

IVD



[www.immy.com](http://www.immy.com)

**ANTIGÈNES FONGIQUES, TÉMOINS POSITIFS ET PLAQUES  
D'IMMUNODIFFUSION  
POUR UTILISATION EN TEST D'IMMUNODIFFUSION (ID)**

Pour utilisation avec le ID Fungal Antibody System  
REF ID1001, ID Candida Antibody System REF  
CA1001 Individual Reagents and Immunodiffusion  
Plates

## UTILISATION PRÉVUE

Les réactifs d'immunodiffusion (ID) sont conçus pour détecter les anticorps du patient dirigés contre *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Histoplasma* ou *Paracoccidioides* dans le sérum du patient pour aider au diagnostic respectif de chaque maladie.

## EXPLICATION

*Aspergillus* spp, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* spp, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* et *Paracoccidioides brasiliensis* sont des agents responsables de mycoses profondes. Ces champignons représentent un défi diagnostique pour le laboratoire de microbiologie et le médecin. Sur le plan radiographique, les lésions produites par les champignons systémiques (à l'exception de *Candida*) peuvent être difficiles à distinguer des autres maladies infectieuses (p. ex. *M. tuberculosis*) ou néoplasiques (23). Les symptômes sont souvent insignifiants et peuvent mimer diverses pneumonies, sarcoïdoses, cancers et autres maladies. Culturellement et histologiquement, ces organismes peuvent être difficiles à identifier, même après des tentatives répétées. À l'exception d'*Aspergillus* et de *Candida*, leur croissance est très lente, nécessitant 2 à 6 semaines (26). Souvent, la sérologie offre les seules preuves disponibles pour guider le traitement, suggérer un pronostic ou conduire à la sélection de techniques diagnostiques plus définitives telles que la culture intensive ou la biopsie (23). De plus, la sérologie semi-quantitative, comme le test de fixation du complément (CF) ou l'ID semi-quantitative, peut fournir des renseignements importants sur les effets du traitement (23,24). Le test d'identification est un test qualitatif ou semi-quantitatif utilisé pour la détection des anticorps précipitants chez les patients soupçonnés d'avoir des mycoses. De plus, le test d'identification est un outil rapide et fiable qui fournit des preuves présumées de l'infection. Les sérums anti-complémentaires dans le test de CF peuvent être testés à l'aide de cette technique. Le test d'identification fournit également des données sur la spécificité des réactions obtenues par le test de CF. Aucun équipement coûteux n'est requis et la technique est assez simple pour être exécutée par n'importe quel laboratoire, fournissant ainsi un excellent outil de dépistage.

**TABLEAU 1 : Tests de sérodiagnostic des anticorps dans les maladies mycotiques**

Maladie	ID	CF	LA	EIA
<b>Aspergillose</b>	X	X		
<b>Blastomycose</b>	X	X		
<b>Candidiase</b>	X			
<b>Coccidioïdomycose</b>	X	X	X	X
<b>Histoplasmose</b>	X	X	X	
<b>Paracoccidioidomycosis</b>	X			

## ASPERGILLOSE :

Il existe trois formes d'aspergillose : l'aspergillose invasive (IA), l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) et l'aspergillome (19). Le test d'ID est très utile dans le diagnostic de l'ABPA et de l'aspergillome, les deux formes d'aspergillose observées chez les individus immunocompétents où l'infection peut être corrélée avec une augmentation des anticorps spécifiques (19). Des précipitines peuvent être trouvées dans plus de 90% des patients atteints d'aspergillome et dans 70% de patients atteints d'ABPA (26). Contrairement aux hôtes immunocompétents, la croissance d'*Aspergillus* dans les tissus d'un hôte immunodéprimé ne correspond pas à une augmentation des titres d'anticorps anti-*Aspergillus*. L'utilisation parallèle de tests d'identification, de CF et de données cliniques est un moyen efficace de diagnostic spécifique de l'aspergillose (tableau 1) (33).

## BLASTOMYCOSE:

Le test sérologique de la blastomycose doit être demandé lorsqu'un patient présente les signes d'une infection respiratoire qui progresse graduellement et/ou lorsque des lésions cutanées sont présentes, signe fréquent de dissémination (26). La blastomycose ne présente aucun symptôme pathognomonique ou caractéristique radiologique spécifique. Le test d'identification de la blastomycose, qui permet de détecter la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène "A", est spécifique (positifs dans environ 80 % des cas culturellement prouvés) et les réactions positives peuvent servir de base au traitement immédiat du patient (26). La quantité d'anticorps (c.-à-d. le titre) est en corrélation avec l'activité de la maladie (7). Les tests négatifs n'excluent toutefois pas le diagnostic de blastomycose (26).

Si les précipitines sont mises en évidence dans le test d'identification de la blastomycose, l'analyse des échantillons de sérum par FK est inutile (tableau 1) (34).

## CANDIDOSE:

Les espèces de *Candida*, bien que généralement considérées comme saprophytes, sont maintenant connues pour causer des maladies. Les traitements actuels, tels que les antibiotiques à large spectre, les corticostéroïdes et les médicaments cytotoxiques, ont entraîné une prévalence accrue de la candidose systémique. Malheureusement, les caractéristiques cliniques uniques font défaut dans la candidose viscérale et le diagnostic n'est souvent pas fait avant la mort. Un diagnostic précoce et précis est la clé d'une thérapie réussie. Stallybrass (30), a rapporté l'importance de la précipitation d'anticorps contre *C. albicans* dans les sérums de patients atteints de candidose systémique ou viscérale en utilisant le test d'identification. Les sérums de personnes en bonne santé et de patients atteints de candidose muco-cutanée n'ont pas donné de résultats positifs aux tests d'identification. Le test d'identification des anticorps est utile pour le diagnostic de la candidose systémique chez les hôtes immunocompétents (26). Cependant, les patients immunodéprimés peuvent présenter une réponse immunitaire humorale limitée ou ne pas produire d'anticorps, de sorte qu'un test d'identification négatif n'exclut pas la maladie (26). Comme ces champignons font partie de la flore normale de l'organisme, leur isolement peut ne pas être une preuve suffisante pour un diagnostic en laboratoire. Les tests sérologiques fournissent des renseignements supplémentaires lorsqu'une augmentation du titre ou un changement dans le nombre de

précipitines est plus révélateur d'une infection qu'un seul test positif.

### COCCIDIOÏDOMYCOSE:

*C. immitis* (isolats de Californie) et *C. posadasii* (isolats non californiens) sont trouvés principalement dans le sud-ouest des Etats-Unis (11) et en Amérique centrale et du Sud. Mais le transport moderne a augmenté la probabilité d'infection pour les individus visitant la région. Le diagnostic sérologique de la coccidioïdomycose repose généralement sur la détection par identification et fixation du complément (CF) d'anticorps dirigés contre deux antigènes coccidioïdes, IDTP et IDCF (24). Les anticorps IDTP ont été associés à une maladie aiguë primaire et on pense qu'ils appartiennent principalement à la classe des IgM (24). Les anticorps IDCF persistent pendant la phase chronique et disséminée de la maladie et ont été décrits comme étant principalement des anticorps IgG (32). Cependant, les anticorps IDTP et IDCF peuvent ne pas être détectés chez les patients immunodéprimés ou immunodéprimés (4,5,8). Le test de CF, lorsqu'il est effectué en même temps que le test d'identification, est la meilleure combinaison pour poser un diagnostic présumé de coccidioïdomycose (tableau 1) (34). Le titre semi-quantitatif du test IDCF n'est pas identique au titre du test CF, mais les tendances sont comparables et ont une valeur pronostique (24).

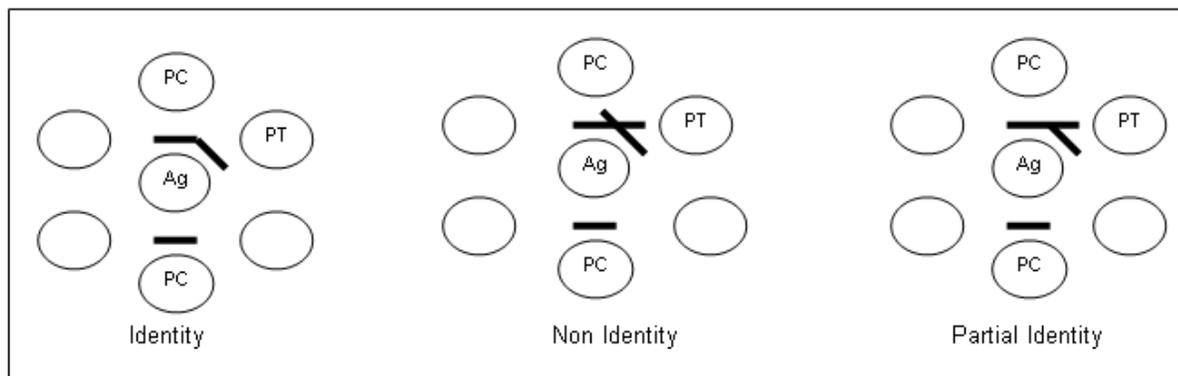
### HISTOPLASMOSE:

L'histoplasmosse résulte d'une infection par *H. capsulatum*, qui est répandu dans le monde entier mais qui pose un problème particulier dans le centre et le sud-est des Etats-Unis et dans certaines régions d'Amérique centrale et du Sud (31). Deux précipitines peuvent être détectées dans le sérum du patient atteint d'histoplasmosse dirigées contre les antigènes "M" et "H". Les anticorps contre l'antigène "M" sont les premiers à apparaître dans l'histoplasmosse pulmonaire aiguë (10) et constituent la base d'un immunodiagnostic spécifique, tandis que les anticorps contre l'antigène "H" apparaissent plus tard et moins fréquemment (27), et leur présence est souvent liée à une diffusion extrapulmonaire. Environ 63 % des cas d'histoplasmosse confirmés sur le plan culturel n'ont qu'une bande "M", alors que 90 % ont soit une bande "M" seulement, soit des bandes "H" et "M" dans le test d'identification (6). Les tests d'identification de l'histoplasmosse et de CF réagiront avec environ 85 à 94 % des sérums des patients atteints d'histoplasmosse (6,16). Les titres d'anticorps ont une valeur diagnostique et pronostique (26). L'utilisation parallèle de tests d'identification et de CF et de données cliniques est un moyen efficace de diagnostic spécifique de l'histoplasmosse (tableau 1) (34).

### PARACOCCIDIOÏDOMYCOSE:

*P. brasiliensis* est l'agent causal de la paracoccidioïdomycose, qui est endémique en Amérique centrale et du Sud (9). La paracoccidioïdomycose chez les patients atteints du sida est relativement rare (12). Par conséquent, la détection des anticorps est un outil diagnostique et pronostique utile (9). La principale précipitine diagnostique est la gp43 (également connue sous le nom de E2 ou A), que l'on trouve chez 95 à 98 % des patients atteints de paracoccidioïdomycose (9).

Figure 1.



PT= Patient

Ag= Antigen

## Principe Biologique

L'immunodiffusion est un test qualitatif ou semi-quantitatif basé sur les principes de la double diffusion décrits par Oudin (22) et Ouchterlony (20,21). Un anticorps et son antigène homologue soluble sont placés dans des puits séparés dans un milieu de diffusion approprié (agarose ou Cleargel™) et diffusés vers l'extérieur dans le milieu. Entre les deux puits, un gradient de concentration de chacun des composants de la réaction est établi allant de l'excès d'antigène le plus proche du puits d'antigène à l'excès d'anticorps le plus proche du puits d'anticorps. Une ligne visible de précipité se forme au point d'équivalence.

Les anticorps des patients sont testés pour leur "identité" en plaçant le sérum du patient à côté des puits contenant un témoin de référence connu. De plus, l'échantillon du patient est placé à côté d'un témoin positif pour obtenir une sensibilité maximale (c.-à-d. que les échantillons faiblement positifs montrent une rotation de la bande de référence lorsqu'ils sont placés à côté d'un témoin positif). Si un complexe antigène-anticorps est présent, les précipitines forment une ligne ininterrompue d'identité avec le système de référence connu. Les puits de la plaque d'immunodiffusion sont agencés de façon à ce que chaque test de chaque patient dispose d'un système de référence connu de sorte que les réactions d'identité soient facilement visibles (Figure 1). Des réactions partielles d'identité et de non-identité sont également possibles (figure 1).

Une réaction d'identité partielle se produit lorsque certains composants des anticorps sont identiques et d'autres non. Les réactions d'identité partielles indiquent la survenue simultanée d'une réaction d'identité et d'une non-réaction. L'"éperon" représente les composants qui ne sont pas liés entre eux. Une réaction non identique se produira lorsque les complexes antigène-anticorps seront différents. La réaction "X" ou croisée qui en résulte indique la présence de deux complexes non apparentés.

## MATÉRIEL FOURNI

Tous les réactifs sont destinés uniquement au diagnostic in vitro ! Matériel fourni (En fonction du kit ou des réactifs achetés)

### A. ID Antigènes:

1. **Aspergillus ID Antigène** (0,2 ml, REF A30000 ; 1,0 ml, REF A30110) Filtrat de culture en phase mycélienne groupée d'*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* et *A. terreus*.
2. **A. fumigatus ID Antigène** (1,0 ml, REF A70110) Filtrat de culture en phase mycélienne d'*A. fumigatus*.
3. **A. flavus ID Antigène** (1,0 ml, REF A90110) Filtrat de culture en phase mycélienne de *A. flavus*.
4. **A. niger ID Antigène** (1,0 ml, REF AD0110) Filtrat de culture en phase mycélienne d'*A. niger*.
5. **A. terreus ID Antigène** (1,0 ml, REF AF0110) Filtrat de culture en phase mycélienne d'*A. terreus*.
6. **Blastomyces ID Antigène** (0,2 ml, REF B30000 ; 1,0 ml, REF B30110) Extrait purifié de la croissance en phase levurienne de *B. dermatitidis* contenant l'"A" Antigène.

**Candida ID Antigène** (0,25 ml, REF C50000 ; 1,0 ml, REF C50110) Préparation de filtrat de culture et de lysat cellulaire de *C. albicans* de sérotype A en phase levurienne.

7. **Coccidioides IDCF Antigène** (0,2 ml, REF C3000000 ; 1,0 ml, REF C30110) Filtrat de culture en phase mycélienne de *C. immitis* contenant l'antigène "IDCF". Cette préparation peut également contenir l'Antigène "IDTP".
8. **Coccidioides IDTP Antigène** (1,0 ml, REF C70110) Filtrat de culture en phase mycélienne de *C. immitis* contenant l'Antigène "IDTP"
9. **Histoplasma ID Antigène** (0,2 ml, REF H50000 ; 1,0 ml, REF H50110) Filtrat de culture en phase mycélienne de *H. capsulatum* contenant "H" et "M" Antigènes.
10. **Paracoccidioides ID Antigène** (1,0 ml, REF PI011010) Filtrat de culture en phase mycélienne de *P. brasiliensis* contenant "gp43" et autres Antigènes.

### B. Contrôles positifs d'identification (antisérum de chèvre) :

1. **Aspergillus ID Positive Control** (0,4 ml, REF A40000 ; 1,0 ml, REF A40110) Contient des anticorps dirigés contre *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, et *A. terreus*. Au moins deux bandes sont visibles contre *Aspergillus ID Antigène* (REF A30000 et A30110).
2. **A. fumigatus ID Contrôle positif** (1,0 ml, REF A80110) Contient des anticorps dirigés contre *A. fumigatus*. Au moins deux bandes sont apparentes contre *A. fumigatus ID Antigène* (REF A70110).
3. **A. flavus ID Positive Control** (1,0 ml, REF AA0110) Contient des anticorps dirigés contre *A. flavus*. Au moins une bande est apparente contre l'*A. flavus ID Antigène* (REF A90110).
4. **A. niger ID Positive Control** (1,0 ml, REF AE0110) Contient des anticorps dirigés contre *A. niger*. Au moins une bande est apparente contre l'*A. niger ID Antigène* (REF AD0110).
5. **A. terreus ID Positive Control** (1,0 ml, REF AG0110) Contient des anticorps dirigés contre *A. terreus*. Au moins une bande est apparente par rapport à la bande *A. terreus ID Antigène* (REF AF0110).
6. **Blastomyces ID Positive Control** (0,4 ml, REF B40000 ; 1,0 ml, REF B40110) Contient des anticorps dirigés contre *B. dermatitidis* "A" Antigène. Une bande est apparente contre *Blastomyces ID Antigène* (REF B3000000 et B30110).
7. **Candida ID Positive Control** (0,5 ml, REF C60000 ; 1,0 ml, REF C60110) Contient des anticorps dirigés contre le sérotype A de *C. albicans*. Au moins deux bandes sont visibles contre *Candida ID Antigène* (REF C50000 et C50110).
8. **Coccidioides IDCF Positive Control** (0,4 ml, REF C40000 ; 1,0 ml, REF C40110) Contient des anticorps dirigés contre les *Coccidioides IDCF ID Antigène* (REF C30000 et C30110). La bande la plus proche du puits d'Antigène est IDCF. Si elle est apparente, la bande IDTP est la plus proche du puits témoin positif.
9. **Coccidioides IDTP Positive Control** (1,0 ml, REF CD0110) Contient des anticorps dirigés contre les *Coccidioides IDTP IDTP Antigène* (REF C70110). Une bande est apparente contre les *Coccidioides IDTP Antigène*.

## MATÉRIEL NON FOURNI

10. **Histoplasma ID Positive Control** (0,4 ml, REF H6000000 ; 1,0 ml, REF H60110) Contient des anticorps dirigés contre *H. capsulatum* "H" et "M" Antigènes. Deux bandes sont visibles contre Histoplasma ID Antigène (REF H50000 et H50110). La bande "H" est la plus proche du puits témoin positif et la bande "M" est la plus proche du puits Antigène.

11. **Paracoccidioides ID Contrôle positif** (1,0 ml, REF PJ0110) Contient des anticorps dirigés contre *P. brasiliensis* "gp43" et autres Antigène s. Au moins une bande est apparente contre Paracoccidioides ID Antigène (REF PI0110).

**Note :** Le format de 0,2 ml d'Antigène et les formats de 0,4 ml et 0,5 ml des témoins positifs ne sont disponibles qu'en kits et ne peuvent être achetés séparément.

### C. Plaques d'identification:

1. **Cleargel™ 1-Series, 10/pk** (REF CA1019)
2. **Cleargel™ 4-Series, 6/pk** (REF ID1019)
3. **Cleargel™ 4-Series, 6/pk – Large well** (REF ID1039)
4. **Agarose 4-Series, 6/pk** (REF ID1029)

Les plaques d'identification sèchent facilement. Gardez les en sacs hermétiquement fermés. NE PAS CONGELER. Conserver à 2-8° C.

Note : Les plaques Cleargel™ ne doivent pas être utilisées avec l'antisérum de lapin.

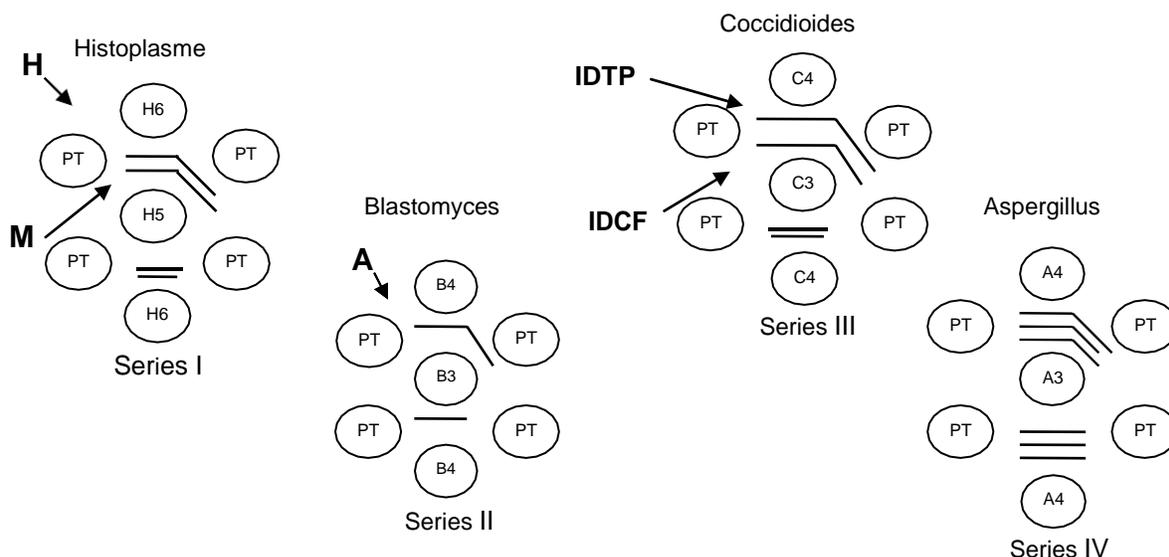
**D. Formes des plaques :** Forme des plaques pour l'enregistrement des données du patient et les résultats des tests

1. Eau distillée ou DI.
2. Chambre humide : On peut utiliser n'importe quel contenant pratique muni d'un couvercle hermétique (p. ex. boîte de Pétri, boîte en plastique, grand bocal à couvercle vissé) et contenant du papier filtre humide ou du papier essuie-tout, à condition que les plaques d'identification demeurent stationnaires, au niveau et hydratées pendant l'incubation.
3. Lampe de lecture : Une lumière de haute intensité (VWR Cat# 41447- 193 ou équivalent) est utilisée pour lire les réactions d'identification.
4. Pipette et embouts : Pour remplir les puits de la plaque d'identification, il faut utiliser une pipette et des pointes capables de délivrer 20-35 µl.
5. La solution saline tamponnée au phosphate (PBS) ou la solution saline normale peut être utilisée pour la dilution des échantillons de patients pour le test d'identification semi-quantitatif.

## STABILITÉ ET STOCKAGE

Les antigènes fongiques doivent être conservés entre 2 et 8 °C et sont stables jusqu'à la date de péremption. Le sérum témoin positif est stable jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C AVANT la réhydratation. Le témoin positif réhydraté restera stable jusqu'à 1 mois s'il est conservé entre 2 et 8 °C. Pour plus d'un mois, le sérum témoin positif réhydraté doit être aliquoté et congelé pour qu'il demeure stable jusqu'à sa date d'expiration. Il faut éviter de congeler et de décongeler plusieurs fois. Lorsque les sérums témoins positifs sont utilisés, la période à température ambiante doit être aussi courte que possible. Les plaques d'identification sont stables jusqu'à leur date de péremption lorsqu'elles sont correctement conservées à 2-8° C dans leur sachet à fermeture éclair pour éviter le dessèchement (indiqué par une augmentation de la turbidité). Les plaques d'identification ne doivent JAMAIS être congelées.

Figure 2.



## PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs d'identification fongiques sont destinés uniquement au diagnostic in vitro. Une standardisation spécifique est nécessaire pour produire nos réactifs et matériaux de haute qualité. IMMY ne peut garantir la performance de ses produits lorsqu'ils sont utilisés avec des matériaux achetés auprès d'autres fabricants. L'utilisateur assume l'entière responsabilité de toute modification des procédures publiées dans le présent document. Lors de la manipulation d'échantillons de patients, des mesures adéquates doivent être prises pour prévenir l'exposition aux agents étiologiques potentiellement présents dans l'échantillon. Les sérums témoins positifs sont conservés à 0,095 % p/p d'azote de sodium. Il est donc recommandé de jeter tout simplement l'excès de contrôle positif dans une poubelle appropriée.

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

**Réhydratation des témoins positifs :** Pour 0,4 ml de contrôle positif, ajouter 0,4 ml d'eau distillée ou d'eau DI ; pour 0,5 ml, ajouter 0,5 ml ; pour 1 ml, ajouter 1 ml. Incuber à température ambiante jusqu'à dissolution complète, puis mélanger délicatement.

## PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Pour des résultats optimaux, on utilise du sérum stérile, qui ne doit pas être très lipidique ou contaminé. En cas de retard dans le traitement des échantillons, l'entreposage à 2-8° C pendant 72 heures est permis. Les échantillons peuvent être conservés plus longtemps à T°C < -20° C, à condition qu'ils ne soient pas décongelés et recongelés à plusieurs fois. Les échantillons en transit entre laboratoires doivent être maintenus à 2-8° C pour des résultats optimaux. Les échantillons peuvent être conservés avec 0,01 % de thimérosal ou 0,095 % d'azote de sodium si nécessaire.

## PROCÉDURE

### ID Procédure du système anticorps fongiques (REF ID1001)

1. Étiqueter les plaques d'identification à utiliser avec un numéro d'identification et la date. Placer les plaques sur un fond foncé pour bien les remplir.
2. Remplir les puits de contrôle positif (voir Figure 2) des plaques d'identification avec les sérums de contrôle positif appropriés comme suit :
  - A. Histoplasma ID Contrôle Positif - Série I, puits 1 et 4 (H6).
  - B. Blastomyces ID Positive Control- Série II, puits 1 et 4 (B4)
  - C. Coccidioides ID Contrôle Positif - Série III, puits 1 et 4 (C4).
  - D. Aspergillus ID Positive Control- Série IV, puits 1 et 4 (A4).

**REMARQUE :** Pour bien remplir les puits, remplissez le puits jusqu'à ce que le bord du puits disparaisse. Porter une attention particulière à ne pas sur- ou sous-remplir les puits.

3. Inscrire le numéro de plaque, le numéro de lot et la date de la plaque sur le formulaire de plaque.
4. Inscrivez le nom, la date et/ou le numéro de laboratoire du premier patient à la ligne 2 de la colonne de gauche du formulaire de la plaque.
5. Remplir le puit 2 des séries I, II, III et IV de la plaque avec le premier échantillon de patient.
6. Répéter les étapes 4 et 5 avec chaque échantillon de patient supplémentaire en utilisant les puits 3, 5 et 6 des séries I, II, III et IV.
7. Après avoir ajouté le témoin positif et les sérums du patient, la plaque fermée peut être préincubée à température ambiante pendant 30 minutes. Cela rendra les bandes légèrement plus intenses que si les Antigènes sont ajoutés immédiatement.
8. Remplir le puits central (#7) de la série I avec Histoplasma (H5) ID Antigène . Répéter le processus de remplissage des puits centraux avec Blastomyces (B3) ID Antigène (série II), Coccidioides (C3) ID Antigène (série III) et Aspergillus (A3) ID Antigène (série IV).
9. Placer les plaques d'identification fermées à niveau, dans une chambre humide et incuber à température ambiante pendant 24 heures.
10. Après 24 heures, lire et enregistrer les bandes d'identification sur le formulaire d'analyse. Voir Lecture du test. Un rapport intérimaire devrait être émis à ce stade si aucune réaction d'identité ou d'identité partielle n'est observée. Les résultats positifs doivent être signalés immédiatement. Si les bandes de contrôle n'apparaissent pas dans les 24 heures, répétez le test.
11. Un délai supplémentaire de 24 heures est recommandé pour confirmer un résultat négatif. Un rapport final est établi à l'issue de cette période. (Certaines réactions des patients avec Histoplasma et Blastomyces ID Antigène s peuvent ne pas apparaître avant 48 heures d'incubation).

### **Espèces Aspergillus. Système d'anticorps ID-Candida (REF CA1001). Paracoccidioides Procédure d'immunodiffusion réactifs individuels et plaques individuelles**

1. Étiqueter les plaques d'identification à utiliser avec un numéro d'identification et la date. Placer les plaques dans un endroit sombre le fond pour bien remplir.
2. L'aide du témoin positif d'identification approprié, remplir les puits 1 et 4 des plaques d'identification avec le témoin positif d'identification.

**REMARQUE :** Pour bien remplir les puits, remplissez le puits jusqu'à ce que le bord du puits disparaisse. Porter une attention particulière à ne pas surcharger ou sous-remplir les puits.

3. Inscrire le numéro de plaque, le numéro de lot et la date de la plaque sur le formulaire de plaque.
4. Inscrivez le nom, la date et/ou le numéro de laboratoire du premier patient à la ligne 2 de la colonne de gauche du formulaire de la plaque.
5. Remplir le puit 2 de la plaque d'identification avec le premier échantillon du patient.

6. Répéter les étapes 4 et 5 avec chaque échantillon de patient supplémentaire en utilisant les puits 3, 5 et 6.
7. Après avoir ajouté le témoin positif et les sérums du patient, la plaque fermée peut être préincubée à température ambiante pendant 30 minutes. Cela rendra les bandes légèrement plus intenses que si les Antigènes sont ajoutés immédiatement.
8. Bien remplir le centre (#7) avec l'ID Antigène homologue.
9. Placer les plaques d'identification fermées à niveau, dans une chambre humide et incuber à température ambiante pendant 24 heures.
10. Après 24 heures, lire et enregistrer les bandes d'identification sur le formulaire d'analyse. Voir Lecture du test. Un rapport intérimaire devrait être émis à ce stade si aucune réaction d'identité ou d'identité partielle n'est observée. Les résultats positifs doivent être signalés immédiatement. Si les bandes de contrôle n'apparaissent pas dans les 24 heures, répétez le test.
11. Un délai supplémentaire de 24 heures est recommandé pour confirmer un résultat négatif. Un rapport final est établi à l'issue de cette période.

#### **Procédure d'identification semi-quantitative:**

1. Étiqueter les plaques d'identification à utiliser avec un numéro d'identification et la date. Placer les assiettes sur un fond foncé pour bien les remplir.
2. A l'aide du témoin positif d'identification approprié, remplir les puits 1 et 4 des plaques d'identification.

**REMARQUE :** Pour bien remplir les puits, remplissez le puits jusqu'à ce que le bord du puits disparaisse. Porter une attention particulière à ne pas surcharger ou sous-remplir les puits.

3. Inscrire le numéro de plaque et la date de la plaque sur le formulaire de plaque.
4. Inscrivez le nom, la date et/ou le numéro de laboratoire du premier patient à la ligne 2 de la colonne de gauche du formulaire de la plaque.
5. Remplir le puit 2 de la plaque d'identification avec le premier échantillon du patient non dilué.
6. Répéter les étapes 4 et 5 avec chaque dilution supplémentaire d'échantillon de patient en utilisant les puits 3, 5 et 6. Des dilutions sérielles doubles de l'échantillon du patient peuvent être effectuées avec du PBS ou du sérum physiologique.
7. Après avoir ajouté le témoin positif et les sérums du patient, la plaque fermée peut être incubée à température ambiante pendant 30 minutes. Cela rendra les bandes légèrement plus intenses que si les Antigènes sont ajoutés immédiatement.
8. Bien remplir le centre (#7) avec l'antigène homologue ID Antigène .
9. Placer les plaques d'identification fermées à niveau, dans une chambre humide et incuber à température ambiante pendant 24 heures.
10. Après 24 heures, lire et enregistrer les bandes d'identification sur le formulaire d'analyse. Voir Lecture du test. Un rapport intérimaire devrait être émis à ce stade si aucune réaction d'identité ou d'identité partielle n'est observée. Les résultats positifs doivent être signalés immédiatement. Si les bandes de contrôle n'apparaissent pas dans les 24 heures, répétez le test.

11. Un délai supplémentaire de 24 heures est recommandé pour confirmer un résultat négatif. Un rapport final est établi à l'issue de cette période.

#### **Lecture du test**

Les bandes de précipitine sur la plaque d'identification peuvent être facilement lues dans un faisceau de lumière de haute intensité, la plaque étant maintenue sur un fond sombre et la lumière faisant saillie à travers la plaque par le bas à environ 45° de la surface de la plaque. L'œil du lecteur doit se trouver au-dessus de la plaque, à l'extérieur du faisceau lumineux, dans une position telle que la lumière réfléchi par les bandes les fasse paraître brillantes. La rotation des plaques d'identification peut aider à identifier les réactions d'identification faiblement positives. Inscrire sur la fiche de lecture toutes les bandes observées sur les plaques.

Les bandes témoins, telles que décrites précédemment à la section B "Contrôles positifs d'identification", doivent être présentes pour que les tests du patient soient valides. S'il manque des bandes, l'essai doit être répété. Une attention particulière doit être accordée à l'orientation des bandes produites par le sérum du patient par rapport aux bandes témoins. Les extrémités des bandes de contrôle doivent être soigneusement observées. Une jonction lisse des bandes indique une réaction d'identité et une jonction avec un éperon indique une réaction d'identité partielle (figure 1). Si l'on constate que le témoin se plie bien vers une position devant le patient, cela indique que le titre de l'anticorps du patient est faible. Il est recommandé que les échantillons positifs faibles soient préparés avec le témoin positif dans le puits 1, l'échantillon patient dans le puits 2, le témoin négatif (Cat # N80110) ou un échantillon négatif dans le puits 6, et Antigène dans le puits 7. Cette configuration permettra de confirmer un résultat faiblement positif.

Les bandes d'identité partielles contiennent à la fois une bande d'identité et une bande de non-réaction et sont donc considérées comme positives en raison de la bande d'identité.

Les bandes non identitaires contre Aspergillus ID Antigène doivent être testées pour déterminer si elles sont dues ou non à la protéine C- réactive. Cette réaction faussement positive peut être éliminée en trempant la plaque dans du citrate de sodium à 5 % pendant environ 45 minutes à température ambiante, suivie d'un rinçage à l'eau DI et d'une nouvelle application de citrate de sodium à 5 % pendant 45 minutes supplémentaires avant de lire la réaction.

### **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

Les bandes d'identité ou d'identité partielle avec un témoin positif sont considérées comme positives et indiquent la présence d'anticorps du patient contre l'antigène en question. L'absence de bande ou de réactions non identitaires est considérée comme un test négatif (1-3) ; cependant, les réactions non identitaires avec Aspergillus ou Candida devraient faire suspecter une Aspergillose ou Candidose. Bien qu'un diagnostic spécifique ne puisse être posé en l'absence de réactions d'identité ou d'identité partielle, le nombre de bandes doit être indiqué.

## LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

La plus grande limitation de la procédure de test concerne les échantillons prélevés sur des patients atteints d'infections primaires précoces (3 à 6 premières semaines). De plus, les patients immunodéprimés ou immunodéprimés peuvent ne pas produire de quantités détectables d'anticorps.

## VALEURS ATTENDUES ET CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### ASPERGILLOSE :

A. Des précipitines peuvent être trouvées dans >90% de patients avec des aspergillomes et dans 70% de patients avec ABPA (26). Le plus grand nombre de cas d'aspergillose peut être détecté par l'utilisation d'A. fumigatus, A. flavus, A. niger et A. terreus Antigènes lors de tests d'identification distincts effectués en même temps (26). Les précipitines sont moins fréquentes chez les patients atteints d'aspergillose invasive. Certains extraits d'Aspergillus spp. contiennent de la substance C, qui peut réagir avec la protéine C réactive dans le sérum de certains patients atteints de maladie inflammatoire. Le complexe qui en résulte forme un précipité, qui peut être interprété à tort comme étant un anticorps d'Aspergillus (26). En fait, la présence d'anticorps anti-Aspergillus chez les personnes immunodéprimées est plus susceptible de représenter des anticorps formés avant le début du traitement immunosuppresseur plutôt que par suite d'une infection invasive. Une augmentation du titre d'anticorps à la fin de l'immunosuppression indique un rétablissement de l'IA, alors que l'absence d'un titre d'anticorps ou une baisse du taux d'anticorps suggère un mauvais pronostic. Ainsi, la détection d'anticorps peut être utilisée de façon pronostique, mais non diagnostique, pour l'IA (19). Deux ou plusieurs lignes de précipitine distinctes doivent être formées lorsque A. fumigatus antiserum de référence peut réagir avec A. fumigatus Antigène . Une ou plusieurs lignes de précipitine distinctes doivent être formées lorsqu'on laisse A. flavus, A. niger ou A. terreus réagir avec l'antisérum de référence homologue Antigène . Étant donné que les antigènes d'Aspergillus d'importance diagnostique n'ont pas été définis, toute bande de précipitine (identité, identité partielle ou non identité) est significative et le nombre de bandes doit être indiqué. La présence d'une ou de plusieurs précipitines indique une infection, y compris un aspergillome. Les anticorps précipitants sont souvent détectables dans le sérum des patients atteints d'ABPA. Bien qu'une ou deux précipitines puissent se produire avec n'importe quelle forme clinique d'aspergillose, la présence de trois bandes ou plus est invariablement associée à un aspergillome ou à une IA. Le test peut être négatif pour certains patients recevant un traitement antifongique ou corticostéroïdien à long terme. Lorsqu'il est utilisé avec des antisérums de référence, le test d'identification est spécifique à 100 % (26).

### BLASTOMYCOSIS:

Le test d'identification de la blastomycose est positif dans environ 80 % des cas culturellement confirmés (18). Un test négatif a peu de valeur et n'exclut en rien l'existence d'une blastomycose active. Un test positif fournit des preuves présumées d'une infection active ou récente. Les sérums de patients atteints d'autres infections mycotiques (Histoplasme et Coccidioïdomycose) peuvent produire des bandes contre Blastomyces Antigène ; cependant, ces bandes ne forment pas de réactions d'identité avec la bande "A" produite par le contrôle positif Blastomyces (3). La détection d'anticorps est utile pour tester et surveiller les patients présentant une méningite blastomycotique suspectée et pour évaluer la réponse au traitement antifongique. Le test d'identification de la blastomycose avec B. dermatitidis "A" Antigène est spécifique. Les réactions positives peuvent être à la base d'un traitement immédiat du patient sans qu'il soit nécessaire de procéder à des tests parallèles avec Coccidioïdes et Histoplasma Antigène s (26). Les tests négatifs n'excluent toutefois pas un diagnostic de blastomycose. Seuls les spécimens qui produisent des lignées d'identité ou d'identité partielle avec l'antigène "A" sont considérés positifs pour la blastomycose. Le test d'identification a permis le sérodiagnostic de 79 % des 113 cas avérés de blastomycose (26). Les sérums de certains patients atteints de blastomycose, cependant, ne sont pas facilement trouvés positifs par le test d'identification. Les patients présentant des réactions sériques négatives doivent faire l'objet d'une étude intensive afin de déceler toute culture ou tout signe histologique de blastomycose, et plusieurs échantillons de sérum doivent être prélevés toutes les 3 semaines et examinés pour déceler la formation de bandes de précipitine antigène "A" (26). Chez les patients présentant des cas avérés de blastomycose, la disparition de la bande de précipitine de l'antigène "A" est un signe de pronostic favorable (26). La réactivité sérologique, cependant, ne change pas aussi rapidement que la réponse clinique (26).

### CANDIDIASIS:

Le test d'identification pour la détection des anticorps dirigés contre les espèces de Candida est approprié pour les sérums de patients présentant une candidémie, une pneumonite, une endocardite, des plaies ou des abcès intra-abdominaux et les cathéters urinaires ou intravasculaires à demeure (26). Les patients affaiblis et ceux qui reçoivent des agents immunosuppresseurs et des traitements antibiotiques prolongés courent un risque élevé de candidose invasive (26). Lorsqu'ils deviennent granulocytopeniques et développent une fièvre inexpliquée, ils doivent être testés pour la présence d'anticorps dirigés contre les espèces Candida (26). La détection des précipitines est considérée comme une présomption de candidose systémique, mais elle peut aussi indiquer une colonisation ou une candidémie transitoire (26). Le test d'identification des anticorps a une sensibilité d'environ 80% pour la confirmation d'une candidose invasive chez des hôtes immunologiquement intacts (26). Étant donné que les Candida Antigènes ayant une signification diagnostique n'ont pas été définis, toute bande de précipitine (identité, identité partielle ou non identité) est significative et le nombre de bandes doit être rapporté. Le témoin Candida ID positif doit contenir au moins deux précipitines. La production d'une ou plusieurs précipitines constitue une

réaction positive. La candidose systémique doit être fortement suspectée lorsque des échantillons en série présentent une séroconversion (c.-à-d. lorsque les résultats négatifs des tests d'anticorps deviennent positifs) ou montrent une augmentation du nombre de précipitines (26).

### **COCCIDIOÏDOMYCOSE:**

La formation d'une ou plusieurs bandes "IDCF" et parfois "IDTP" entre un échantillon de patient et le Coccidioides Antigène est une présomption d'infection à *C. immitis*, actuelle ou récente. Certaines personnes continuent de produire des anticorps détectables pendant de longues périodes (jusqu'à un an) après la guérison clinique de la maladie active (14). Un test négatif n'exclut pas la coccidioïdomycose (3,14,17,17,23,28,29). Des réactions croisées peuvent être observées chez des patients présentant d'autres champignons systémiques (en particulier *H. capsulatum*) ; il faut donc faire preuve de prudence lorsqu'on cherche des réactions identitaires (3,17,29). Les tests de fixation du latex et du complément peuvent fournir des informations supplémentaires importantes concernant l'état du patient (14). Les précipitines sériques peuvent être détectées dans un délai de 1 à 3 semaines après l'apparition des infections primaires chez un pourcentage élevé de patients, même avant que les résultats du test de fixation du complément (CF) ne deviennent positifs. Dans environ 80 % de toutes les infections, une précipitine "IDTP" est observée dans les 2 semaines suivant l'apparition des symptômes et est rarement détectée 6 mois après l'infection (26). Des réactions IDTP faussement positives ont été observées avec des échantillons prélevés chez des patients atteints de mucoviscidose (26). Le test IDCF est très spécifique. Le test semi-quantitatif IDCF donne des résultats comparables à ceux obtenus par le test CF (24). Le titre semi-quantitatif IDCF n'est pas identique au test CF, mais les tendances sont comparables (24). L'essai semi-quantitatif IDCF sur des échantillons en série peut montrer des différences d'intensité et de motifs de baguage, ce qui a une valeur pronostique (24,26).

### **HISTOPLASMOSE:**

La preuve sérologique est souvent le facteur principal dans un diagnostic définitif d'histoplasme. Les antigènes cliniquement significatifs de *H. capsulatum* sont appelés "H" et "M" Antigène s. (Note : la bande "H" semble la plus proche du puits témoin positif, tandis que la bande "M" est la plus proche du puits Antigène.) Les précipitines contre l'antigène "M" sont les premières à apparaître dans l'histoplasme pulmonaire aiguë et constituent la base d'un immunodiagnostic spécifique. Les précipitines "H" apparaissent plus tard et moins fréquemment, et leur présence est plus souvent liée à une dissémination extrapulmonaire. La bande "M" a été trouvée dans environ 63% des patients avec histoplasme prouvée par culture, tandis que la bande "H" est apparente dans seulement 27% (6). La bande "H" est rarement observée en l'absence d'anticorps contre l'antigène "M". La bande "M" peut apparaître chez les patients qui se sont récemment rétablis d'une histoplasme ainsi que dans le sérum d'anciens patients atteints d'histoplasme qui ont récemment eu un test cutané positif (15). Comme le test peut être négatif dans jusqu'à 10 % des cas culturellement démontrés, l'absence d'une bande "H" et/ou "M" n'exclut pas l'histoplasme (6,13,15). La combinaison des tests d'identification et de FK réagira avec environ 85 à 94 % des

sérums des patients atteints d'histoplasme (6, 16). La présence d'anticorps "M" seulement dans le sérum peut être attribuée à une maladie active, à une maladie inactive ou à des tests cutanés chez des hôtes précédemment sensibilisés. Le sérum d'environ 70 % des patients atteints d'histoplasme avérée contient des précipitines "M", alors que seulement 10 % des sérums présentent à la fois les précipitines "M" et "H" (6). La démonstration des bandes "M" et "H" suggère fortement une histoplasme active, indépendamment des autres résultats sérologiques. La détection de précipitines "M" et "H" dans les échantillons de LCR indique une histoplasme méningée (26).

### **PARACCOCCIDIOÏDOMYCOSE:**

Le test d'identification utilisant *P. brasiliensis* Antigène s a une sensibilité de 94% avec des sérums de patients atteints de paracoccidioïdomycose (26). La ligne principale de précipitation dans le test d'identification montre l'identité avec gp43 (25). Jusqu'à trois précipitines sont observées dans le sérum de patients atteints de paracoccidioïdomycose. Une précipitine majeure, gp43, est la plus proche du puits d'Antigène et est sérologiquement identique aux lignes de précipitine initialement désignées "E2" ou "A". La précipitine réagissant avec la gp43 se retrouve chez 95 à 98 % des patients présentant des cas actifs de paracoccidioïdomycose séropositifs (26). La précipitine gp43 est la plus répandue et dure plus longtemps que les deux autres principales précipitines sériques ; ces dernières disparaissent en premier chez les patients ayant une réponse favorable au traitement (26). La valeur prédictive d'un résultat d'identification positif est de 100 % soit au moment du diagnostic, soit à différentes périodes pendant et après le traitement par rapport aux résultats des témoins sains, des patients atteints de tuberculose ou d'autres mycoses (26).

### **REFERENCES**

1. 1977. Immunodiffusion Test for Candididasis, p. 44-52. In D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan, and J. Cavallaro (eds.), *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. C C Thomas Publishing, Springfield.
2. 1977. Immunodiffusion Tests for Aspergillosis, p. 111-122. In D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan, and J. Cavallaro (eds.), *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. C C Thomas Publishing, Springfield.
3. 1977. Microimmunodiffusion Test for Coccidioidomycosis, Blastomycosis, and Histoplasmosis, p. 7-18. In D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan, and J. Cavallaro (eds.), *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. C C Thomas Publisher, Springfield.
4. Abrams, D. I., M. Robia, W. Blumenfeld, J. Simonson, M. B. Cohen, and W. K. Hadley. 1984. Disseminated coccidioidomycosis in AIDS. *N.Engl.J.Med.* 310:986-987.
5. Antoniskis, D., R. A. Larsen, B. Akil, M. U. Rarick, and J. M. Leedom. 1990. Seronegative disseminated coccidioidomycosis in patients with HIV infection. *AIDS* 4:691-693.
6. Bauman, D. S. and C. D. Smith. 1976. Comparison of immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.* 2:77-80.
7. Bradsher, R. W. and P. G. Pappas. 1995. Detection of specific antibodies in human blastomycosis by enzyme immunoassay. *South.Med.J.* 88:1256-1259.
8. Bronnimann, D. A., R. D. Adam, J. N. Galgiani, M. P. Habib, E. A. Petersen, B. Porter, and J. W. Bloom. 1987. Coccidioidomycosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann.Intern.Med.* 106:372-379.
9. Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin.Microbiol.Rev.* 6:89-

10. Bullock, W. E. 1995. *Histoplasma capsulatum*, p. 2340-2353. In G. L. Mandell, J. Bennet, and R. Dolin (eds.), Principles and practice of infectious disease. Churchill Livingstone, New York.
11. Fisher, M. C., B. Rannala, V. Chaturvedi, and J. W. Taylor. 2002. Disease surveillance in recombining pathogens: multilocus genotypes identify sources of human *Coccidioides* infections. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99:9067-9071.
12. Goldani, L. Z. and A. M. Sugar. 1995. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. Clin.Infect.Dis. 21:1275-1281.
13. Helner, D. 1958. Diagnosis of Histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics 22:616-627.
14. Huppert, M. and J. W. Bailey. 1965. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis. Amer.J.Clin.Path. 44:364-368.
15. Kaufman, L. 1973. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. Ann.Clin.Lab.Sci. 3:141-146.
16. Kaufman, L. 1992. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. Clin.Infect.Dis. 14 Suppl 1:S23-S29.
17. Kaufman, L. and M. J. Clark. 1974. Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. Appl.Microbiol. 28:641-643.
18. Kaufman, L., J. A. Kovae, and E. Reiss. 1997. Clinical immunomycology, p. 575-583. In N. Rose, E. de Macario, J. Folds, H. Lane, and R. Nakamura (eds.), Manual of clinical laboratory immunology. American Society for Microbiology, Washington, DC.
19. Latge, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin.Microbiol.Rev. 12:310-350.
20. Ouchterlony, O. 1949. Antigène -Antibody reactions in gels and the practical application of this phenomenon in the laboratory diagnosis of diphtheria, Stockholm.
21. Ouchterlony, O. 1968. Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. Ann Arbor Publishers, Inc., Ann Arbor.
22. Oudin, J. 1948. L'analyse, immunochimique qualitative. Methode par diffusion des Antigène s au sein de l'immunserum precipitatnt gelose. Premiere Parte.AnnInst.Pasteur 75:30-52.
23. Palmer, D., L. Kaufman, W. Kaplan, and J. Cavallaro. 1977. Serodiagnosis of Mycotic Diseases. Charles C Thomas, Springfield, IL.
24. Pappagianis, D. and B. L. Zimmer. 1990. Serology of coccidioidomycosis. Clin.Microbiol.Rev. 3:247-268.
25. Puccia, R., S. Schenkman, P. A. Gorin, and L. R. Travassos. 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific Antigène . Infect.Immun. 53:199-206.
26. Reiss, E., L. Kaufman, J. Kovacs, and M. Lindsley. 2002. Clinical Immunomycology, p. 559-583. In N. Rose, R. Hamilton, and B. Detrick (eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM Press, Washington, DC.
27. Reiss, E., J. B. Knowles, S. L. Bragg, and L. Kaufman. 1986. Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate Antigène s of histoplasmin characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. Infect.Immun. 53:540-546.
28. Smith, C. 1943. Coccidioidomycosis. Med.Clin.North Amer. 27:790-807.
29. Smith, C., M. Salito, R. Beard, R. Kepp, K. Kepp, R. Clark, and B. Eddie. 1950. Serologic tests in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. Amer.J.Hyg. 52:1-2.
30. Stallybrass, F. C. 1964. *Candida* precipitins. J.Pathol.Bacteriol. 87:89-97.
31. Wheat, J. 1995. Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. Clin.Microbiol.Rev. 8:146-159.
32. Zimmermann, C. R., S. M. Johnson, G. W. Martens, A. G. White, B. L. Zimmer, and D. Pappagianis. 1998. Protection against lethal murine coccidioidomycosis by a soluble vaccine from spherules. Infect.Immun. 66:2342-2345.
33. Kaufman, L. and E. Reiss. 1986. Serodiagnosis of Fungal Diseases, p.446-466. In N. Rose, H. Friedman, and J.L. Fahey (eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Washington, DC.
34. 1977. The Complement Fixation Test, p. 155-181. In D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan, and J. Cavallaro (eds.), Serodiagnosis of Mycotic Diseases. C.C. Thomas Publisher, Springfield.

## International Symbol Usage

	Storage 2-8 °C		Lot Number
	Manufactured by		Catalog Number
	Expiration Date		In Vitro Diagnostics
	CE Symbol		Sufficient for "Σ" Tests



IMMY, Inc.

2701 Corporate Centre Dr.  
Norman, OK 73069 USA  
(405) 360-4669 or (800) 654-3639  
Fax: (405) 364-1058  
E-mail: [info@immy.com](mailto:info@immy.com)  
WEB: [www.immy.com](http://www.immy.com)



EC REP

MDSS  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany