



Système de recherche d'activités enzymatiques

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

Le système API ZYM est une microméthode semi-quantitative de recherche d'activités enzymatiques applicable à différents types d'échantillons (micro-organismes, suspensions cellulaires, tissus, liquides biologiques, etc.). Il permet d'étudier rapidement et simultanément 19 activités enzymatiques à partir de très faibles quantités d'échantillon. Il se présente sous la forme d'une galerie de 20 microcuvettes (cupules) dont le fond est constitué d'un support contenant le substrat enzymatique avec son tampon. Ce support est destiné à favoriser le contact entre l'enzyme et le substrat généralement insoluble.

Le système API ZYM permet de détecter des activités enzymatiques d'un extrait complexe non purifié mais ne vise pas à atteindre la précision des dosages spectrophotométriques pour chaque enzyme. Cette méthode ne vise pas non plus à se substituer aux techniques de séparations électrophorétiques. Par contre, elle peut les orienter en donnant au préalable, dans son état brut, le spectre d'activités enzymatiques de l'échantillon à tester.

PRINCIPE

La galerie API ZYM se compose de 20 cupules spécialement adaptées à l'étude des réactions enzymatiques. Le fond de la galerie est constitué d'une trame de fibres non-tissées où sont répartis les substrats synthétiques. Ce support favorise les réactions enzymatiques même si les substrats sont insolubles.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture.

PRESENTATION (Coffret de 25 tests) :

- 25 galeries API ZYM
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API ZYM est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs :

- API Suspension Medium, 2 ml (Réf. 70 700) ou API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Réf. 20 070)
- Réactifs ZYM A (Réf. 70 494) + ZYM B (Réf. 70 493)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) ou DENSIMAT (Réf. 99 234)

Matériel :

- Pipettes ou PSIpettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Système destiné à la recherche d'activités enzymatiques seulement. Ne pas utiliser pour le diagnostic.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Dernière édition" ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, ...
- Il est recommandé de réaliser un contrôle qualité avant d'utiliser chaque nouvelle ampoule de réactif ZYM B.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Diluer l'échantillon dans un volume minimum de 2 ml d'eau distillée ou de milieu aqueux **non-tamponné** (par exemple sérum physiologique).

• Pour les microorganismes :

Préparer une suspension de densité optique déterminée (**5-6 de McFarland**) dans API Suspension Medium (2 ml) (ouvrir l'ampoule comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit), de l'eau distillée ou du milieu isotonique à partir d'un prélèvement sur gélose d'une culture pure ou d'un culot de centrifugation pour une culture en milieu liquide. Il importe pour obtenir des résultats reproductibles, que les souches à comparer soient préalablement cultivées sur un même milieu, que les suspensions soient faites dans le même liquide et qu'elles aient la même densité optique. Cette technique peut permettre de mettre en évidence les enzymes inductibles pouvant être détectés en ajoutant au milieu de culture le ou les inducteurs correspondants.

• Pour les autres échantillons (suspensions cellulaires, tissus, liquides biologiques, ...) :

Se référer aux données de la littérature ou développer sa propre méthodologie.

Pour toute application, l'utilisateur est seul habilité à déterminer l'intérêt d'utiliser API ZYM, les conditions opératoires et l'interprétation des résultats.

MODE OPERATOIRE

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de l'échantillon sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Inoculation de la galerie

- Répartir à la pipette ou à la PSlpette l'échantillon préparé à raison de 65 µl par cupule.
- Placer le couvercle sur la boîte et incubé en général pendant 4 H - 4 H 30 à 37°C (température optimum). Les conditions de durée et de température peuvent varier selon les échantillons à tester mais doivent être tenues identiques dans le cadre d'un travail donné.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

Après incubation :

- Ajouter 1 goutte de réactif ZYM A et 1 goutte de réactif ZYM B (*) dans chaque cupule.

Le fait de mettre dans la cupule un agent tensioactif (réactif ZYM A) permet de faciliter la solubilisation du réactif ZYM B dans le milieu.

(*) **Il est recommandé de contrôler** chaque ampoule de réactif ZYM B avant la 1^{ère} utilisation.

Pour cela, il est recommandé d'utiliser **l'enzyme β-glucosidase Sigma G0395** ou **la souche ATCC® 27853** mentionnée au paragraphe Contrôle Qualité afin d'exclure tout réactif défectueux.

- Laisser les colorations se développer pendant 5 minutes au minimum.
- Puis, si possible, exposer la galerie une dizaine de secondes au rayonnement d'une lampe très puissante (1000 W) placée à une distance de 10 cm environ au-dessus des cupules. Cette opération a pour but d'éliminer le fond jaune dû à l'excès de Fast Blue BB qui n'a pas réagi et de rendre ainsi les réactions négatives incolores. Une exposition prolongée à la lumière solaire produit le même effet.

Enregistrement des résultats

Effectuer la lecture et noter toutes les réactions sur la fiche de résultats : la note 0 correspond à une réaction négative, la note 5 à une réaction d'intensité maximum, les réactions intermédiaires étant notées 1, 2, 3 ou 4, selon leur intensité (3, 4 et 5 étant considérées comme positives).

Les colorations restent stables plusieurs heures en solution. Après 24 heures, des colorations parasites peuvent apparaître.

CONTROLE DE QUALITE

Pour toute application, nous conseillons vivement, avant utilisation, de réaliser un contrôle de qualité API ZYM, adapté au prélèvement analysé et à la méthodologie adoptée.

Les milieux de suspension, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Le contrôle de qualité API ZYM est réalisé à partir de souches bactériennes ou d'enzymes purifiées comme celles indiquées dans le tableau ci-après :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Profil obtenu après culture de 18-24 H sur gélose trypticase soja. Inoculum ajusté entre 5 et 6 McF avec DENSIMAT).
2. β-glucosidase Sigma G0395 (Profil obtenu à partir d'une concentration à 0,2 g/l).
3. α-chymotrypsine Sigma C4129 (Profil obtenu à partir d'une concentration à 1 g/l).

- Lecture et interprétation 7-10 minutes après addition des réactifs.

* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITES DU TEST

- API ZYM ne doit pas être considéré comme un produit d'identification.
- API ZYM est un produit de recherche et n'est pas destiné à rendre des résultats d'analyses biologiques pour des patients.
- Toutes les applications autres que celles faisant l'objet du contrôle de qualité chez bioMérieux, sont placées sous la responsabilité de l'utilisateur, qui détermine dans ce cas les conditions opératoires, le mode d'interprétation et l'utilisation des résultats des tests.
- bioMérieux décline toute responsabilité concernant l'utilisation de résultats obtenus avec API ZYM.

ELIMINATION DES DECHETS

Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.

Éliminer les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

N°	ENZYME RECHERCHEE	SUBSTRAT	pH	REACTION	
				POSITIVE	NEGATIVE
1	Témoin			Incolore ou couleur de l'échantillon si celui-ci a une coloration importante	
2	Phosphatase alcaline	2-naphtyl phosphate	8,5	Violet	Incolore ou Jaune très pâle *
3	Estérase (C 4)	2-naphtyl butyrate	6,5	Violet	
4	Estérase Lipase (C 8)	2-naphtyl caprylate	7,5	Violet	
5	Lipase (C 14)	2-naphtyl myristate	"	Violet	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamide	"	Orange	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphtylamide	"	Orange	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamide	"	Orange	
9	Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	8,5	Orange	
10	α -chymotrypsine	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide	7,5	Orange	
11	Phosphatase acide	2-naphtyl phosphate	5,4	Violet	
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphate	"	Bleu	
13	α -galactosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	"	Violet	
14	β -galactosidase	2-naphtyl- β D-galactopyranoside	"	Violet	
15	β -glucuronidase	Naphtol-AS-BI- β D-glucuronide	"	Bleu	
16	α -glucosidase	2-naphtyl- α D-glucopyranoside	"	Violet	
17	β -glucosidase	6-Br-2-naphtyl- β D-glucopyranoside	"	Violet	
18	N-acétyl- β -glucosaminidase	1-naphtyl-N-acétyl- β D-glucosaminide	"	Marron	
19	α -mannosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranoside	"	Violet	
20	α -fucosidase	2-naphtyl- α L-fucopyranoside	"	Violet	

* Incolore ou de la couleur du témoin si la galerie a été exposée à une source lumineuse intense après l'addition des réactifs ; si cette opération n'a pas pu être réalisée, obtention d'une couleur jaune très pâle.

BIBLIOGRAPHIE	p. I
TABLE DES SYMBOLES	p. II

bioMérieux, le logo bleu et API sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.

Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



bioMérieux SA
 au capital de 12 029 370 €
 RCS LYON 673 620 399
 69280 Marcy-l'Etoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France



System for the research of enzymatic activity

SUMMARY AND EXPLANATION

API ZYM is a semi-quantitative micromethod designed for the research of enzymatic activities. The technique is applicable to all specimens (microorganisms, cell suspensions, tissues, biological fluids, etc.). It allows the systematic and rapid study of 19 enzymatic reactions using very small sample quantities. The system consists of a strip with 20 microwells (cupules), the base of which contains the enzymatic substrate and its buffer. This base allows contact between the enzyme and the generally insoluble substrate.

API ZYM has not been developed in view of achieving the precision of spectrophotometric or electrophoretic procedures but has mainly been developed to permit the detection of enzymatic activities in a complex sample which has not been purified. It can be used to screen specimens, thus providing a spectrum of enzymatic determinations which can be further tested by spectrophotometric and/or electrophoretic procedures.

PRINCIPLE

The API ZYM strip is composed of 20 cupules, specially designed for the study of enzymatic reactions. The base of the strip, containing synthetic substrates, is made of non-woven fibers. This base allows enzymatic reactions to take place, even if the substrates are insoluble.

The enzymatic tests are inoculated with a dense suspension of organisms, which is used to rehydrate the enzymatic substrates. The metabolic end products produced during the incubation period are detected through colored reactions revealed by the addition of reagents.

The reactions are read according to the Reading Table.

CONTENT OF THE KIT (Kit for 25 tests) :

- 25 API ZYM strips
- 25 incubation boxes
- 25 result sheets
- 1 package insert

COMPOSITION OF THE STRIP

The composition of the API ZYM strip is given in the Reading Table of this package insert.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Reagents :

- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700) or API NaCl 0.85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- ZYM A Reagent (Ref. 70 494) and ZYM B Reagent (Ref. 70 493)
- McFarland Standard (ref. 70 900) or DENSIMAT (ref. 99 234)

Material :

- Pipettes or PSIPettes
- Ampule rack
- Ampule protector
- General microbiology laboratory equipment

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **This system is designed for the research of enzymatic activity only. Not for use in diagnostic procedures.**
- **For professional use only.**
- All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from; Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Current revision*". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Latest edition", or to the regulations currently in use in each country.
- Do not use reagents past the expiry date.
- Before use, check that the packaging of the various components is intact.
- Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, etc.
- It is recommended to perform a quality control test when a new ampule of ZYM B reagent is opened.

STORAGE CONDITIONS

The strips should be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the packaging.

SPECIMEN PREPARATION

Dilute the specimen in a minimum volume of 2 ml of distilled water or in another diluter such as normal saline **without any buffer**.

• For microorganisms :

Prepare a suspension with a turbidity of 5-6 McFarland in API Suspension Medium (2 ml) (open the ampule as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for this medium), distilled water or an isotonic medium. Pure growth from an agar slant or sediment from a centrifuged broth culture can be used to prepare the suspension. In order to obtain reproducible results, it is important that the microorganisms to be compared be initially grown on the same isolation medium, the diluter be the same and the suspension be of the same optical density. This technique assays for constitutive enzymes. Inductive enzymes can be detected by adding the corresponding inducer(s) to the culture medium.

• For other specimens (cell suspensions, tissues, biological fluids, ...) :

Refer to literature or develop a specific procedure.

Based on the applications, the user must determine what test conditions are appropriate and how to interpret the results of API ZYM.

INSTRUCTIONS FOR USE

Preparation of the strip

- Prepare an incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g. Cl₂, CO₂, etc.)] into the honey-combed wells of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the sample reference on the elongated flap of the tray. (Do not record the reference on the lid as it may be misplaced during the procedure).
- Remove the strip from its individual packaging.
- Place the strip in the incubation box.

Inoculation of the strip

- Using a pipette or PSlpette, dispense 65 µl of specimen into each cupule.
- After inoculation, place the plastic lid on the tray and incubate generally for 4 - 4 ½ hours at 37°C (optimum temperature). The time of incubation and temperature may vary depending on the sample to be tested. However, when samples are being compared, all test conditions (time, temperature, growth media, density of suspension) must be the same. The inoculated strip should not be placed in bright light.

READING AND INTERPRETATION

Reading the strip

After incubation :

- Add 1 drop of ZYM A reagent and 1 drop of ZYM B reagent (*) to each cupule.

By placing a surface-active agent (ZYM A reagent) in the cupule, solubilization of the ZYM B reagent in the medium is facilitated.

(*) **It is recommended to control** each ampule of ZYM B before using for the first time.

To do this, it is recommended to use **the enzyme β-glucosidase Sigma G0395 or the strain ATCC® 27853** indicated in the Quality Control paragraph in order to eliminate any defective reagents.

- Let the color develop for at least 5 minutes.
- If possible, put the strip under a powerful light source (1000 W bulb) for about 10 seconds with the bulb placed about 10 cm (4") above the cupules. The procedure will eliminate any yellow color which may appear in the cupules due to any excess of Fast Blue BB which has not reacted. After light exposure, negative reactions become colorless. Placing the strip in daylight for a few minutes will produce comparable results.

Recording the reactions

Read the reactions and record the results on the result sheet. A value ranging from 0-5 can be assigned, corresponding to the colors developed : 0 corresponds to a negative reaction, 5 to a reaction of maximum intensity and values 1, 2, 3 or 4 are intermediate reactions depending on the level of intensity (3, 4 or 5 being considered as positive reactions).

The colors remain stable for several hours after the strip has been inoculated with the reagents. After 24 hours, colors may deteriorate, interfering with test interpretation.

QUALITY CONTROL

For all applications, we strongly recommend that quality control be performed, prior to using API ZYM, which is adapted to the specimen analyzed and the procedure adopted.

The suspension media, strips and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. The API ZYM quality control is performed using bacterial strains or purified enzymes, such as those indicated in the table below :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Profile obtained after 18-24 hr. culture on tryptic soy agar. Inoculum adjusted to between 5 and 6 McF using DENSIMAT).
2. β-glucosidase Sigma G0395 (Profile obtained using a concentration of 0.2 g/l).
3. α-chymotrypsin Sigma C4129 (Profile obtained using a concentration of 1 g/l).

- Reading and interpretation 7-10 minutes after addition of the reagents.

* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITATIONS OF THE METHOD

- API ZYM should not be considered as an identification product.
- API ZYM is a research product and is not designed to produce biological analysis results for patients.
- All applications, other than those which have been quality controlled by bioMérieux, are under the responsibility of the user. We recommend that you follow your institution's internal policies and procedures to verify and validate the methodology and accuracy of API ZYM.
- bioMérieux refuses to accept any responsibility concerning the use of results obtained with API ZYM.

WASTE DISPOSAL

Unused reagents may be considered as non hazardous waste and disposed of accordingly.

Dispose of used reagents as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products.

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABILITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

READING TABLE

No.	ENZYME ASSAYED FOR	SUBSTRATE	pH	RESULT	
				POSITIVE	NEGATIVE
1	Control			Colorless or color of the sample if it has an intense coloration	
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	8.5	Violet	Colorless or Very pale yellow *
3	Esterase (C 4)	2-naphthyl butyrate	6.5	Violet	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naphthyl caprylate	7.5	Violet	
5	Lipase (C 14)	2-naphthyl myristate	"	Violet	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	"	Orange	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	"	Orange	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	"	Orange	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	8.5	Orange	
10	α -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	7.5	Orange	
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	5.4	Violet	
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	"	Blue	
13	α -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- α D-galactopyranoside	"	Violet	
14	β -galactosidase	2-naphthyl- β D-galactopyranoside	"	Violet	
15	β -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- β D-glucuronide	"	Blue	
16	α -glucosidase	2-naphthyl- α D-glucopyranoside	"	Violet	
17	β -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- β D-glucopyranoside	"	Violet	
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- β D-glucosaminide	"	Brown	
19	α -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- α D-mannopyranoside	"	Violet	
20	α -fucosidase	2-naphthyl- α L-fucopyranoside	"	Violet	

* Colorless or color of the control if the strip has been exposed to an intense light source after addition of the reagents ; if the strip has not been exposed to intense light, a very pale yellow color is obtained.

BIBLIOGRAPHY p. I
INDEX OF SYMBOLS p. II

bioMérieux, the blue logo and API are used, pending and/or registered trademarks belonging to bioMérieux SA or one of its subsidiaries. ATCC is a trademark belonging to American Type Culture Collection. Any other name or trademark is the property of its respective owner.



bioMérieux SA
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Printed in France



System zum Nachweis von Enzymaktivitäten

EINFÜHRUNG UND TESTERKLÄRUNG

API ZYM ist eine Mikromethode zum halbquantitativen Nachweis von Enzymaktivitäten. Das System eignet sich für verschiedene Materialien (Mikroorganismen, Zellsuspensionen, Gewebe, biologische Flüssigkeiten usw.). Es erlaubt den schnellen und gleichzeitigen Nachweis von 19 Enzymen in sehr geringen Probenmengen. API ZYM ist ein Streifen mit 20 Mikroküvetten (Becher), deren Boden aus einem Träger besteht, der das Enzymsubstrat mit dem Puffer enthält. Dieser Träger begünstigt den Kontakt zwischen den Enzymen und den im allgemeinen unlöslichen Substraten.

Mit API ZYM System können Enzymaktivitäten eines komplexen, nicht gereinigten Extraktes nachgewiesen werden, wobei jedoch nicht die Präzision photometrischer Messmethoden erreicht werden soll. API ZYM ist kein Ersatz für elektrophoretische Trennverfahren. API ZYM dient vielmehr zur orientierenden Diagnostik von Untersuchungsmaterialien auf das vorhandene Spektrum an Enzymaktivitäten.

PRINZIP

Der API ZYM Streifen besteht aus 20 Bechern, die speziell für den Nachweis von Enzymreaktionen konzipiert sind. Der Boden des Streifens ist ein nicht-verwobenes Faserteil, auf dem sich die synthetischen Substrate befinden. Dieser Träger fördert die Enzymreaktionen, selbst wenn die Substrate nicht löslich sind.

Die enzymatischen Tests werden mit einer dichten Suspension beimpft, welche die Substrate löst. Die während der Inkubationszeit entstehenden Reaktionen werden durch Farbumschläge nach der Reagenzzugabe sichtbar gemacht.

Die Ablesung dieser Reaktionen erfolgt mit der Ablesetabelle.

PACKUNGSGRÖSSE (25 Tests):

- 25 API ZYM Streifen
- 25 Inkubationswannen
- 25 Ergebnisblätter
- 1 Arbeitsanleitung

ZUSAMMENSETZUNG DES STREIFENS

Die Zusammensetzung des API ZYM Streifens finden Sie in der Ablesetabelle dieser Arbeitsanleitung.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Reagenzien:

- API Suspension Medium, 2 ml (Best.Nr. 70 700) oder API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Best.Nr. 20 070)
- ZYM A Reagenz (Best.Nr. 70 494) und ZYM B Reagenz (Best.Nr. 70 493)
- McFarland Standard (Best.Nr. 70 900) oder DENSIMAT (Best.Nr. 99 234)

Materialien:

- Pipetten oder PSlpetten
- Ampullenständer
- Schutzhülle für Ampullen
- Allgemeine mikrobiologische Laborausrüstung

VORSICHTSMASSNAHMEN

- **Das System ist nur zum Nachweis von Enzymaktivitäten bestimmt. Nicht für die Diagnostik verwenden.**
- **Nur für die Verwendung durch Fachkundige bestimmt.**
- Die Proben, Mikroorganismen und beimpften Produkte müssen als potenziell infektiös betrachtet und unter Beachtung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen sachgemäß behandelt werden. Während der gesamten Testdurchführung müssen aseptische Arbeitsbedingungen und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen für die zu untersuchende Keimgruppe eingehalten werden, siehe „CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – aktuelle Revision“. Weitere diesbezügliche Informationen finden Sie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH – Letzte Ausgabe“ oder in den jeweils gültigen Richtlinien.
- Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Vergewissern Sie sich vor Gebrauch, dass die Verpackung der verschiedenen Bestandteile nicht beschädigt ist.
- Streifen mit äußeren Anzeichen einer Beschädigung (deformierte Vertiefungen ...) nicht verwenden.
- Es wird empfohlen, beim Öffnen einer neuen Ampulle ZYM B Reagenz einen Qualitätskontrolltest durchzuführen.

LAGERUNGSBEDINGUNGEN

Die Streifen sind bei 2-8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar.

VORBEREITUNG DER PROBEN

Die Probe in mindestens 2 ml Aqua dest. oder einem anderen wässrigen, **nicht gepufferten** Medium (z.B. physiologische Kochsalzlösung) verdünnen.

• Mikroorganismen:

Eine Suspension entsprechend Mc Farland Standard 5-6 im API Suspension Medium (2 ml) (öffnen Sie die Ampulle wie im Abschnitt „Vorsichtsmaßnahmen“ der Packungsbeilage des Produktes beschrieben), Aqua dest. oder isotonische NaCl herstellen. Es können sowohl Reinkulturen von festen Medien, als auch Zentrifugationssedimente von Flüssigkulturen verwendet werden. Um reproduzierbare Resultate zu erhalten, müssen die zu vergleichenden Keime vom selben Kulturmedium entnommen werden, im gleichen Flüssigmedium suspendiert werden und die dieselbe optische Dichte aufweisen. Mit dieser Technik können induzierbare Enzyme nachgewiesen werden, indem man dem Kulturmedium das oder die entsprechenden Induktionsmittel zusetzt.

• Andere Proben (Zellsuspensionen, Gewebe, biologische Flüssigkeiten ...):

Gemäß den Angaben in der Literatur oder gemäß einem laborintern entwickelten Verfahren.

In jedem Fall obliegt es allein dem Anwender, über den Nutzen einer API ZYM Testung, die Arbeitsbedingungen und die Interpretation der Ergebnisse zu entscheiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung des Streifens

- Eine Inkubationswanne mit Deckel bereitstellen und zur Herstellung einer feuchten Kammer ca. 5 ml destilliertes oder demineralisiertes Wasser [oder anderes Wasser ohne Zusätze bzw. Derivate, die Gase freisetzen können (z.B. Cl₂, CO₂...)] in die Wanne geben.
- Die Referenznummer der Probe auf dem dafür vorgesehenen seitlichen Abschnitt der Inkubationswanne notieren (Die Referenznummer nicht auf den Deckel schreiben, da er während des Arbeitsablaufes verwechselt werden oder abhanden kommen kann).
- Nehmen Sie den Streifen aus der Verpackung.
- Legen Sie den Streifen in die Inkubationswanne.

Beimpfung des Streifens

- Mit einer Pipette oder PSIPette 65 µl des Untersuchungsmaterials in jeden Becher pipettieren.
- Nach dem Beimpfen den Deckel auf die Wanne legen und den Streifen in der Regel 4 h bis 4 h 30 bei 37°C (Optimaltemperatur) inkubieren. Die Inkubationszeit und -temperatur kann je nach Probe variieren, sie sollten aber bei vergleichenden Untersuchungen identisch sein.

ABLESUNG UND INTERPRETATION

Ablesung des Streifens

Nach der Inkubation:

- 1 Tropfen ZYM A Reagenz und 1 Tropfen ZYM B Reagenz (*) in jeden Becher geben. Durch Zugabe eines Oberflächenaktivators (ZYM A Reagenz) wird die Auflösung des ZYM B Reagenz vereinfacht.

(*) **Es ist empfehlenswert**, jede Reagenzienampulle ZYM B vor dem ersten Gebrauch **zu kontrollieren**.

Dazu wird die Verwendung von **Enzym β-Glucosidase Sigma G0395** oder **ATCC® Stamm 27853** empfohlen, wie im Abschnitt Qualitätskontrolle beschrieben, um jegliche unbrauchbare Reagenzien auszuschließen.

- Mindestens 5 min zur Farbentwicklung stehen lassen.
- Danach den Streifen wenn möglich ca. 10 sec in einem Abstand von 10 cm unter eine sehr starke Lichtquelle (1000 W) halten, so dass das überschüssige Fast Blue BB Reagenz entfärbt wird und die negativen Reaktionen farblos werden. Sonnenlicht hat nach längerer Zeit dieselbe Wirkung.

Beurteilung der Reaktionen

Die Reaktionen ablesen und auf dem Ergebnisblatt protokollieren: der Wert 0 entspricht einer negativen Reaktion, der Wert 5 einer Reaktion mit maximaler Intensität, die dazwischen liegenden Reaktionen werden je nach Intensität mit 1, 2, 3 oder 4 bewertet (3, 4 und 5 werden als positive Reaktionen bewertet).

Die Farben bleiben mehrere Stunden stabil. Nach 24 h können Farbänderungen eintreten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Für jede Anwendung empfehlen wir vor Gebrauch unbedingt eine API ZYM Qualitätskontrolle für den jeweiligen Probentyp und die angewandte Methodik durchzuführen.

Die Suspensionsmedien, Streifen und Reagenzien unterliegen in den verschiedenen Stadien der Produktion systematisch durchgeführten Qualitätskontrollen. Die Qualitätskontrolle von API ZYM wird mit Bakterienstämmen oder gereinigten Enzymen durchgeführt, wie in folgender Tabelle angegeben:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Profil nach 18-24 h auf Trypcase-Soja Agar. Inokulum mit DENSIMAT auf 5 und 6 McF eingestellt.)
 1. β-Glucosidase Sigma G0395 (Profil ausgehend von einer Konzentration von 0,2 g/l.)
 2. α-Chymotrypsin Sigma C4129 (Profil ausgehend von einer Konzentration von 1 g/l.)

- Ablesung und Interpretation 7-10 min nach Reagenzzugabe.

* ATCC: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITIERUNGEN

- API ZYM darf nicht als Identifikationssystem verwendet werden.
- API ZYM ist für Forschungszwecke und dient nicht zur Weitergabe von Ergebnissen biologischer Analysen an Patienten.
- Alle anderen Anwendungen als die, die Gegenstand der Qualitätskontrolle bei bioMérieux sind, unterliegen der Verantwortung des Anwenders, der in diesem Fall über die Arbeitsbedingungen, die Interpretation und die Verwendung der Testergebnisse bestimmt.
- bioMérieux lehnt jede Verantwortung bezüglich der Verwendung der mit API ZYM ermittelten Ergebnisse ab.

BESEITIGUNG DER ABFÄLLE

Nicht gebrauchte Reagenzien können als ungefährliche Abfälle entsorgt werden.

Entsorgen Sie alle gebrauchten und nicht gebrauchten Reagenzien sowie kontaminierte Einwegmaterialien gemäß den für infektiöse oder potenziell infektiöse Materialien geltenden Bestimmungen.

Es liegt in der Verantwortung jedes Labors, die entstandenen Fest- und Flüssigabfälle gemäß der jeweiligen Risikogruppe zu behandeln und deren Entsorgung in Übereinstimmung mit den gültigen gesetzlichen Bestimmungen sicherzustellen.

ABLESETABELLE

N°	ENZYMNACHWEIS	SUBSTRAT	pH	REAKTION	
				POSITIV	NEGATIV
1	Kontrolle			farblos oder Farbe der Probe bei starker Färbung	
2	Alkalische Phosphatase	2-Naphtylphosphat	8,5	violett	farblos oder sehr helles gelb*
3	Esterase (C 4)	2-Naphtylbutyrat	6,5	violett	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-Naphtylcaprylat	7,5	violett	
5	Lipase (C 14)	2-Naphtylmyristat	"	violett	
6	Leucin Arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamid	"	orange	
7	Valin Arylamidase	L-valyl-2-naphtylamid	"	orange	
8	Cystin Arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamid	"	orange	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginin-2-naphtylamid	8,5	orange	
10	α-Chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanin-2-naphtylamid	7,5	orange	
11	Saure Phosphatase	2-Naphtylphosphat	5,4	violett	
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphat	"	blau	
13	α-Galactosidase	6-Br-2-naphtyl-αD-Galactopyranosid	"	violett	
14	β-Galactosidase	2-Naphtyl-βD-Galactopyranosid	"	violett	
15	β-Glucuronidase	Naphtol-AS-BI-βD-Glucuronid	"	blau	
16	α-Glucosidase	2-Naphtyl-αD-Glucopyranosid	"	violett	
17	β-Glucosidase	6-Br-2-naphtyl-βD-Glucopyranosid	"	violett	
18	N-acetyl-β-Glucosaminidase	1-Naphtyl-N-acetyl-βD-Glucosaminid	"	braun	
19	α-Mannosidase	6-Br-2-naphtyl-αD-mannopyranosid	"	violett	
20	α-Fucosidase	2-Naphtyl-αL-fucopyranosid	"	violett	

* Farblos oder Farbe der Kontrolle, wenn der Streifen nach der Reagenzzugabe einer starken Lichtquelle ausgesetzt wurde; wenn keine Lichtquelle benutzt wurde, bleibt eine sehr helle gelbe Färbung erhalten.

LITERATUR
SYMBOLE

S. I
S. II

bioMérieux, das blaue Logo und API sind verwendete, angemeldete und/oder eingetragene Marken von bioMérieux SA oder einer ihrer Niederlassungen.

ATCC ist eine Marke von American Type Culture Collection.

Alle anderen Marken und Produktnamen sind das Eigentum ihrer jeweiligen Besitzer.



 **bioMérieux SA**
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Gedruckt in Frankreich



Sistema de investigación de actividades enzimáticas

INTRODUCCION Y OBJETIVO DE LA PRUEBA

El sistema API ZYM es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas aplicable a diferentes tipos de muestra (microorganismos, suspensiones celulares, tejidos, líquidos biológicos, etc.). Permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra. La galería consta de 20 microtubos (cúpulas) cuyo fondo está constituido por un soporte que contiene un sustrato enzimático con su tampón. Este soporte está destinado a favorecer el contacto entre el enzima y el sustrato generalmente insoluble.

El sistema API ZYM permite detectar actividades enzimáticas de un extracto complejo no purificado. Este método no sustituye a las técnicas de separación electroforética. Por contra, puede orientar el resultado, dando en su estado bruto, el espectro de actividades enzimáticas de la muestra.

PRINCIPIO

La galería API ZYM se compone de 20 cúpulas especialmente adaptadas al estudio de las reacciones enzimáticas. El fondo de la galería está constituido por una trama de fibras inerte donde están repartidos los sustratos semisintéticos. Este soporte favorece las reacciones enzimáticas al mismo tiempo que los sustratos enzimáticos son insolubles.

Los tests enzimáticos se inoculan con una suspensión densa, que rehidrata los sustratos. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color que se revelan mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se realiza con la ayuda de la Tabla de Lectura.

PRESENTACION (Equipo de 25 pruebas) :

- 25 galerías API ZYM
- 25 cámaras de incubación
- 25 hojas de resultados
- 1 ficha técnica

COMPOSICION DE LA GALERIA

La composición de la galería API ZYM está indicada en la tabla de lectura de esta ficha técnica.

REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Reactivos:

- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700) o API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- Reactivos ZYM A (Ref. 70 494) + ZYM B (Ref. 70 493)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) o DENSIMAT (Ref. 99 234)

Material:

- Pipetas o PSlpettes
- Gradilla porta ampollas
- Protege-ampollas
- Equipamiento general de laboratorio de bacteriología

PRECAUCIONES DE UTILIZACION

- **Sistema destinado únicamente a la investigación de las actividades enzimáticas. No utilizar para el diagnóstico.**
- **Para uso profesional únicamente.**
- Las muestras, cultivos bacterianos y productos inoculados deben ser considerados como potencialmente infecciosos y deben ser manipulados de forma apropiada. Las técnicas asépticas y las precauciones usuales de manipulación para el grupo bacteriano estudiado deben ser respetadas a lo largo de toda la manipulación; consultar en CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Revisión en vigor". Para información complementaria sobre las precauciones de manipulación, consultar en "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Última edición" o en la reglamentación en vigor en los países de utilización.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Antes de utilizar, comprobar la integridad del envase de los diferentes componentes.
- No utilizar galerías que hayan sufrido una alteración física: cúpulas deformadas,...
- Se recomienda realizar un control de calidad antes de utilizar cada nueva ampolla de reactivo ZYM B.

CONDICIONES DE CONSERVACION

Las galerías se conservan a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Diluir la muestra en un volumen mínimo de 2 ml de agua destilada o medio acuoso **no tamponado** (por ejemplo suero fisiológico).

• Para los microorganismos:

Preparar una suspensión a una densidad óptica determinada (**5-6 de McFarland**) en API Suspension Medium (2 ml) (abrir la ampolla como se indica en el apartado "Precauciones de utilización" de la ficha técnica del producto), agua destilada o medio isotónico a partir de una muestra en cultivo puro en medio sólido o un sedimento de centrifugación. Es importante para obtener resultados reproducibles, que las cepas a comparar sean cultivadas en el mismo medio, que las suspensiones sean hechas en el mismo líquido y que tengan la misma densidad óptica. Esta técnica puede permitir detectar enzimas inducibles añadiendo al medio de cultivo el o los inductores correspondientes.

• Para otros tipos de muestra (suspensiones celulares, tejidos, líquidos biológicos, ...):

Dirigirse a los datos obtenidos de la literatura o desarrollar su propia metodología.

Para toda aplicación, el utilizador es el único habilitado para determinar el interés de utilizar API ZYM, las condiciones de trabajo y la interpretación de los resultados.

TECNICA

Preparación de la galería

- Coger una cámara de incubación (fondo y tapa) y repartir 5 ml aproximadamente de agua destilada o desmineralizada [o toda agua sin aditivos o derivados susceptibles de liberar gas (Ej: Cl₂, CO₂...)] en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
- Escribir la referencia de la muestra en la lengüeta lateral de la cámara. (No escribir la referencia sobre la tapa, ésta puede desplazarse durante la manipulación).
- Sacar la galería de su envase individual.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

Inoculación de la galería

- Repartir con la pipeta o la PSipette la muestra preparada a razón de 65 µl por cúpula.
- Colocar la tapa en la placa e incubar en general durante 4 H - 4 H 30 a 37°C (temperatura óptima). Las condiciones de tiempo y temperatura varían según las muestras a probar, pero deben ser las mismas en un determinado contexto de trabajo.

LECTURA E INTERPRETACION

Lectura de la galería

Después de la incubación:

- Añadir 1 gota de reactivo ZYM A y 1 gota de reactivo ZYM B (*) en cada cúpula.

El hecho de poner en cada cúpula un agente tensoactivo (reactivo ZYM A) permite facilitar la solubilización del reactivo ZYM B en el medio.

(*) **Se recomienda controlar** cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la 1ª utilización.

Para esto, se recomienda utilizar la **enzima β-glucosidasa Sigma G0395** o la **cepa ATCC® 27853** mencionada en el párrafo Control de Calidad con el fin de excluir todo reactivo defectuoso.

- Dejar que se desarrolle el color durante 5 minutos mínimo.
- Después si es posible exponer la galería 10 segundos a la radiación de una lámpara de 1000 W a una distancia de 10 cm aproximadamente encima de las cúpulas. Esta operación tiene por objeto eliminar el fondo amarillo debido al exceso de Fast Blue BB que no ha reaccionado y da reacciones negativas incoloras. Una exposición prolongada a la luz solar produce el mismo efecto.

Registro de resultados

Efectuar la lectura y anotar todas las reacciones en la hoja de resultados: el valor 0 corresponde a una reacción negativa, el valor 5 a una reacción de intensidad de color, las reacciones intermedias se anotan como 1, 2, 3 ó 4, según su intensidad (3, 4 y 5 siendo consideradas como positivas).

Las coloraciones son estables varias horas en solución. Después de 24 horas, pueden aparecer coloraciones parásitas.

CONTROL DE CALIDAD

Para toda aplicación, aconsejamos realizar un control de calidad API ZYM, adaptado a la muestra analizada y a la metodología adoptada.

Los medios de suspensión, galerías y reactivos son objeto de controles de calidad sistemáticos en las diferentes etapas de su fabricación. El control de calidad API ZYM se realiza a partir de cepas bacterianas o de enzimas purificadas como las que se indican en la tabla siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Perfil obtenido después de un cultivo de 18-24 H en trypticase soja. Inóculo ajustado entre 5 y 6 McF con DENSIMAT).
2. β-glucosidasa Sigma G0395 (Perfil obtenido a partir de una concentración a 0,2 g/l).
3. α-quimotripsina Sigma C4129 (Perfil obtenido a partir de una concentración a 1 g/l).

- Lectura e interpretación 7-10 minutos después de la adición de reactivos.

* ATCC: American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITES DE LA PRUEBA

- API ZYM no debe considerarse como un producto de identificación.
- API ZYM es un producto de investigación y no está destinado a dar resultados de análisis biológicos de pacientes.
- Toda aplicación distinta a la que bioMérieux describe es responsabilidad del utilizador, que determina en cada caso las condiciones de utilización, el modo de interpretación y la utilización de los resultados de los tests.
- bioMérieux declina toda responsabilidad concerniente a la utilización de los resultados obtenidos con API ZYM.

ELIMINACION DE RESIDUOS

Los reactivos no utilizados pueden ser eliminados como residuos no peligrosos.

Eliminar los reactivos utilizados, así como los materiales de un solo uso contaminados siguiendo los procedimientos relacionados con los productos infecciosos o potencialmente infecciosos.

Es responsabilidad de cada laboratorio gestionar los residuos y los efluentes que produce según su naturaleza y su peligrosidad, y garantizar (o hacer garantizar) el tratamiento y eliminación según las reglamentaciones aplicables.

TABLA DE LECTURA

N°	ENZIMA ESTUDIADA	SUBSTRATO	pH	REACCION	
				POSITIVA	NEGATIVA
1	Control			Incolora o color de la muestra según importancia de la coloración	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	Incolora o amarillo muy pálido *
3	Esterasa(C 4)	2-naftil butirato	6,5	Violeta	
4	Esterasa Lipasa (C 8)	2-naftil caprilato	7,5	Violeta	
5	Lipasa(C 14)	2-naftil miristato	"	Violeta	
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamina	"	Naranja	
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	"	Naranja	
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	"	Naranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	Naranja	
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5	Naranja	
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	"	Azul	
13	α -galactosidasa	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosido	"	Violeta	
14	β -galactosidasa	2-naftil- β D-galactopiranosido	"	Violeta	
15	β -glucuronidasa	Naftol-AS-BI- β D-glucuronido	"	Azul	
16	α -glucosidasa	2-naftil- α D-glucopiranosido	"	Violeta	
17	β -glucosidasa	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosido	"	Violeta	
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminido	"	Marrón	
19	α -mannosidasa	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosido	"	Violeta	
20	α -fucosidasa	2-naftil- α L-fucopiranosido	"	Violeta	

* Incoloro o del color del control si la galería está expuesta a una fuente luminosa intensa después de la adición de reactivos; si esta operación no ha podido ser realizada, obtención de un color amarillo muy pálido.

BIBLIOGRAFIA
TABLAS DE SIMBOLOS

p. I
p. II

bioMérieux, el logo azul, API son marcas utilizadas, depositadas y/o registradas pertenecen a bioMérieux SA o a algunas de sus filiales. ATCC es una marca perteneciente a American Type Culture Collection.

Las otras marcas y nombres de productos mencionados en este documento son marcas comerciales de sus fabricantes respectivos.



 **bioMérieux SA**
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Impreso en Francia



Sistema di ricerca di attività enzimatiche

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

Il sistema API ZYM è un micrometodo semi-quantitativo per la ricerca di attività enzimatiche applicabile a differenti tipologie di campioni (microrganismi, sospensioni cellulari, tessuti, liquidi biologici, ecc.). Permette di studiare in modo rapido e simultaneo 19 diverse attività enzimatiche utilizzando piccolissime quantità di campione. La presentazione del sistema è sotto forma di gallerie da 20 microcuvette (cupole), il cui fondo è costituito da un supporto contenente il substrato enzimatico con il relativo tampone. Questo supporto è stato realizzato per favorire il contatto tra l'enzima e il substrato, generalmente insolubile.

Il sistema API ZYM permette di rilevare le attività enzimatiche di un estratto complesso non purificato ma non è stato concepito per verificare la precisione dei dosaggi spettrofotometrici per ciascun enzima. Analogamente, il sistema non vuole essere alternativo alle tecniche di separazione elettroforetica, ma può essere utilizzato come strumento di orientamento tramite la determinazione preliminare dello spettro di attività enzimatica del campione in esame.

PRINCIPIO

La galleria API ZYM è costituita di 20 cupole espressamente finalizzate allo studio delle reazioni enzimatiche. Il fondo di ciascuna cupola è costituito da una trama di fibre non-tessute, all'interno della quale è distribuito il substrato sintetico. Questo tipo di supporto favorisce le reazioni enzimatiche anche in presenza di substrati insolubili.

I test enzimatici vengono inoculati in sospensioni dense, che reidratano i substrati. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione sono costituite da viraggi di colore che vengono rivelati tramite l'aggiunta di reattivi. La lettura di queste reazioni viene effettuata tramite la Tabella di Lettura.

PRESENTAZIONE (Confezione da 25 test) :

- 25 gallerie API ZYM
- 25 vaschette di incubazione
- 25 schede per la registrazione dei risultati
- 1 scheda tecnica

COMPOSIZIONE DELLA GALLERIA

La composizione della galleria API ZYM è riportata nella Tabella di Lettura di questa scheda tecnica.

REATTIVI E MATERIALE NECESSARI MA NON FORNITI

Reattivi:

- API Suspension Medium, 2 ml (Cod. 70 700) o API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Cod. 20 070)
- Reattivi ZYM A (Cod. 70 494) + ZYM B (Cod. 70 493)
- McFarland Standard (Cod. 70 900) o DENSIMAT (Cod. 99 234)

Materiale:

- Pipette o PSIpette
- Porta- fiale
- Proteggi-fiala
- Equipaggiamento generico per laboratorio di batteriologia

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- **Sistema destinato unicamente alla ricerca di attività enzimatiche. Da non utilizzare a fini diagnostici.**
- **Esclusivamente per uso professionale.**
- I prelievi, le colture batteriche ed i prodotti seminati devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere manipolati in maniera appropriata da operatori competenti e preparati. Le tecniche di asepsi e le precauzioni d'uso per il gruppo batterico studiato devono essere rispettate durante tutta la manipolazione; fare riferimento a "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Revisione in vigore". Per ulteriori informazioni sulle precauzioni di manipolazione, consultare "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Ultima edizione", oppure fare riferimento alla normativa vigente nel Paese.
- Non utilizzare reattivi dopo la data di scadenza.
- Prima dell'uso verificare l'integrità dell'imballaggio e dei componenti.
- Non usare gallerie che abbiano subito una alterazione fisica : cupole deformate, ...
- Prima di utilizzare una nuova fiala di reattivo ZYM B si raccomanda di eseguire un controllo di qualità.

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

Le gallerie si conservano a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Diluire il campione in un volume minimo di 2 ml di acqua distillata o di terreno acquoso **non tamponato** (ad esempio soluzione fisiologica).

• Per i microrganismi :

Preparare una sospensione di densità ottica determinata (punto 5-6 di McFarland) nell'API Suspension Medium (2 ml) (aprire la fiala come indicato nel paragrafo "Avvertenze e precauzioni" della scheda tecnica del prodotto) o in acqua distillata o in terreno isotonico partendo dal prelievo di una coltura pura in agar o, nel caso di una coltura in terreno liquido, dal sedimentato di centrifugazione. Al fine di ottenere risultati riproducibili, è importante che i ceppi da comparare siano preventivamente coltivati sullo stesso terreno, che le sospensioni vengano fatte nello stesso liquido ed abbiano la stessa densità ottica. Questa tecnica può permettere di mettere in evidenza gli enzimi inducibili che possono essere rivelati aggiungendo al terreno di coltura il o gli induttori corrispondenti.

• Per gli altri campioni (sospensioni cellulari, tessuti, liquidi biologici, ...) :

Far riferimento ai dati di letteratura o mettere a punto una propria metodologia.

Per ogni applicazione l'utilizzatore è il solo abilitato a determinare l'interesse di impiegare l'API ZYM, le condizioni di lavoro e l'interpretazione dei risultati.

PROCEDIMENTO

Preparazione della galleria

- Assemblare fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e distribuire negli alveoli circa 5 ml di acqua distillata o demineralizzata [o acqua senza additivi o derivati suscettibili di liberare gas (Ad es.: Cl₂, CO₂ ...)] per creare un'atmosfera umida.
- Trascrivere sulla linguetta laterale (e non sul coperchio, che potrebbe essere spostato nel corso della manipolazione) della vaschetta l'identificativo del campione.
- Estrarre la galleria dal proprio imballaggio individuale.
- Mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

Inoculo della galleria

- Con una pipetta od una PSIpette distribuire in ogni cupola 65 µl del campione preparato.
- Chiudere la vaschetta con il coperchio ed incubare generalmente per 4 ore - 4 ore e mezzo a 37°C (temperatura ottimale). La durata e la temperatura dell'incubazione possono variare a seconda dei campioni da esaminare, ma devono in ogni caso rimanere invariate nel quadro di una data ricerca.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Letture della galleria

Dopo l'incubazione :

- Aggiungere 1 goccia di reattivo ZYM A ed 1 goccia di reattivo ZYM B (*) in ogni cupola. Aggiungendo nella cupola un agente tensioattivo (reattivo ZYM A) si facilita la solubilizzazione nel terreno del reattivo ZYM B. (*) **Si raccomanda di controllare** ogni fiala di reattivo ZYM B prima della 1^a utilizzazione. Per fare ciò, onde eliminare ogni reattivo difettoso, si raccomanda di utilizzare l'enzima **β-glucosidasi Sigma G0395** o il ceppo **ATCC® 27853** menzionato nel paragrafo Controllo di Qualità.
- Lasciar sviluppare le colorazioni almeno per almeno 5 minuti.
- In una fase successiva esporre, se possibile, per una decina di secondi la galleria ai raggi di una lampada molto potente (1000 W) collocata a una distanza di circa 10 cm sopra le cupole. Scopo di questa operazione è quello di eliminare il fondo giallo dovuto all'eccesso di Fast Blue BB che non ha reagito e di rendere così incolori le reazioni negative. Lo stesso effetto è ottenibile anche con esposizione prolungata alla luce del sole.

Registrazione dei risultati

Effettuare la lettura e trascrivere tutte le reazioni sulla scheda dei risultati, attribuendo il valore 0 alle reazioni negative, il valore 5 alle reazioni di intensità massima ed i valori 1, 2, 3 e 4 alle reazioni intermedie a seconda delle rispettive intensità (3, 4 e 5 vanno considerati positivi).

Le colorazioni si mantengono stabili per parecchie ore in soluzione ma, dopo 24 ore, possono apparire delle colorazioni parassite.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Per ogni applicazione consigliamo vivamente, prima dell'uso, di eseguire un controllo di qualità API ZYM adatto al campione analizzato ed alla metodologia impiegata.

Il medium di sospensione, le gallerie ed i reattivi sono sottoposti a controlli di qualità sistematici nelle diverse fasi del ciclo produttivo. Il controllo di qualità API ZYM è eseguito utilizzando ceppi batterici o enzimi purificati come quelli indicati nella tabella seguente :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Profilo ottenuto dopo coltura di 18-24 ore su agar tripticasi soia. Inoculo aggiustato tra 5 e 6 McF con il DENSIMAT.)
2. β-glucosidasi Sigma G0395 (Profilo ottenuto partendo da una concentrazione di 0,2 g/l.)
3. α-chimotripsina Sigma C4129 (Profilo ottenuto partendo da una concentrazione di 1 g/l.)

- Lettura e interpretazione eseguite 7-10 minuti dopo l'aggiunta dei reattivi.

* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITI DEL METODO

- API ZYM non deve essere considerato un prodotto per l'identificazione.
- API ZYM è un prodotto di ricerca e non è destinato a fornire risultati diagnostici per pazienti.
- Tutte le applicazioni diverse da quelle che sono oggetto del controllo di qualità da parte di bioMérieux sono fatte sotto la responsabilità dell'utilizzatore che, in tali casi, determina il procedimento analitico, le modalità d'interpretazione e l'uso dei risultati dei test.
- bioMérieux declina ogni responsabilità concernente l'uso dei risultati ottenuti con API ZYM.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I reattivi non utilizzati possono essere smaltiti come rifiuti non pericolosi.

Smaltire i reattivi utilizzati ed i materiali monouso contaminati seguendo le procedure relative ai prodotti infettivi o potenzialmente infettivi.

E' responsabilità di ogni laboratorio gestire i rifiuti e gli effluenti prodotti a seconda della loro natura e della loro pericolosità ed assicurarne (o farne assicurare) il trattamento e lo smaltimento conformemente alla legislazione vigente.

TABELLA DI LETTURA

N°	ENZIMA RICERCATO	SUBSTRATO	pH	REAZIONE	
				POSITIVA	NEGATIVA
1	Controllo			Incolore o colore del campione se il campione è fortemente colorato	
2	fosfatasi alcalina	2-naftilfosfato	8,5	viola	Incolore o giallo molto chiaro *
3	esterasi (C 4)	2-naftilbutirrato	6,5	viola	
4	esterasi lipasi (C 8)	2-naftilcaprilato	7,5	viola	
5	lipasi (C 14)	2-naftilmiristato	"	viola	
6	leucina arilamidasi	L-leucil-2-naftilamide	"	arancio	
7	valina arilamidasi	L-valil-2-naftilamide	"	arancio	
8	cistina arilamidasi	L-cistil-2-naftilamide	"	arancio	
9	tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamide	8,5	arancio	
10	α -chimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamide	7,5	arancio	
11	fosfatasi acida	2-naftilfosfato	5,4	viola	
12	naftol-AS-BI-fosfoidrolasi	naftol-AS-BI-fosfato	"	blu	
13	α -galattosidasi	6-bromo-2-naftil- α -D-galattopiranoside	"	viola	
14	β -galattosidasi	2-naftil- β -D-galattopiranoside	"	viola	
15	β -glucuronidasi	naftol-AS-BI-fosfato- β -D-glucuronide	"	blu	
16	α -glucosidasi	2-naftil- α -D-glucopiranoside	"	viola	
17	β -glucosidasi	6-Br-2-naftil- β -D-glucopiranoside	"	viola	
18	N-acetil- β -glucosaminidasi	1-naftil-N-acetil- β -D-glucosaminide	"	marrone	
19	α -mannosidasi	6-Br-2-naftil- α -D-mannopiranoside	"	viola	
20	α -fucosidasi	2-naftil- α -L-fucopiranoside	"	viola	

* Incolore o del colore del controllo se la galleria è stata esposta a una fonte luminosa intensa dopo l'aggiunta dei reattivi; se non è stato possibile eseguire questa operazione, colorazione gialla molto chiara.

BIBLIOGRAFIA
TABELLA DEI SIMBOLI

p. I
p. II

bioMérieux, il logo blu e API sono marchi utilizzati, depositati e/o registrati di proprietà di bioMérieux SA o di una delle sue filiali.

ATCC è un marchio di proprietà di American Type Culture Collection.

Gli altri marchi e nomi di prodotti menzionati in questo documento sono marchi commerciali dei loro rispettivi detentori.



bioMérieux SA
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Stampato in Francia



Sistema de detecção de actividades enzimáticas

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE

O sistema API ZYM é um micro-método semi-quantitativo de detecção de actividades enzimáticas que se pode aplicar a diferentes tipos de amostras (microrganismos, suspensões celulares, tecidos, líquidos biológicos, etc.). Permite estudar rápida e simultaneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequenas quantidades de amostra. Apresenta-se sob a forma de uma galeria de 20 micro-poços (cúpulas) cujo fundo é constituído por um suporte que contém o substrato enzimático com tampão. Este suporte destina-se a favorecer o contacto entre a enzima e o substrato geralmente insolúvel.

O sistema API ZYM permite detectar as actividades enzimáticas de um extracto complexo não purificado mas não se destina a atingir a precisão dos doseamentos espectralométricos para cada enzima. Este método também não se destina a substituir as técnicas de separação de electroforéticos. No entanto, pode orientá-las dando previamente, no seu estado bruto, o espectro de actividades enzimáticas da amostra a analisar.

PRINCÍPIO

A galeria API ZYM é composta por 20 cúpulas especialmente adaptadas ao estudo das reacções enzimáticas. O fundo da galeria é constituído por uma trama de fibras não-tecidas onde estão distribuídos os substratos sintéticos. Este suporte favorece as reacções enzimáticas mesmo se os substratos forem insolúveis.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa, que rehidrata os substratos. As reacções produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor, reveladas pela adição de reagentes.

A leitura destas reacções efectua-se com o Quadro de Leitura.

APRESENTAÇÃO (Embalagem de 25 testes):

- 25 galerias API ZYM
- 25 caixas de incubação
- 25 fichas de resultados
- 1 folheto informativo

COMPOSIÇÃO DA GALERIA

A composição da galeria API ZYM está descrita no quadro de leitura deste folheto informativo.

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Reagentes:

- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700) ou API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- Reagentes ZYM A (Ref. 70 494)+ZYM B (Ref. 70 493)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) ou DENSIMAT (Ref. 99 234)

Materiais:

- Pipetas ou PSipetas
- Suporte para ampolas
- Protector de ampolas
- Equipamento geral de laboratório de bacteriologia

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- **Sistema unicamente destinado à detecção de actividades enzimáticas. Não utilizá-lo para o diagnóstico.**
- **Unicamente para uso profissional.**
- As amostras, culturas bacterianas e produtos semeados devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de maneira apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Revisão em vigor". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH – Última edição" ou a regulamentação em vigor no país de utilização.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade.
- Antes da utilização, assegurar-se de que a embalagem dos diferentes componentes não está danificada.
- Não utilizar galerias que tenham sofrido uma alteração física: cúpula deformada, ...
- É recomendado efectuar um controlo de qualidade antes de utilizar cada nova ampola de reagente ZYM B.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

As galerias conservam-se a 2° - 8° C até à data de validade indicada na embalagem.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Diluir a amostra num volume mínimo de 2 ml de água destilada ou de meio aquoso **não-tamponado** (por exemplo, soro fisiológico).

• Para os microrganismos:

Preparar uma suspensão de densidade óptica determinada (5-6 de McFarland) em API Suspension Medium (2 ml) (abrir a ampola como indicado no parágrafo "Precauções de utilização" do folheto informativo do produto), de água destilada ou de meio isotónico a partir de uma colheita/coleta em gelose de uma cultura pura ou de um sedimento de centrifugação para uma cultura em meio líquido. É importante para obter resultados reprodutíveis, que as estirpes/cepas a comparar sejam previamente cultivadas num mesmo meio, que as suspensões sejam feitas no mesmo líquido e que estas tenham a mesma densidade óptica. Esta técnica pode permitir evidenciar as enzimas inductíveis que podem ser detectadas adicionando ao meio de cultura o ou os inductores correspondentes.

• Para as outras amostras (suspensões celulares, tecidos, líquidos biológicos, ...):

Consultar os dados da literatura ou desenvolver o seu próprio procedimento.

Para qualquer aplicação, o utilizador é o único habilitado em determinar o interesse de utilizar o API ZYM, as condições de procedimento e a interpretação dos resultados.

PROCEDIMENTO

Preparação da galeria

- Juntar fundo e tampa de uma caixa de incubação e distribuir, aproximadamente, 5 ml de água destilada ou desmineralizada [ou qualquer água sem aditivo ou derivados susceptíveis de libertarem gás (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] nos alvéolos para criar uma atmosfera húmida.
- Inscrever a referência da amostra na lingueta lateral da caixa. (Não inscrever a referência na tampa, uma vez que esta pode ser deslocada durante a manipulação).
- Retirar a galeria da embalagem individual.
- Colocar a galeria na caixa de incubação.

Inoculação da galeria

- Distribuir com a pipeta ou com a PSlpeta a amostra preparada na proporção de 65 µl por cúpula.
- Colocar a tampa na caixa e incubar, geralmente, durante 4 H - 4 H 30 a 37° C (temperatura óptima). As condições de duração e de temperatura podem variar em função das amostras a analisar, mas devem ser idênticas no âmbito de um determinado trabalho.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Leitura da galeria

Após incubação:

- Adicionar 1 gota de reagente ZYM A e 1 gota de reagente ZYM B (*) em cada cúpula.
O facto de colocar na cúpula um agente tensioactivo (reagente ZYM A) permite facilitar a solubilização do reagente ZYM B no meio.

(*) É recomendado controlar cada ampola de reagente ZYM B antes da primeira utilização.

Para isso, é aconselhado utilizar a **enzima β-glucosidase Sigma G0395** ou a **estirpe ATCC® 27853** mencionada no parágrafo Controlo de Qualidade para excluir qualquer reagente defeituoso.

- Deixar as colorações desenvolverem-se, no mínimo, durante 5 minutos.
- Em seguida, se possível, expor a galeria durante uma dezena de segundos aos raios de uma lâmpada muito potente (1000 W) colocada a uma distância de 10 cm acima das cúpulas. Esta operação tem por objectivo eliminar o fundo amarelo causado pelo excesso de Fast Blue BB que não reagiu e tornar assim as reacções negativas incolores. Uma exposição prolongada à luz solar produz o mesmo efeito.

Registo dos resultados

Efectuar a leitura e anotar todas as reacções na ficha de resultados: a nota 0 corresponde a uma reacção negativa, a nota 5 a uma reacção de intensidade máxima, as reacções intermédias foram anotadas 1, 2, 3 ou 4, consoante a sua intensidade (3, 4 e 5 foram consideradas positivas).

As colorações permanecem estáveis várias horas em solução. Após 24 horas, pode haver alteração de cor.

CONTROLO DE QUALIDADE

Para qualquer aplicação, é vivamente aconselhado, antes da utilização, efectuar um controlo de qualidade API ZYM, adaptado à colheita analisada e à metodologia adoptada.

Os meios de suspensão, galerias e reagentes são objecto de controlos de qualidade sistemáticos nas diferentes etapas do seu fabrico. O controlo de qualidade API ZYM foi efectuado com estirpes/cepas bacterianas ou enzimas purificadas como as indicadas no quadro abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Perfil obtido após cultura de 18-24 H em gelose trypticase soja. Inóculo ajustado entre 5 e 6 McF com DENSIMAT.)
2. β-glucosidase Sigma G0395 (Perfil obtido com uma concentração de 0,2 g/l.)
3. α-quimotripsina Sigma C4129 (Perfil obtido com uma concentração de 1 g/l.)

- Leitura e interpretação 7-10 minutos após a adição dos reagentes.

* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

LIMITES DO TESTE

- O API ZYM não deve ser considerado um produto de identificação.
- O API ZYM é um produto de detecção e não se destina a dar resultados de análises biológicas a doentes.
- Qualquer outra aplicação que não faça parte do controlo de qualidade efectuado na bioMérieux, é da responsabilidade do utilizador, que determina, neste caso, as condições de procedimento, o modo de interpretação e a utilização dos resultados dos testes.
- A bioMérieux não se responsabiliza pela utilização de resultados obtidos com API ZYM.

ELIMINAÇÃO DE RESULTADOS

Os reagentes não utilizados podem ser eliminados como resíduos não perigosos.

Eliminar os reagentes utilizados e os materiais descartáveis contaminados em conformidade com os procedimentos relativos aos produtos infecciosos ou potencialmente infecciosos.

É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes que este produz consoante a sua natureza e o seu perigo, e assegurar (ou fazer assegurar) o tratamento e a eliminação em conformidade com as regulamentações aplicáveis.

QUADRO DE LEITURA

N°	ENZIMA DETECTADA	SUBSTRATO	pH	REACÇÃO	
				POSITIVA	NEGATIVA
1	Testemunho			Incolor ou cor da amostra se esta tiver uma cor pronunciada	
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	Incolor ou Amarelo muito pálido*
3	Esterase (C 4)	2-naftil butirato	6,5	Violeta	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naftil caprilato	7,5	Violeta	
5	Lipase (C 14)	2-naftil miristato	"	Violeta	
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	"	Laranja	
7	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida	"	Laranja	
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	"	Laranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	Laranja	
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5	Laranja	
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	"	Azul	
13	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α -D-galactopiranosida	"	Violeta	
14	β -galactosidase	2-naftil- β -D-galactopiranosida	"	Violeta	
15	β -glucuronidase	Naftol-AS-BI- β -D-glucuronida	"	Azul	
16	α -glucosidase	2-naftil- α -D-glucopiranosida	"	Violeta	
17	β -glucosidase	6-Br-2-naftil- β -D-glucopiranosida	"	Violeta	
18	N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β -D-glucosaminida	"	Castanho	
19	α -manosidase	6-Br-2-naftil- α -D-manopiranosida	"	Violeta	
20	α -fucosidase	2-naftil- α -L-fucopiranosida	"	Violeta	

* Incolor ou da cor do testemunho se a galeria tiver sido exposta a uma fonte de luz intensa após a adição dos reagentes; se esta operação não tiver sido efectuada, obtenção de uma cor amarela muito pálida.

BIBLIOGRAFIA p. I
QUADRO DE SÍMBOLOS p. II

bioMérieux, o logotipo azul e API são marcas utilizadas, depositadas e/ou registadas, propriedade exclusiva da bioMérieux, SA ou de uma das suas filiais.

ATCC é uma marca da propriedade exclusiva da American Type Culture Collection.

As outras marcas e nomes de produtos mencionados neste documento são marcas comerciais dos respectivos proprietários.

Portugal: Distribuído por BIOMÉRIEUX PORTUGAL, LDA.

Brasil: Distribuído por bioMérieux Brasil, S.A. - Estrada do Mapuá, 491 - Jacarepaguá - R.J. - CEP 22710-261
CNPJ: 33.040.635/0001-71

Atendimento ao Consumidor Tel.: 0800-264848

Prazo de Validade, N° de Lote, N° de Registro de Ministério da Saúde e Responsável Técnico:

VIDE EMBALAGEM



bioMérieux SA
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Impresso em França



Zestaw do badania aktywności enzymatycznej

WPROWADZENIE

API ZYM jest półilościową mikrometodą opracowaną do badania aktywności enzymatycznej. Technikę tę można stosować dla wszystkich materiałów (mikroorganizmy, zawiesina komórek, tkanek, płyny biologiczne, itd.). Pozwala ona na systematyczne i szybkie badanie 19 reakcji enzymatycznych przy użyciu bardzo małych ilości próbek. Zestaw składa się z paska z 20 mikroprobówkami (studzienkami), zawierającymi na podstawie substrat enzymatyczny i bufor. Podstawa pozwala na kontakt między enzymem i w zasadzie nierozpuszczalnym substratem.

API ZYM nie został opracowany tak, aby osiągnąć precyzję metody spektrofotometrycznej lub elektroforetycznej, ale po to by umożliwić wykrycie aktywności enzymatycznej w złożonych próbkach, które nie zostały oczyszczone. Można użyć go do badania skринingowego materiałów, w celu ustalenia spektrum enzymatycznego, a następnie poddać je spektrofotometrii i/lub elektroforezie.

ZASADA DZIAŁANIA

Pasek API ZYM składa się z 20 mikroprobówek, specjalnie opracowanych do badań reakcji enzymatycznych. Podstawa paska zawierająca syntetyczne substraty, jest wykonana z ciągłego włókna. Podstawa ta pozwala na zachodzenie reakcji enzymatycznych, nawet jeśli substraty są nierozpuszczalne.

Testy enzymatyczne wykonuje się z gęstej zawiesiny mikroorganizmów, która jest używana do rozpuszczenia substratów enzymatycznych. Ostateczny produkt metabolizmu wytwarzany w trakcie okresu inkubacji jest wykrywany dzięki reakcji barwnej, która zachodzi po dodaniu odczynników.

Reakcje są odczytywane według Tabeli Odczytów.

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU (Zestaw na 25 testów) :

- 25 pasków API ZYM
- 25 komór inkubacyjnych
- 25 kart wyników
- 1 instrukcja

SKŁAD PASKA

Skład paska API ZYM podano w tej instrukcji w Tabeli Odczytów.

WYPOSAŻENIE WYMAGANE NIE NALEŻĄCE DO ZESTAWU

Odczynniki:

- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700) lub API NaCl 0.85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- Odczynniki ZYM A (Ref. 70 494) oraz ZYM B (Ref. 70 493)
- Standard McFarland'a (ref. 70 900) lub DENSIMAT (ref. 99 234)

Materiały:

- Pipettes lub PSlpettes
- Statyw do ampulek
- Osłona na ampulkę
- Wyposażenie zazwyczaj stosowane w laboratorium mikrobiologicznym

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- **Zestaw ten jest opracowany wyłącznie do badań aktywności enzymatycznej. Nie służy on do wykonywania procedur diagnostycznych.**
- **Do wykorzystania wyłącznie przez profesjonalistów.**
- Wszystkie próbki pobrane od pacjentów, hodowle bakteryjne i wykorzystane produkty są potencjalnie zakaźne i powinny być traktowane zgodnie z zalecanymi środkami ostrożności. Należy stosować techniki aseptyczne i zwykle procedury obowiązujące przy pracy ze szczepami bakteryjnymi zgodnie z "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Bieżąca wersja". Dodatkowe środki ostrożności zawarte są w "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Ostatnie wydanie", lub regulowane przepisami właściwymi dla poszczególnych państw.
- Nie używać odczynników przeterminowanych.
- Przed użyciem sprawdzić, czy opakowania poszczególnych składników są nienaruszone.
- Nie używać pasków uszkodzonych: odkształcone studzienki, itd.
- Po otwarciu nowej ampułki odczynnika ZYM B należy przeprowadzić kontrolę jakości.

PRZECHOWYWANIE

Paski powinny być przechowywane w temperaturze 2-8°C do końca daty ważności podanej na opakowaniu.

OPRACOWANIE MATERIAŁU

Rozpuścić próbkę w minimum 2 ml wody destylowanej lub innym rozpuszczalniku takim jak normalna sól fizjologiczna **bez jakiegokolwiek buforu**.

• Dla mikroorganizmów :

Przygotować zawiesinę o zmętnieniu odpowiadającym **5-6 w skali McFarland'a** w API Suspension Medium (2 ml) (otworzyć ampułkę w sposób opisany w paragrafie "Środki ostrożności" w instrukcji dla tego produktu), wodzie destylowanej lub innym roztworze izotonicznym. Do przygotowania zawiesiny można użyć czystą hodowlę na słupku agarowym lub odwirowany osad z hodowli bulionowej. W celu uzyskania powtarzalnych wyników, ważne jest aby porównywany mikroorganizm był hodowany na tym samym podłożu, aby użyć taki sam rozcieńczalnik i taką samą gęstość optyczną zawiesiny. Technika ta pozwala na wykrycie enzymów konstytutywnych. Enzymy indukcyjne można wykryć po dodaniu odpowiedniego induktora(ów) do podłoża hodowlanego.

• Dla innych materiałów (zawiesina komórek, tkanki, płyny biologiczne, ...) :

Postępować zgodnie z piśmiennictwem lub opracować specjalną procedurę.

W oparciu o zastosowanie testu API ZYM, użytkownik musi określić właściwe dla niego warunki i interpretację wyników.

SPOSÓB WYKONANIA

Przygotowanie paska

- Przygotować komorę inkubacyjną (podstawkę i pokrywkę) i nanieść około 5 ml destylowanej lub demineralizowanej wody [lub jakiegokolwiek wody bez dodatków lub związków chemicznych, z których mogą wydzielać się gazy (np. Cl₂, CO₂, itd.)] na podstawkę w kształcie plastra miodu, w celu wytworzenia komory wilgotnej.
- Zanotować numer szczepu na wydłużonej części podstawki. (Nie notować numeru na pokrywce, ponieważ może ona ulec zamianie w trakcie badań).
- Wyjąć pasek z indywidualnego opakowania.
- Umieścić pasek w komorze inkubacyjnej.

Napełnianie paska

- Przy użyciu pipety lub PSlpety, nanieść po 65 µl materiału do każdej studzienki.
- Po napełnieniu, przykryć plastikową pokrywką i inkubować 4 - 4 ½ godziny w 37°C (optymalna temperatura). Czas i temperatura inkubacji mogą różnić się w zależności od typu materiału badanego. Jednakże, jeżeli testy mają być porównywane, wszystkie warunki ich przebiegu (czas, temperatura, podłoża hodowlane, gęstość zawiesiny) powinny być takie same. Posianego paska nie należy wystawiać na działanie światła.

ODCZYT I INTERPRETACJA

Odczyt paska

Po inkubacji:

- Dodać po 1 kropli odczynników ZYM A i ZYM B (*) do każdej studzienki. Poprzez umieszczenie w studzience czynnika aktywnego przestrzennie (odczynnik ZYM A), ułatwione jest rozpuszczenie odczynnika ZYM B w podłożu. (*) **Zalecane jest przeprowadzenie kontroli** każdej ampułki ZYM B przed pierwszym użyciem. W celu eliminacji wadliwych odczynników zaleca się użycie **enzymu β-glukozydazy Sigma G0395** lub **szczepu ATCC® 27853** wskazanego w paragrafie Kontrola Jakości.
- Odczekać przynajmniej 5 minut, aby umożliwić wywołanie zabarwienia.
- Jeżeli to możliwe umieścić pasek pod źródłem silnego światła (żarówka 1000 W) na około 10 sekund, tak by żarówka znajdowała się w odległości około 10 cm (4") od studzienek. Procedura ta usunie pozostałości żółtego zabarwienia, które mogą być spowodowane obecnością nadmiaru odczynnika Fast Blue BB, który nie wszedł w reakcję. Po ekspozycji a światło, wynikiem reakcji ujemnych będzie brak zabarwienia. Umieścić pasek na kilka minut w świetle dziennym, aby uzyskać porównywalne wyniki.

Notowanie wyników

Odczytać wyniki reakcji i zanotować je na arkuszu. Uzyskuje się wartości w zakresie 0-5, które odpowiadają intensywności zabarwienia: 0 odpowiada reakcji ujemnej, 5 reakcji o maksymalnej intensywności, a wartości 1, 2, 3 lub 4 są pośrednie i zależą od poziomu intensywności (3, 4 lub 5 uważa się za reakcje o wyniku dodatnim). Kolory pozostają stabilne przez kilka godzin po dodaniu odczynników. Po 24 godzinach, kolory mogą się zmienić wpływając na wyniki interpretacji testów.

KONTROLA JAKOŚCI

Zaleca się prowadzenie kontroli jakości dla wszystkich zastosowań, zanim użyje się API ZYM w sposób przystosowany do badanego materiału lub określonej procedury.

Podłoża, paski i odczynniki są systematycznie poddawane kontroli jakości na różnym poziomie procesu produkcji. Kontrola jakości API ZYM jest przeprowadzana przy użyciu szczepów bakterii i oczyszczonych enzymów takich jak wymienione w poniższej tabeli :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC* 27853 (Profil otrzymany z hodowli szczepu przez 18-24 godz. na agarze tryptozowo-sojowym.
Inokulum o gęstości 5 - 6 McF oznaczone na DENSIMAT'ie.)
2. β-glukozydaza Sigma G0395 (Profil otrzymany przy użyciu stężenia 0.2 g/l.)
3. α-chymotrypsyna Sigma C4129 (Profil otrzymany przy użyciu stężenia 1 g/l.)

- Odczyt i interpretacja 7-10 minut po dodaniu odczynników.

* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

OGRANICZENIA METODY

- Nie należy używać API ZYM jako testu do identyfikacji.
- API ZYM jest produktem do badań i nie należy używać go do analiz materiałów biologicznych, w celu diagnozowania pacjentów.
- Wszystkie zastosowania inne niż te poddawane kontroli jakości przez bioMérieux, użytkownik wykonuje na własną odpowiedzialność. Zaleca się postępowanie zgodnie z wewnętrzną polityką instytucji i jej procedurami, w celu weryfikacji i walidacji metodyki oraz dokładności API ZYM.
- bioMérieux nie ponosi żadnej odpowiedzialności za wyniki uzyskane przy użyciu testu API ZYM.

POSTĘPOWANIE ZE ZUŻYTYMI TESTAMI

Nie zużyte odczynniki należy traktować jako bezpieczne biologicznie i pozbywać się ich zgodnie z tym założeniem. Zużytych odczynników, jak i zanieczyszczonych sprzętów jednorazowych, należy pozbywać się zgodnie z procedurami dla materiałów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych.

Obowiązkiem każdego laboratorium jest pozbywanie się zużytych testów i wytworzonych ścieków w zależności od ich typu i stopnia zabezpieczenia laboratorium oraz dezynfekowanie ich i usuwanie (zlecenie dezynfekcji i usuwania) zgodnie z zatwierdzonymi procedurami.

TABELA ODCZYTÓW

Nr	BADANY ENZYM	SUBSTRAT	pH	WYNIK	
				DODATNI	UJEMNY
1	Kontrola			Bezbarwny lub kolor próbki, jeśli ma ona intensywne zabarwienie	
2	Fosfataza alkaliczna	2-naftylo- fosforan	8.5	Fiolet	Bezbarwny lub bardzo blady żółty *
3	Esteraza (C 4)	2- naftylo-maślan	6.5	Fiolet	
4	Esteraza Lipaza (C 8)	2- naftylo-kaprylan	7.5	Fiolet	
5	Lipaza (C 14)	2- naftylo-mirystynian	"	Fiolet	
6	Arylamidaza leucyny	L-leucylo-2-naftylamid	"	Pomarańczowy	
7	Arylamidaza waliny	L-walilo-2- naftylamid	"	Pomarańczowy	
8	Arylamidaza cystyny	L-cystylo-2- naftylamid	"	Pomarańczowy	
9	Trypsyna	N-benzoilo-DL-arginino-2- naftylamid	8.5	Pomarańczowy	
10	α -chymotrypsyna	N-glutarylo-fenylalanino-2- naftylamid	7.5	Pomarańczowy	
11	Kwaśna fosfataza	2-naftylo- fosforan	5.4	Fiolet	
12	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan	"	Niebieski	
13	α -galaktozydaza	6-Br-2- naftylo - α D-galaktopiranosyd	"	Fiolet	
14	β - galaktozydaza	2- naftylo - β D- galaktopiranosyd	"	Fiolet	
15	β -glukuronidaza	Naftylo -AS-BI- β D-glukuronid	"	Niebieski	
16	α -glukozydaza	2- naftylo - α D-glukopiranozyd	"	Fiolet	
17	β - glukozydaza	6-Br-2- naftylo - β D- glukopiranozyd	"	Fiolet	
18	N-acetylo- β -glukozaminidaza	1- naftylo -N-acetyl- β D-glukozaminid	"	Brazowy	
19	α -mannozydaza	6-Br-2- naftylo - α D-mannopiranozyd	"	Fiolet	
20	α -fukozydaza	2- naftylo - α L-fukopiranozyd	"	Fiolet	

* Kontrola bezbarwna lub zabarwiona, jeśli pasek był wystawiony na działanie intensywnego źródła światła po dodaniu odczynników; jeśli pasek nie był wystawiony na działanie intensywnego źródła światła, otrzymuje się bardzo blady żółty kolor.

PIŚMIENICTWO
TABELA SYMBOLI

str. I
str. II

bioMérieux, jego niebieskie logo i API są znakami towarowymi używanymi, w trakcie rejestracji i/lub zastrzeżonymi, należącym do bioMérieux SA lub jednego z przedstawicieli.

ATCC jest znakiem towarowym używanym, w trakcie rejestracji lub zastrzeżonym, należącym do American Type Culture Collection. Wszystkie pozostałe nazwy i znaki towarowe są własnością ich posiadaczy.



bioMérieux SA
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Wydrukowano we Francji

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / PIŚMIENICTWO

1. MONGET D.
Mise au point d'une microméthode de détection et de mesure d'activités enzymatiques (API ZYM). Résultats obtenus dans différents domaines d'application.
(1978) Thèse de Docteur-Ingénieur. Lyon.
2. WASHINGTON II J.A., WARREN E., KARLSON A.G.
Stability of Barium Sulfate turbidity standards (McFarland scale).
(1972) Appl. Microbiol., 24, 6, 1013.

BACTÉRIES / BACTERIA / MIKROORGANISMEN / BACTERIAS / BATTERI / BACTÉRIAS / BAKTERIE

1. DEL CORRAL F., BUCHANAN R.L.
Evaluation of the API-ZYM system for identification of *Listeria*.
(1990) Food Microbiology, 7, 99-106.
2. GRUNER E., VON GRAEVENITZ A., ALTWEGG M.
The API ZYM system: a tabulated review from 1977 to date.
(1992) J. Microbiol. Methods, 16, 101-118.
3. HOFSTAD T.
Evaluation of the API ZYM System for identification of *Bacteroides* and *Fusobacterium* Species.
(1980) Med. Microbiol. Immunol., 168, 173-177.
4. HUMBLE M.W., KING A., PHILLIPS I.
API ZYM : a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes.
(1977) J. Clin. Path., 30, 275-277.
5. MARLER L., ALLEN S., SIDERS J.
Rapid Enzymatic Characterization of Clinically Encountered Anaerobic Bacteria with the API ZYM System.
(1984) Eur. J. Clin. Microbiol., 3, 4, 294-300.
6. POH C.L., LOH G.K.
Enzymatic Characterization of *Pseudomonas cepacia* by API ZYM Profile.
(1988) J. Clin. Microbiol., 26, 3, 607-608.
7. UNAOGU I.C., GUGNANI H.C., BOIRON P.
The enzymatic profile of some pathogenic aerobic actinomycetes as determined by API-ZYM method.
(1999) J. Mycol. Med., 9, 235-236.
8. WAITKINS S.A., BALL L.C., FRASER C.A.
Use of the API-ZYM system in rapid identification of alpha and non-haemolytic streptococci.
(1980) J. Clin. Path., 33, 53-57.

LIQUIDES BIOLOGIQUES / BIOLOGICAL FLUIDS / BIOLOGISCHE FLÜSSIGKEITEN / LÍQUIDOS BIOLÓGICOS / LIQUIDI BIOLOGICI / PŁYNY BIOLOGICZNE

1. BAUDON D., RODA L., FIERRE D.
Serum enzymes profile in human acute myeloblastic leukaemia : preliminary results.
(1977) Biomedicine, 27, 324-326.
2. BRETON B., MENEZO Y., BILLARD R.
Mise en évidence de quelques enzymes dans le sperme de la carpe et de la truite et dans le liquide coelomique de la truite.
(1974) C.R. Acad. Sci. Paris, 278, 1285-1288.
3. MENEZO Y., LAVIOLETTE P.
Les constituants aminés des sécrétions tubaires chez la lapine.
(1972) Ann. Biol. Anim. Biophys., 12, 3, 383-396.
4. MENEZO Y., FLECHON J.E.
Utilisation d'une microméthode pour la détermination des activités enzymatiques des spermatozoïdes et du plasma séminal chez le lapin et le taureau.
(1973) C.R. Acad. Sci. Paris, 277, 1037-1040.
5. MENEZO Y., TESTART J.
Etude du sérum sanguin et du liquide folliculaire préovulatoire chez la vache.
(1975) Ann. Biol. Anim. Biophys., 15, 1, 1-8.
6. MONGET D., LAVIOLETTE P.
Mise au point de microtests "phosphatase alcaline" et "peroxydase" pour le contrôle de la pasteurisation du lait de vache.
(1978) Le Lait, 58, 579-580, 595-605.








CELLULES / CELLS / ZELLEN / CÉLULAS / CELLULE / KOMÓRKI

1. MENEZO Y., GERARD M., SZOLLOSI D., THIBAUT C.
In vitro exchange between the follicle and its culture medium.
(1978) Ann. Biol. Anim. Biophys., 18, (2B), 471-476.
2. MONGET D.
Comparaison des profils enzymatiques de deux lignées cellulaires d'insectes *Antheraea eucalypti* et *Malacosoma disstria* (Lepidoptera).
(1975) C.R. Acad. Sci. Paris, 281, 651-657.
3. NARDON P., MONGET D., DIDIER-FICHET M.L., de THE G.
Comparison of zymogram of three lymphoblastoid cell lines with a new microtechnique.
(1976) Biomedicine, 24, 3, 183-190.

TISSUS / TISSUES / GEWEBE / TEJIDOS / TESSUTI / TECIDOS / TKANKI

1. BOUSQUET J., MARTY J.P., COULOMB Y., ROBINET-LAVY M., COUR P., MICHEL F.B.
Enzyme determination and rast inhibition assays for orchard grass (*dactylis glomerata*) : A comparison of commercial pollen extracts.
(1978) Ann. Allergy, 41, 164-169.
2. BOUSQUET J., MARTY J.P., CLAUSS C., MICHEL F.B.
Enzymes of bee venom, sac and whole body.
(1979) Ann. Allergy, 43, 110-114.
3. CECCALDI H.J., TRELLU J.
Apparition des activités enzymatiques digestives dans les oeufs de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé, Décapode) au cours de l'embryogenèse.
(1975) C.R. Séances Soc. Biol., 169, 5, 1249-1255.
4. DAVID A., FIASSON J.L.
Spécification dans le genre *gleophyllum* karst (polyporaceae) : Utilisation des pigments, recherche d'enzymes interfertilités.
(1977) Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon, 9, 304-320.
5. GRENIER S., DELOBEL B., BONNOT G., LAVIOLETTE P.
Persistence des activités enzymatiques du corps adipeux de *Galleria mellonella* en milieux définis.
(1974) C.R. Acad. Sci. Paris, 278, 2545-2548.
6. SEVILLA C., LAGARRIGUE J.G.
Etude comparée des zymogrammes du tube digestif chez les Isopodes (Crustacés, Péracarides).
(1975) C.R. Acad. Sci. Paris, 281, 715-718.
7. TRELLU J., CECCALDI H.J.
Caractérisation de quelques activités enzymatiques digestives de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé, Décapode), après électrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide.
(1976) C.R. Séances Soc. Biol., 170, 3, 364-368.
8. VOULOT C., LAVIOLETTE P.
Les Tyrosinases des parties pigmentées de l'oeil chez quatre espèces de rongeurs.
(1976) C.R. Acad. Sci. Paris, 283, D, 79-81.

**TABLE DES SYMBOLES / INDEX OF SYMBOLS / SIMBOLE / TABLA DE SIMBOLOS /
TABELLA DEI SIMBOLI / QUADRO DOS SÍMBOLOS / TABELA SYMBOLI**

Symbole / Symbol / Simbolo / Símbolo	Signification / Meaning / Bedeutung / Significado / Significato / Znaczenie
	Numéro de référence / Catalogue number / Bestellnummer / Número de referencia / Numero di codice / Número de referência / Numer katalogowy
	Fabricant / Manufactured by / Hersteller / Fabricante / Prodotto da / Fabricado por / Wyprodukowano przez
	A conserver entre X - Y°C / Temperature limitation / Temperaturbegrenzung / Conservar entre X - Y°C / Conservare a X - Y°C / A conservar entre X - Y° C / Przechowywać w temperaturze
	Date de péremption / Use by / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Data di scadenza / Data de validade / Zużyć do
	Numéro de lot / Batch code / Chargenbezeichnung / Número de lote / Numero di lotto / Número de lote / Numer serii
	Se reporter aux instructions d'utilisation / Consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / Ver las instrucciones de utilización / Consultare le istruzioni per l'uso / Consultar as instruções de utilização / Należy zapoznać się z instrukcją obsługi
	Nombre de tests / Contains sufficient for "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen / Número de pruebas / Sufficiente per "n" determinazioni / Número de testes / Zawartość wystarczy do wykonania «n» oznaczeń