAPHY

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.G., 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*., J. Clin. Pathol., 8: 47.

Brown, V.I., and Lowbury, E.J.L. 1965. Use of an improved Cetrimide Agar Medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol.,18: 752.

NF EN ISO 22717. Septembre 2009. Cosmétiques. Microbiologie. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pharmacopée Européenne. Chapitre 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : Recherche de microorganismes spécifiés.

12 ADDITIONAL INFORMATION

The information provided on the labels take precedence over the formulations or instructions described in this document and are susceptible to modification at any time, without warning.

Code document : TDS CETRIMIDE_EN v9

Creation date : 01-2003

Updated : 04-2016

Origin of revision : General update.

GELOSE AU CETRIMIDE

DETECTION ET DENOMBREMENT DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif destiné à l'isolement et au dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les produits biologiques d'origine animale, les produits pharmaceutiques et cosmétiques.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans la Pharmacopée européenne et dans la norme NF EN ISO 22717 pour le contrôle des produits cosmétiques.

2 HISTORIQUE

La formule du milieu est dérivée de celle du milieu de King A qui favorise la production de pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa*. En 1951, Lowbury préconisa l'utilisation de cétrimide dans un milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas*. En raison de l'amélioration de la pureté de l'agent inhibiteur, sa concentration fut réduite par Lowbury et Collins en 1955.

3 PRINCIPES

Le cétrimide (bromure de cétyle-triméthyl-ammonium), composé ammonium quaternaire, agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*.

La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent, soluble dans l'eau et le chloroforme) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.

Le milieu favorise également la production de pigments fluorescents (pyoverdines) par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

La plupart des *Pseudomonas aeruginosa* sont identifiables à leur odeur d'aminocétophénone.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu complet :

- Peptone pancréatique de gélatine 20,0 g
- Glycérol 10 mL
- Cétrimide 0,3 g
- Chlorure de magnésium 1,4 g
- Sulfate de potassium 10,0 g
- Agar agar bactériologique 13,6 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,2 ± 0,2.

Pour 45,3 g de base déshydratée BK049

- Peptone pancréatique de gélatine 20,0 g
- Cétrimide 0,3 g
- Chlorure de magnésium 1,4 g
- Sulfate de potassium 10,0 g
- Agar agar bactériologique 13,6 g

Glycérol non fourni

Pour 1 litre de prêt-à-liquéfier (BM184)

- Peptone pancréatique de gélatine 20,0 g
- Glycérol 10 mL
- Cétrimide 0,3 g
- Chlorure de magnésium 1,4 g
- Sulfate de potassium 10,0 g
- Agar agar bactériologique 13,6 g

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 45,3 g de milieu déshydraté (BK049) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Ajouter 10 mL de glycérol.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.

✓ **Reconstitution :**
45,3 g/L
+ 10 mL de glycérol

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Utilisation du milieu prêt à liquéfier :

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance) ou bien le milieu prêt-à-liquéfier, contenant le glycérol (BM184), pendant le temps minimum nécessaire à la reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

6 MODE D'EMPLOI

- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Ensemencer l'inoculum en stries à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu ainsi préparé.
- Incuber à 30-35 °C
 - pendant 24 heures à 48 heures, conformément à la norme NF EN ISO 22717 pour les produits cosmétiques.
 - pendant 18 à 72 heures suivant la Pharmacopée, pour les produits pharmaceutiques.

✓ **Ensemencement :**
En surface

✓ **Incubation :**
18 h à 72 h à 30-35 °C

7 LECTURE

Pseudomonas aeruginosa peut présenter les aspects suivants :

- pigmentation caractéristique jaune-vert et une fluorescence sous ultra-violet à 254 nm.
- colonies muqueuses, grisâtres, pigmentées ou non.

Note :

Occasionnellement, des souches de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Alcaligenes* et *Aeromonas* peuvent cultiver en provoquant un léger jaunissement du milieu. Cette coloration se distingue aisément de la production de fluorescéine, car ce jaunissement ne fluoresce pas.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre blanc-crème, fluide et homogène.

Milieu préparé complet : gélose blanchâtre.

Réponse culturale après 48 heures d'incubation à 32,5 °C, inoculum $\leq 10^2$ microorganismes

Microorganismes	Croissance théorique (P_R : Rapport de productivité)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00026 $P_R \geq 50 \%$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00024 $P_R \geq 50 \%$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025 $P_R \geq 50 \%$
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013 Inhibée
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034 Inhibée

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

Milieu prêt-à-liquéfier en flacons : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu complet préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu complet préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté (base) :

Flacon de 500 g BK049HA

Milieu prêt-à-liquéfier :

Pack de 10 flacons de 100 mL BM18408

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.G., 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*., J. Clin. Pathol., 8: 47.

Brown, V.I., and Lowbury, E.J.L. 1965. Use of an improved Cetrimide Agar Medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol., 18: 752.

NF EN ISO 22717. Septembre 2009. Cosmétiques. Microbiologie. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pharmacopée Européenne. Chapitre 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : Recherche de microorganismes spécifiés.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : CETRIMIDE_FR_V6.

Date création : 01-2003

Date de révision : 03-2016

Motif de révision : Révision générale.