

MASTAZYME™ ASPERGILLUS

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von humanen IgG-/ IgM-/ IgA-Antikörpern gegen *Aspergillus fumigatus* in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification of human IgG / IgM / IgA antibodies against *Aspergillus fumigatus* in serum and plasma

Test immunoenzymatique pour la détection et la quantification des anticorps IgG / IgM / IgA anti *Aspergillus fumigatus* dans le sérum et le plasma humain

Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /
Usage *in vitro* uniquement



Deutsch: Seiten 03–09



English: Pages 10–16



Français: Pages 17–24

MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgG	REF 680101	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgM	REF 680102	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgA	REF 680103	12 x 8 Tests

Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C

	Inhalt	Seite
1.	Einleitung	4
2.	Testprinzip und Verwendungszweck	4
3.	Packungsinhalt	5
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	5
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6
6.	Lagerung und Stabilität	6
7.	Probengewinnung und -handhabung	6
8.	Testdurchführung	7
9.	Auswertung und Interpretation	8
10.	Testcharakteristika	8
11.	Literatur	9

1. Einleitung

Zu den humanpathogenen Aspergillus-Arten zählen *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. nidulans*. Der häufigste Erreger ist *Aspergillus fumigatus*, der vor allem in Heu, Getreide, verrottenden Pflanzen und Vogelfäkalien vorkommt.

Nach den Candidosen gehören Aspergillosen zu den häufigsten opportunistischen invasiven Mykosen. Die meisten Aspergillus-Infektionen werden durch die Luft übertragen. Eine ubiquitäre Verbreitung von *Aspergillus Species* macht die Differenzierung zwischen Infektion und normaler Besiedelung der Flora schwierig.

Als Krankheitserreger des Menschen befallen sie meist nur bereits geschädigtes Gewebe. Aspergillen können Nasennebenhöhlen, Augen und Lunge chronisch infizieren. Hinsichtlich der Aspergillus-Infektion in der Lunge lassen sich drei Krankheitsbilder unterscheiden:

a: Akute Infektion (Bronchopneumonie oder Pneumonie)

Aspergillus-Pneumonien treten besonders häufig bei Patienten mit einer Neutropenie (Verminderung der neutrophilen Granulozyten), nach Langzeittherapie mit Glukokortikoiden, bei intensiver Immunsuppression nach Organtransplantationen und bei chronischen Alkoholikern auf.

b: Saprophytäres Aspergillom (dichtes Hyphengeflecht in der Lunge)

Hierbei erfolgt eine Kolonisation in präformierten Höhlen, die als Defektheilung nach einer Tuberkulose entstanden sind.

c: Allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)

Es handelt es sich hierbei nicht um eine Infektionskrankheit, sondern um eine IgE-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion des Bronchialsystems. Nach Inhalation von Aspergillus-Sporen bilden sich als Folge hochvisköse Sekrete, die die Bronchiallumina verschließen können. Klinisch entwickeln sich oft Atembeschwerden und Fibrose.

Neben dem ELISA kann zur Erfassung spezifischer IgG- und IgM-Antikörper auch ein indirekter Aspergillus-Hämagglutinationstest (Aspergillus-HAT) durchgeführt werden. Dieses Verfahren ist wegen der geringen Sensitivität nicht als Screening-Test geeignet. Bei Risikopatienten werden oft nur geringe Antikörpertiter nachgewiesen. Zur genauen Diagnose invasiver Aspergillosen sollten bei solchen Patienten Gehirn oder Lunge mittels Biopsie auf mögliche Schäden untersucht werden.

2. Testprinzip und Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ ASPERGILLUS Antikörper ELISA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen IgG- / IgM- / IgA-Antikörpern gegen *Aspergillus* in Serum oder Plasma. Die Verwendung des ELISAs für andere Körperflüssigkeiten kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. MASTAZYME™ ASPERGILLUS ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

Das Testprinzip des ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit dem Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-human-IgG / -IgM / -IgA bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30-minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

2.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 20 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o.ä.) ermittelt werden.

3. Packungsinhalt

Der Testkit enthält genügend Reagenzien für $12 \times 8 = 96$ Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, die mit Antigenen <i>Aspergillus fumigatus</i> beschichtet sind
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
4 x 2 mL	Kalibratoren 1–4	humanes Serum mit IgG-/ IgM-/ IgA-Antikörpern gegen <i>Aspergillus</i> , verdünnt mit PBS in folgenden Konzentrationen, stabilisiert mit 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromnitrodioxan als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

		IgG	IgM	IgA
Kal. 1 (negativ)	Konzentration (U/mL)	1	1	1
Kal. 2 (Cut-off)		10	10	10
Kal. 3 (schwach positiv)		50	30	30
Kal. 4 (positiv)		200	60	140

1 x 60 mL	Serumdiluent	PBS/BSA Puffer Natriumazid ($\text{NaN}_3 < 0,1 \%$) als Konservierungsmittel
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-human-IgG / -IgM / -IgA (Ziege), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	0,5 M H_2SO_4 (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
1 x 60 mL	Waschpuffer 10 x Konzentrat	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, vor Gebrauch kurz erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen
2 x	Abdeckfolien	Zur Abdeckung der Mikrotiterplatte (MTP) während der Inkubation
1 x	Plastikbeutel	Zur Lagerung nicht benötigter MTP-Streifen

4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.
- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Laborgeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Wascheräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfallsdatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden.

Nach dem Öffnen ist das angebochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren. Proben, deren Konzentration über dem höchsten Kalibrator liegt, müssen mit Serumdiluent weiter verdünnt und erneut analysiert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Serumdiluent 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Serumdiluent) verdünnt werden.

Zur Vermeidung von Störungen durch Rheumafaktoren können die Patientenproben mit MASTSORB (Kat.-Nr.: 651003) präabsorbiert werden. **Kalibratoren dürfen nicht absorbiert werden.**

8. Testdurchführung

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.

Waschpuffer: Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 60 mL Konzentrat + 540 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MTP-Streifen sollten in der Plastikhülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

8.2. Testablauf

Hinweis: Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben und gebrauchsfertigen Kalibratoren in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei RT für 60 Minuten inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei RT für 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch an Hand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

9. Auswertung und Interpretation

Beispiel

	OD 450 nm	korrigierte OD Werte	Mittelwert OD
Blank	0,018		
Kalibrator 1 (negativ)	0,041/0,037	0,023/0,019	0,021
Kalibrator 2 (cut-off)	0,507/0,495	0,489/0,477	0,483
Kalibrator 3 (schwach positiv)	0,918/0,938	0,900/0,920	0,910
Kalibrator 4 (positiv)	2,356/2,317	2,338/2,299	2,319

Die obige Tabelle dient als Beispiel. Die Daten beschreiben keine Werte, die in anderen Laboratorien erhalten wurden. **Die Daten dürfen nicht zur Erstellung einer Eichkurve verwendet werden.**

9.1. Qualitative Auswertung

Die berechnete Absorption der Probe wird mit der des Cut-off Kalibrators verglichen. OD-Werte über dem Cut-off sind als positiv, Werte unterhalb der Cut-off OD als negativ zu bewerten.

Werte im Bereich der Cut-off OD ($\pm 20\%$) sind als Graubereich zu betrachten. Es wird empfohlen, die Bestimmung zu wiederholen oder 2–4 Wochen später eine neue Patientenprobe zu analysieren. In diesem Fall sollten beide Proben innerhalb eines Testlaufs untersucht werden.

Die optische Dichte des positiven Kalibrators muss mindestens doppelt so hoch sein wie die des Cut-off Kalibrators.

9.2. Quantitative Auswertung

Die Konzentrationen der MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgG / IgM / IgA werden in Einheiten (U/mL) angegeben. Die exakten Konzentrationen sind auf den Etiketten der Kalibratoren angegeben. Die Extinktion wird entweder graphisch oder mittels Computersimulation gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen und die Konzentration der Patientenprobe direkt abgelesen oder berechnet.

Die quantitative Bestimmung der Antikörper gegen Aspergillus ermöglicht eine einfache zuverlässige Überwachung der entsprechenden Antikörpertiter zur Therapiekontrolle.

10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika der MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgG- / IgM- / IgA ELISAs wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

11. Literatur

1. Bodey GP. Eur. J. Clin Microbiol. Infect, 8: 413 (1989).
2. Boeckh M, Höffgen G, Lode H. Dtsch. med. Wschr., 114: 1706 (1989).
3. Kurup VP, Kumar A. Clin. Microbiol. Rev., 4: 439 (1991).
4. Patterson R, Greenberger PA, Halwig JM, Liotta L, Roberts M. Arch. intern. Med, 146: 986 (1986).
5. Rosenberg M, Pattersom R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Ann. intern. Med, 86: 405 (1977).
6. Rüchel R. Annals of Hematology 67: 1 (1993).
7. Schaberg T, Mauch H, Lode H. Dtsch. med. Wschr, 117: 1681 (1992).
8. Yu VL, Muder RR, Poorsatter A. Amer. J. Med, 81: 249 (1986).

	Contents	Page
1.	Intended Use	11
2.	Introduction	11
3.	Principle of the Test	11
4.	Kit Contents	12
5.	Materials Required but not Provided	12
6.	Warnings and Precautions	13
7.	Storage and Stability	13
8.	Specimen Collection and Handling	13
9.	Assay Procedure	14
10.	Results and Interpretation	15
11.	Assay Performance	15
12.	References	16

1. Intended Use

The MASTAZYME™ ASPERGILLUS (*Aspergillus fumigatus*) Antibody ELISA has been designed for the detection and the quantification of specific IgG / IgM / IgA antibodies respectively against *Aspergillus fumigatus* in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be provided on request.

This assay is intended for *in vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

2. Introduction

Aspergillus species of known pathogenicity to man are *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* and *A. nidulans*. The most common pathogen of this genus is *A. fumigatus* which occurs in hay, grain, rotten plants and birds faeces. The main opportunistic invasive fungal infections are the candidal mycosis followed by aspergillosis. Generally infections with *Aspergillus* spp. are airborne.

Because of the ubiquity of *Aspergillus* species it renders more difficult to decide between contamination by commensals or a serious infection. Usually infection in man occurs in already damaged tissues only. *Aspergillus* spp. can cause a chronic infection of paranasal sinus, eyes or lungs.

Three types of lung-aspergillosis can be distinguished:

a: Acute infection (bronchial pneumonia; pneumonia)

Aspergillus pneumonia is mostly found in patients with neutropenia (decrease of neutrophil granulocytes), after a long-time therapy with glucocorticoids, in immunosuppressed patients (after organ transplantation) and in alcoholics.

b: Saprophytic aspergillom (compact reticulum of hyphae in the lungs)

Preformed cavities in the lung due to a previous tuberculosis give place to a colonisation of *Aspergillus* species.

c: Allergic bronchopulmonary aspergillosis

This clinical picture is not due to an infectious disease but a hypersensitive reaction of the bronchial system (mediated by IgE) after inhalation of *aspergillus* spores. Subsequently the bronchial system produces highly viscous secretions that may block the bronchial lumen. The patient develops difficulties of breathing and a fibrosis.

Next to ELISA the indirect *Aspergillus* hemagglutination test (*Aspergillus* HAT) can be performed to detect specific IgG and IgM antibodies. The HAT, however, is not suitable as a screening test because of its low sensitivity. In some high-risk patients it shows only low antibody titers. For a better diagnosis of invasive aspergillosis the brain or lung of these patients should be examined by a biopsy.

3. Principle of the Test

The principle of the test reaction can be described in four stages.

3.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to the antigens on the solid phase to form a stable immune complex. After 60 minutes incubation at room temperature the wells are washed with prediluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

3.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG /-IgM /-IgA horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG / IgM / IgA antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After a 30 minutes incubation at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with washing buffer.

3.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and subsequently the colour development is stopped after 20 minutes incubation at room temperature by adding 0.5 M H₂SO₄ to the wells. The change in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

3.4 Reading and interpretation

The intensity of the colour is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

4. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. The strips and solutions have to be stored at 2–8 °C. The expiry date is mentioned on the labels.

12	Microtiter strips	single strips each with 8 break-apart wells coated with antigen of <i>Aspergillus fumigatus</i>
1 x	Frame holder	
4 x 2 mL	Calibrators 1–4	human serum containing antibodies against <i>Aspergillus</i> (concentrations listed below) diluted in PBS and stabilised with 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane as preservatives, ready to use

		IgG	IgM	IgA
Cal. 1 (negative)	Concentration (U/mL)	1	1	1
Cal. 2 (Cut-off)		10	10	10
Cal. 3 (weak positive)		50	30	30
Cal. 4 (positive)		200	60	140

1 x 60mL	Serum diluent	PBS/BSA buffer solution, contains < 0.1 % sodium azide as preservative, ready to use
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG /-IgM /-IgA, ready to use
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use
1 x 12 mL	Stopping solution	0.5 M sulfuric acid, ready to use
1 x 60mL	Washing buffer 10 x concentrated	PBS/Tween buffer solution 10 x concentrated to be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 min to avoid any crystals
2 x	Plate sealers	to cover microtiter strips during incubation
1 x	Plastic bag	re-sealable for dry storage of non-used strips

5. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter Plate Washer (in case of manual washing: wash bottle)
- Reagent tubes for the serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of higher quality

6. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest or swallow! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera and plasma or buffers based upon have been tested to HBsAg, HIV and HCV respectively with generally accepted methods and were found negative. Nevertheless, precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 24 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination separate disposable pipet tips have to be used.
- No reagents from different kit lots should be used and they should not be mixed with one another.
- All reagents have to be used within shelf life.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or reading (ELISA Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents especially the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided because possible irritations and acid burns could arise and there exists a danger of intoxication.

7. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted washing buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C.

The opened kit should be used within three months.

8. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood which is aseptically drawn by venipuncture after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days. They should be kept at -20°C for a longer storage. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera must be prediluted 1:101 in serum diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL serum diluent) prior to testing.

Samples containing concentrations higher than the highest calibrator have to be diluted further with serum diluent.

In case of interference with rheumatic factors, serum preabsorption with Rf absorbant (MASTSORB Order Code: 651003) is recommended. **Do not absorb the calibrators.**

9. Assay Procedure

9.1. Preparation of Reagents

Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.

Washing buffer: Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 60 mL buffer concentrate + 540 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. Any changes or modifications are within the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Put the unused microtiter strips back in the plastic bag and store them dry at 2–8 °C.

9.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for calibrators, controls and samples.

Note: Other incubation conditions might be possible. In case of modifications of the recommended test procedure (e.g. incubation temperature 37 °C instead of RT) the user has to validate assay performance.

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use calibrators into the appropriate wells.
2. Cover plate with the enclosed plate sealing foil and incubate at room temperature for 60 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Cover plate with plate sealing foil and incubate for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
7. Dispense 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Cover plate with the plate sealing foil and incubate for 20 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended.

The developed colour is stable for at least 60 minutes. Read optical densities during this time.

10. Results and Interpretation

Example

	OD 450 nm	corrected OD	Mean OD Value
Blank	0.018		
Calibrator 1 (negative)	0.041/0.037	0.023/0.019	0.021
Calibrator 2 (cut-off)	0.507/0.495	0.489/0.477	0.483
Calibrator 3 (weak positive)	0.918/0.938	0.900/0.920	0.910
Calibrator 4 (positive)	2.356/2.317	2.338/2.299	2.319

The table above should be considered as an example which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. **These data do NOT describe reference values which have to be found in other laboratories in the same way!**

10.1. Qualitative Calculation

The calculated OD values for patient sera as mentioned above are compared with the value for the cut-off calibrator. If the value of the sample is higher, then it should be read as positive.

A value below the cut-off calibrator should be read as negative. It seems reasonable to define a range of $\pm 20\%$ around the value of the cut-off as a grey zone. It is recommended to repeat results laying within the grey zone using the same serum or a new sample of the same patient, taken after 2–4 weeks. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive calibrator must show an absorption value at least double the value received by the cut-off calibrator.

10.2 Quantitative Calculation

The ready to use calibrators of the ASPERGILLUS antibody kit are defined and values expressed are in arbitrary units (U/mL). This gives access to an exact and reproducible quantification and in consequence patient antibody titer monitoring is possible. Concentration values for calibrators are printed on the labels of the vials.

A standard curve is plotted by entering the mean absorbance value of the calibrators on the Y-axis and the corresponding concentration on the X-axis using graph paper. The concentration of the patient samples can then be read directly from the graph.

The calculation of the result can be performed using a computer and a suitable software program.

11. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgG / IgM / IgA ELISAs have been established and assessed according the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

12. References

1. Bodey GP. Eur. J. Clin Microbiol. Infect, 8: 413 (1989).
2. Boeckh M, Höffgen G, Lode H. Dtsch. med. Wschr., 114: 1706 (1989).
3. Kurup VP, Kumar A. Clin. Microbiol. Rev., 4: 439 (1991).
4. Patterson R, Greenberger PA, Halwig JM, Liotta L, Roberts M. Arch. intern. Med, 146: 986 (1986).
5. Rosenberg M, Pattersom R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Ann. intern. Med, 86: 405 (1977).
6. Rüchel R. Annals of Hematology 67: 1 (1993).
7. Schaberg T, Mauch H, Lode H. Dtsch. med. Wschr, 117: 1681 (1992).
8. Yu VL, Muder RR, Poorsatter A. Amer. J. Med, 81: 249 (1986).

Sommaire	Page
1. Domaine d'utilisation	18
2. Introduction	18
3. Principe du test	18
4. Composition du coffret	19
5. Matériel nécessaire mais non fourni	20
6. Précautions d'utilisation	20
7. Conservation et stabilité	21
8. Prélèvement et transport des échantillons	21
9. Procédure ELISA	22
10. Résultats et interprétation	23
11. Performances du test	23
12. Bibliographie	24

1. Domaine d'utilisation

Le coffret MASTAZYME™ ASPERGILLUS (*Aspergillus fumigatus*) a été conçu pour la détection et la quantification des anticorps IgG / IgM / IgA dirigés contre *Aspergillus* dans le sérum et le plasma. Des applications supplémentaires sur d'autres prélèvements biologiques sont possibles et peuvent être fournies sur demande.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

2. Introduction

Les espèces d'*Aspergillus* pathogène pour l'homme sont: *Aspergillus fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger*, *A.terreus* et *A.nidulans*. L'agent pathogène le plus courant de ce genre est *A.fumigatus* qui se développe dans le foin, les graines, les plantes pourries et les selles d'oiseaux. Les infections fongiques invasives et opportunistes les plus répandues sont candidose suivie de l'aspergillose. Généralement les infections à *Aspergillus* spp proviennent de l'air.

En raison de l'ubiquité d'*Aspergillus*, il est difficile de faire la différence entre une contamination commensale et une infection sévère. Généralement, les infections chez l'homme surviennent uniquement sur des tissus déjà endommagés. *Aspergillus* spp peut provoquer une infection chronique des sinus, des yeux ou des poumons.

a: Infection aiguë (bronchopneumonie ; pneumonie)

La pneumonie à *Aspergillus* apparaît surtout chez des patients atteints de neutropénie (diminution des granulocytes neutrophiles), après une très longue thérapie aux glucocorticoïdes, chez des patients immunodéprimés (après une transplantation d'organe) et chez les alcooliques.

b: Aspergillôme saprophyte (réticulum compact de moisissures dans les poumons)

Des cavités préformées dans les poumons lors d'une tuberculose permettent la colonisation par *Aspergillus*.

c: Aspergillose bronchopulmonaire allergique

Ce cas clinique n'est pas dû à une maladie infectieuse mais à une réaction d'hypersensibilité du système bronchique (dont le médiateur est l'IgE) après inhalation des spores d'*aspergillus*. En conséquence, le système bronchique produit des sécrétions très visqueuses qui peuvent bloquer le passage de l'air. Le patient a des difficultés à respirer et développe une fibrose.

En plus de l'ELISA, le test d'hémagglutination indirecte de l'*aspergillus* (*Aspergillus* HAT) peut être utilisé pour détecter les anticorps spécifiques IgG et IgM. Cependant, le test *Aspergillus* HAT ne peut pas être utilisé comme test de dépistage à cause de sa faible sensibilité. Chez certains patients à haut risque, il ne donne que des titres faibles en anticorps. Pour un meilleur diagnostic de l'aspergillose invasive, le cerveau et les poumons de ces patients doivent être examinés lors d'une biopsie.

3. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

3.1 Incubation des sérums

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage prédiluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

3.2 Incubation du conjugué

Le conjugué anti-IgG /-IgM /-IgA humaines marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgG / IgM / IgA des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage.

3.3 Réaction du substrat et de la solution stop

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppée après 20 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique (H₂SO₄) 0.5 M dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

3.4 Lecture et interprétation

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique: 600–690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

4. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 2–8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12 barrettes	Barrettes de microtitration	Barrettes sécables de 8 puits coatées avec l'antigène d' <i>aspergillus fumigatus</i> .
1 x	Cadre de microplaque	
4 x 2 mL	Calibrateurs 1–4	Sérums humains contenant des anticorps anti <i>aspergillus</i> (concentrations ci-dessous) dilués dans du PBS et stabilisés avec 0,01 % de méthylisothiazolone et 0,01 % de bromonitrodioxane comme conservateurs, prêts à l'emploi.

		IgG	IgM	IgA
Cal. 1 (négatif)	Concentration (U/mL)	1	1	1
Cal. 2 (seuil)		10	10	10
Cal. 3 (positif faible)		50	30	30
Cal. 4 (positif)		200	60	140

1 x 60 mL	Diluant des sérums	Solution tampon PBS/BSA, contient < 0.1 % d'azoture de sodium comme conservateur, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Conjugué	Conjugué HRP de chèvre anti-IgG /-IgM /-IgA humaines, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Substrat TMB	3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Solution Stop	Acide sulfurique 0.5 M, prêt à l'emploi.
1 x 60 mL	Solution de lavage concentrée 10 x	Solution tampon PBS/Tween concentrée 10 x à diluer au 1:10 avant utilisation; la solution concentrée peut être chauffée à 37 °C pour éviter la formation de cristaux.
2 x	Films adhésifs	pour couvrir les barrettes de la microplaque pendant les incubations.
1 x	Sac plastique	refermable pour éviter l'humidité sur les barrettes non utilisées.

5. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5 µL, 100 µL et 500 µL
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600–690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel: pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

6. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex: eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18–24 °C) avant de commencer le test.
- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Eviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaques soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs Eviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouvert le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Eviter le contact de la solution d'arrêt et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.

7. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2–8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2–8 °C.

Une fois ouvert le kit doit être utilisé dans les 3 mois.

8. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 3 jours à 2–8 °C. Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyperlipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être prédilués au 1:101 dans le diluant des sérums (ex: 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

Les échantillons ayant des concentrations supérieures au plus fort calibrateur doivent être redilués dans le diluant des sérums.

En cas d'interférences avec le facteur rhumatoïde, il est conseillé d'adsorber les échantillons avec l'adsorbant (MASTSORB Code: 651003). **Ne pas adsorber les calibrateurs.**

9. Procédure ELISA

9.1. Préparation des réactifs

Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18–24°C) avant utilisation et bien les mélanger.

Solution de lavage: Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37 °C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au 1:10 avec de l'eau distillée (ex: 60 mL de solution de lavage concentrée + 540 mL d'eau distillée). Mélanger minutieusement

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.
- Conserver les barrettes non utilisées dans leur sac plastique à 2–8 °C.

9.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour les calibrateurs, les contrôles et les échantillons.

Remarque : **D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex: incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.**

1. Déposer 100 µL de chaque échantillon dilué (1:101) et de chaque calibrateur prêt à l'emploi dans les puits appropriés.
2. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 60 minutes.
3. Éliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
4. Déposer 100 µL de conjugué dans chaque puits.
5. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Éliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber pendant 20 minutes dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
10. Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et lire la densité optique à 450 nm. Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600–90 nm est recommandée.

La couleur est stable pendant au moins 60 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.

10. Résultats et interprétation

Exemple

	DO 450 nm	DO nettes	DO moyennes
Blanc	0.018		
Calibrateur 1 (négatif)	0.041/0.037	0.023/0.019	0.021
Calibrateur 2 (seuil)	0.507/0.495	0.489/0.477	0.483
Calibrateur 3 (positif faible)	0.918/0.938	0.900/0.920	0.910
Calibrateur 4 (positif)	2.356/2.317	2.338/2.299	2.319

Le tableau ci-dessus doit être considéré comme un exemple obtenu dans des conditions arbitraires de température et d'environnement. **Il ne s'agit pas des valeurs de référence à retrouver par d'autres laboratoires dans les mêmes conditions!**

10.1. Résultats qualitatifs

Les valeurs de DO nettes calculées pour les sérums des patients sont comparées avec la valeur du calibrateur seuil. Si la valeur de l'échantillon est supérieure à la valeur du seuil, le résultat est positif.

Si la valeur de l'échantillon est inférieure à celle du seuil, le résultat est négatif. Il semble raisonnable de définir une zone de $\pm 20\%$ autour de la valeur du seuil comme zone grise. Il est recommandé de répéter les tests pour les échantillons dont la valeur se situe dans cette zone grise en utilisant le même sérum ou avec un nouvel échantillon prélevé 2 à 4 semaines après. Les deux échantillons peuvent être testés en parallèle dans la même série.

La valeur du calibrateur positif doit être au moins du double de celle du seuil.

10.2 Résultats quantitatifs

Les calibrateurs prêts à l'emploi du coffret MASTAZYME™ ASPERGILLUS ont des valeurs exprimées en unités arbitraires (U/mL). Ceci donne accès à une quantification exacte et reproductible permettant de suivre l'évolution du titre en anticorps. Les concentrations des calibrateurs sont imprimées sur les étiquettes des flacons.

Tracer la courbe étalon en portant les concentrations des calibrateurs sur l'axe des abscisses et la valeur moyenne d'absorbance correspondante sur l'axe des ordonnées. La concentration en anticorps du sérum du patient peut être lue directement sur la courbe.

Le calcul des résultats peut être fait en utilisant un ordinateur et le logiciel correspondant.

11. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME™ ASPERGILLUS IgG / IgM / IgA ELISA ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale.

12. Bibliographie

1. Bodey GP. Eur. J. Clin Microbiol. Infect, 8: 413 (1989).
2. Boeckh M, Höffgen G, Lode H. Dtsch. med. Wschr., 114: 1706 (1989).
3. Kurup VP, Kumar A. Clin. Microbiol. Rev., 4: 439 (1991).
4. Patterson R, Greenberger PA, Halwig JM, Liotta L, Roberts M. Arch. intern. Med, 146: 986 (1986).
5. Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Ann. intern. Med, 86: 405 (1977).
6. Rüchel R. Annals of Hematology 67: 1 (1993).
7. Schaberg T, Mauch H, Lode H. Dtsch. med. Wschr, 117: 1681 (1992).
8. Yu VL, Muder RR, Poorsatter A. Amer. J. Med, 81: 249 (1986).

Notizen / Notes / Note:

Notizen / Notes / Note:

Notizen / Notes / Note:

Hersteller / Manufactured by:
Fabriqué par:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriumspräparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
www.mastgrp.com
mast@mast-diagnostica.de

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
MAST House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
www.mastgrp.com
sales@mastgrp.com

Distribué par:

MAST DIAGNOSTIC
115, Rue Jules Barni
80000 Amiens
France
Tél.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
www.mastgrp.com
service-commercial@mast-diagnostic.fr