



savyonDIAGNOSTICS

96
192

SeroMP™ IgA

REF A263-01

REF B263-01

Trousse pour la détection semi-quantitative par dosage immuno-enzymatique (ELISA) des anticorps IgA anti-*Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain.

IVD



Pour usage professionnel uniquement

CE

A

SeroMP™ IgA

Indications d'utilisation

La trousse SeroMP™-IgA permet la détermination semi-quantitative in vitro des anticorps IgA anti-*Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain, par dosage immuno-enzymatique (ELISA).

La trousse Savyon® SeroMP™ IgA est utilisée comme aide dans le diagnostic d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

Pour Diagnostic *In Vitro*.

Introduction

Mycoplasma pneumoniae est une cause fréquente de pneumonie, qui se caractérise souvent par une apparition progressive de maux de tête, fièvre, malaise, et plus typiquement une toux sèche. *M. pneumoniae* est commun à tous les groupes d'âge, cependant il est plus fréquent dans les vingt premières années de vie et il est rare chez des enfants de moins de quatre ans. Il est reconnu comme étant responsable de plus de 30% des cas de pneumonie (1). On peut retrouver *M. pneumoniae* à l'origine de maladies non respiratoires telles que des manifestations neuroméningées, pancréatiques, ORL et du syndrome neurologique aigu au niveau du tronc cérébral (2).

Etant donné sa grande fréquence, on peut incriminer *M. pneumoniae* en cas de pneumonie, mais les symptômes étant les mêmes pour divers agents pathogènes, d'autres tests sérologiques sont nécessaires au diagnostic (3).

La technique ELISA est sensible, spécifique et permet une différenciation des anticorps spécifiques IgG, IgA et IgM (4).

La concentration des IgM spécifiques dirigées contre les antigènes du *M. pneumoniae* augmente très tôt après le début de la maladie, atteint son maximum en 1 à 4 semaines, puis diminue jusqu'à des valeurs indécélables, en quelques mois (5).

En raison de l'apparition précoce et de la durée de vie relativement courte des anticorps IgM, leur détection, dans un seul échantillon sérique, permet le diagnostic d'une infection aiguë. Les jeunes patients présentent des titres en IgM supérieurs à ceux des adultes (6). Le niveau des IgG augmente plus lentement que celui des IgM, mais reste élevé plus longtemps, par conséquent, une augmentation significative des IgG entre deux échantillons consécutifs prélevés avec un intervalle d'au moins 2 semaines indique une infection en cours ou une ré-infection, même en l'absence d'IgM. Les IgA sont présentes à des concentrations plus élevées chez les patients âgés (5) et sont plus intéressantes que les IgM pour diagnostiquer une infection en cours chez l'adulte (6).

Savyon® Diagnostics Ltd. a développé des trousse ELISA pour le dosage semi-quantitatif des IgG, IgA et IgM permettant le suivi de ces différents anticorps dans le

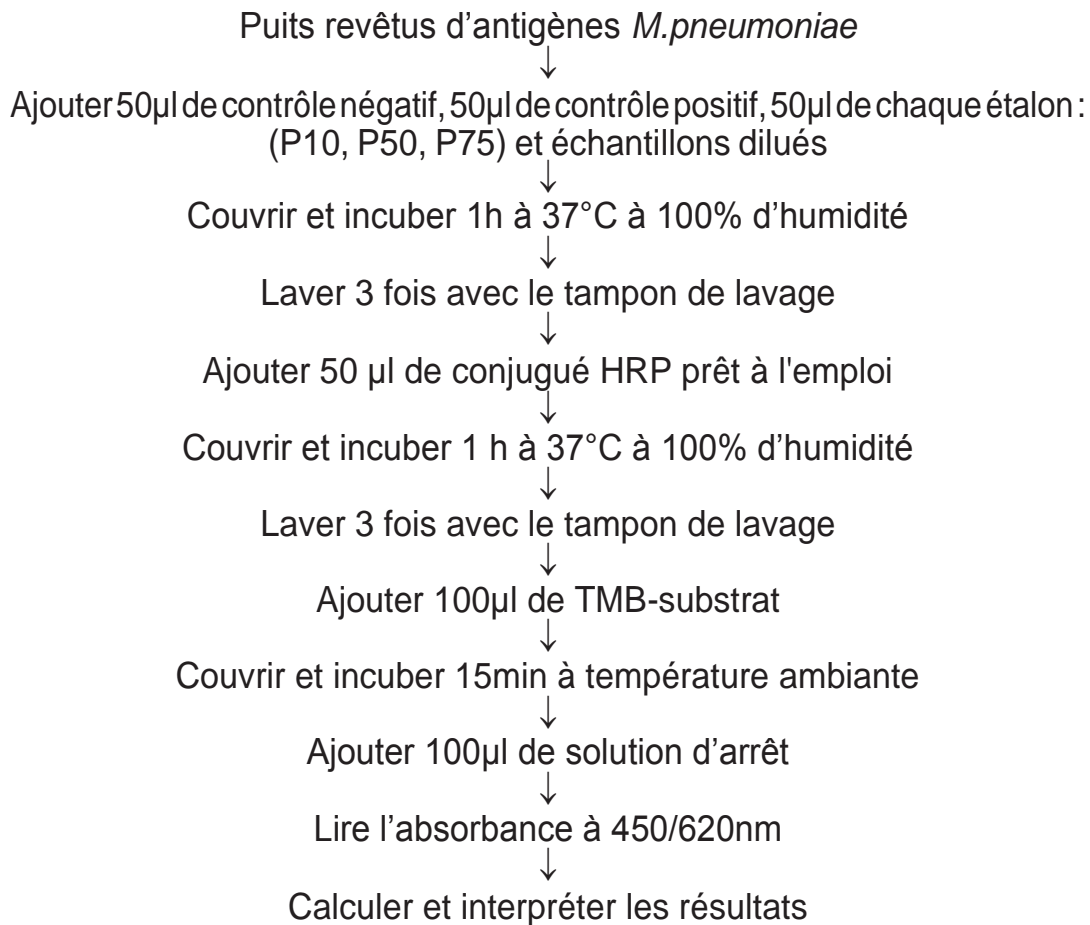
sérum humain. L'antigène utilisé dans les trousse SeroMP™ correspond à une préparation de membrane de *M.pneumoniae* contenant la protéine de membrane P1, très immunogène (7,8,9,10,11).

Les trousse SeroMP™ permettent la détection précoce et précise des anticorps IgG, IgA, IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae*.

Principe du dosage

- Les plaques de microtitration SeroMP™ sont fournies revêtues de fractions purifiées de protéine membranaire du *Mycoplasma pneumoniae*.
 - Le sérum à doser est dilué et mis à incuber dans les puits de la microplaque. Lors de cette étape les anticorps de *M.pneumoniae* vont se fixer aux antigènes des puits.
 - Les anticorps non fixés sont éliminés par lavage.
 - Des immunoglobulines anti-IgA humaines conjuguées à la peroxydase du raifort (HRP) sont ajoutées. Lors de cette étape le conjugué se lie au complexe antigène-anticorps fixé au puits.
 - Le conjugué non lié est éliminé par lavage.
 - Après ajout du TMB-substrat, celui-ci est hydrolysé par la peroxydase, formant ainsi, par réduction du substrat, une réaction colorée bleue.
 - Après ajout de la solution d'arrêt, la coloration bleue vire au jaune et peut ensuite être lue au spectrophotomètre à 450/620nm.
 - L'absorbance est proportionnelle à la concentration en anticorps spécifiques ayant réagi avec les antigènes fixés sur les parois des puits.
-

Procédure de dosage



Contenu de la trousse

Trousse pour 96 déterminations

Réf. A263-01

1. **Microplaque revêtue d'antigène *M.pneumoniae***: 96 puits sécables (8x12) revêtus d'antigènes *M.pneumoniae*, contenus dans un sachet d'aluminium contenant un déshydratant. **1 Plaque**
2. **Tampon de lavage concentré (20X)**: Un tampon PBS - Tween. **1 flacon, 100ml**
3. **Diluant du sérum (bleu)**: Une solution tampon prête à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin comme conservateur. **1 flacon, 60ml**
4. **Contrôle Positif**: Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin et moins de 0,1% d'azide de sodium comme conservateur. **1 flacon, 2,0ml**

5. **Contrôle Négatif:** Sérum humain négatif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin et moins de 0,1% d'azide de sodium comme conservateur. **1 flacon, 2,0ml**
6. **Etalon P10:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient 10 UA/ml d'IgA (unités arbitraires) Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin comme conservateur **1 flacon, 2,0ml**
7. **Etalon P50:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient 50 UA/ml d'IgA (unités arbitraires) Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin comme conservateurs **1 flacon, 2,0ml**
8. **Etalon P75:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient 75UA/ml IgA (unités arbitraires) Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin comme conservateurs **1 flacon, 2,0ml**
9. **Un conjugué HRP prêt à l'emploi (vert):** anticorps IgA anti-humaines (spécifique de la chaîne alpha) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). Contient moins de 0,05% de Proclin utilisé comme agent de conservation. **1 flacon, 10ml**
10. **TMB-Substrat:** Solution prête à l'emploi. Contient 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine comme chromogène et du peroxyde comme substrat. **1 flacon, 14ml**
11. **Solution d'arrêt:** Solution prête à l'emploi. Contient 1M H₂SO₄. **1 flacon, 15ml**
12. **Couvercle pour plaque:** **1 unité**
13. **Manuel d'utilisation:** **1**

Trousse pour 192 déterminations

Réf. B263-01

1. **Microplaque revêtue d'antigène *M.pneumoniae*:** 96 puits sécables (8x12) revêtus d'antigènes *M.pneumoniae*, contenus dans un sachet d'aluminium contenant un déshydratant. **2 Plaques**
2. **Tampon de lavage concentré (20X):** Un tampon PBS - Tween. **2 flacons, 100ml chaque**
3. **Diluant du sérum (bleu):** Une solution tampon prête à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin comme conservateur. **1 flacon, 60ml**
4. **Contrôle Positif:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin et moins de 0,1% d'azide de sodium comme conservateur. **1 flacon, 2,0ml**

5. **Contrôle Négatif:** Sérum humain négatif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin et moins de 0,1% d'azide de sodium comme conservateur. **1 flacon, 2,0ml**
6. **Etalon P10:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient 10 UA/ml d'IgA (unités arbitraires) Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin comme conservateur **1 flacon, 2,0ml**
7. **Etalon P50:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient 50 UA/ml d'IgA (unités arbitraires) Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin comme conservateurs **1 flacon, 2,0ml**
8. **Etalon P75:** Sérum humain positif pour IgA anti-*M.pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient 75UA/ml IgA (unités arbitraires) Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de Proclin comme conservateurs **1 flacon, 2,0ml**
9. **Un conjugué HRP prêt à l'emploi (vert):** anticorps IgA anti-humaines (spécifique de la chaîne alpha) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). Contient moins de 0,05% de Proclin utilisé comme agent de conservation. **1 flacon, 20ml**
10. **TMB-Substrat:** Solution prête à l'emploi. Contient 3, 3', 5, 5' - tétraméthylbenzidine comme chromogène et du peroxyde comme substrat. **1 flacon, 24ml**
11. **Solution d'arrêt:** Solution prête à l'emploi. Contient 1M H_2SO_4 . **1 flacon, 30ml**
12. **Couvercle pour plaque:** **2 unités**
13. **Manuel d'utilisation:** **1**

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Tubes de dosage propres pour la dilution des sérums des patients.
2. Flacon plastique jetable pour la dilution du conjugué HRP concentré.
3. Micropipettes graduées, pipettes multicanaux (5-50, 50-200 et 200-1000 μ l) et embouts jetables.
4. Flacon d'un litre.
5. Eprouvette de 50ml.
6. Bouteille de lavage.
7. Papier absorbant.
8. Agitateur Vortex.
9. Bain marie à 37°C avec couvercle.
10. Lecteur de plaque ELISA avec filtres à 450 et 620nm.
11. Eau distillée ou bidistillée.

Avertissements et Précautions

Pour Diagnostic *In Vitro*

1. Ce kit contient des sérums humains qui ont été testés par des techniques approuvées par la FDA, et CE – Ils ont été trouvés dépourvus d'antigène HBs, d'ac VIH 1 et 2, et anti HCV, comme aucune technique ne peut garantir l'innocuité absolue des matériels testés, ceux-ci doivent donc être manipulés comme potentiellement infectieux- selon les recommandations publiées dans le manuel "Sécurité biologique dans les laboratoires de microbiologie et de biologie médicale, 1988" de CDC/NIH (National Institute of Health - Institut National de la Santé américain).
2. La solution de TMB-Substrat est irritante pour la peau et les muqueuses. Eviter le contact direct.
3. Tous les composants de cette trousse ont été étalonnés et testés par lot. Ne pas mélanger des composants provenant de lots différents.
4. L'acide sulfurique dilué (H_2SO_4 1M) est irritant pour les yeux et la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer à grande eau immédiatement et consulter un médecin.

Conservation et durée de vie des réactifs

1. Tous les réactifs fournis doivent être conservés à 2-8°C. Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur la trousse. L'exposition des composants bouchés ou scellés à température ambiante pendant quelques heures n'affectera pas les réactifs. **NE PAS CONGELER !**
2. Une fois ouverte, la durée de vie de la trousse est de 90 jours.
3. Les barrettes non utilisées doivent être rescellées dans le sachet en aluminium avec les déshydratants, en enroulant le côté ouvert et en fermant fortement avec la bande sur toute la longueur.
4. Il est courant que des cristaux se forment dans le tampon de lavage (concentré x 20) pendant sa conservation au froid. Redissoudre ces cristaux en chauffant le tampon à 37°C avant de le diluer. Une fois dilué, le tampon peut être conservé à 2-8°C pendant 3 semaines.

Prélèvement du sérum

Préparer le sérum à partir d'échantillons prélevés aseptiquement selon les méthodes classiques. Ne pas utiliser du sérum inactivé par la chaleur. L'utilisation de sérum contaminé, trouble ou lipidique est fortement déconseillé. Des particules et des précipités dans le sérum peuvent entraîner des résultats erronés. Clarifier ces échantillons par centrifugation ou filtration avant le dosage.

Conservation

Les échantillons doivent être conservés à 2-8°C et dosés dans les 7 jours (l'addition d'azide de sodium à 0,1% est fortement recommandée). Pour une conservation plus longue, aliquoter les échantillons et les conserver à -20°C. Eviter les décongélations et congélations répétées.

Procédure de dosage - Manuelle

Procédure sur automate disponible sur demande.

A. Préparation des réactifs

1. Porter tous les composants et les échantillons cliniques à température ambiante. Bien mélanger les étalons (P10, P50, P75), le contrôle négatif, contrôle positif et les échantillons avant utilisation.
2. Déterminer le nombre total d'échantillons à tester. En plus de ces échantillons, prévoir pour chaque dosage: un puits pour le blanc, un puits pour le contrôle négatif, contrôle positif et trois puits pour les 3 étalons (P10, P50, P75).
3. Retirer la microplaque de son sachet d'aluminium en coupant l'extrémité de l'emballage. Placer le nombre de puits nécessaires pour le dosage sur le support (selon le nombre d'échantillons à tester).
4. Diluer le tampon concentré au 1/20 avec de l'eau distillée : par exemple pour 1 litre de tampon de lavage, ajouter 50ml de tampon de lavage concentré à 950ml d'eau distillée ou bidistillée.

B. Incubation des sérums et des contrôles

5. Diluer chaque sérum de patient au 1/105 avec le diluant pour sérum comme suit : Ajouter 10µl de sérum de patient à 200µl de diluant pour sérum (1/21), et diluer ensuite en ajoutant 25µl de dilution au 1/21 à 100 µl de diluant du sérum.
6. Distribuer 50µl de blanc (diluant du sérum), de contrôle négatif, contrôle positif, des 3 étalons (P10, P50, P75) et d'échantillon sérique dilué au 1/105 dans les différents puits de la barrette.
7. Couvrir les barrettes avec un couvercle et incuber 1 heure à 37°C en chambre humide.
8. Eliminer le liquide présent dans les puits.
9. **Étapes de lavage:** remplir, à ras-bord, chaque puit avec du liquide de lavage (300-350µl) puis éliminer ce liquide. Répéter encore deux fois, pour un total de trois étapes de lavage.
10. Sécher les puits en les tapotant délicatement sur du papier absorbant.

C. Incubation avec le conjugué

11. Ajouter dans chacun des puits 50 µl d'IgA anti-humaines conjugué à la HRP prêt à l'emploi, couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et incuber pendant 1 heure à 37 ° C dans un incubateur humide.
12. Eliminer le liquide et laver comme dans les étapes 9 et 10.

D. Incubation avec le TMB -Substrat

13. Distribuer 100µl de TMB-substrat dans chaque puits, couvrir les barrettes avec un couvercle et incuber **15 minutes** à température ambiante.
14. Arrêter la réaction par ajout de 100µl de solution d'arrêt (H₂SO₄ 1M) dans chaque puits.

E. Détermination des résultats

15. Déterminer l'absorbance à 450/620nm et enregistrer les résultats. La lecture doit se faire dans les 30 minutes maximum après l'arrêt de la réaction colorée.

Note: *Toute bulle d'air doit être éliminée avant la lecture. Le fond de la plaque ELISA doit être soigneusement essuyé.*

Validation du dosage

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être vérifiés et validés. Si ces critères ne sont pas remplis, le dosage est invalidé et doit être refait.

1. $D.O._{P75} > 0,9$
 2. Rapport: $D.O._{P10} / D.O._{CN} > 1,5$
 3. Rapport: $D.O._{P50} / D.O._{CN} > 4$
 4. Rapport: $D.O._{P75} / D.O._{CN} > 5,5$
 5. Contrôle Positif devra être $\geq 30 \text{ UA/ml}$
-

Calcul des résultats

Méthode manuelle, avec du papier millimétré:

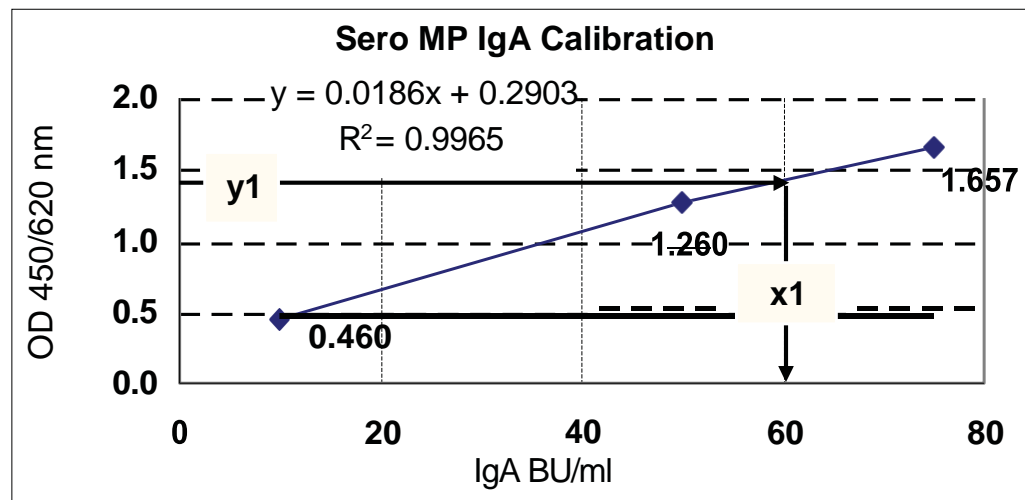
1. Reporter les valeurs d'absorbance (D.O.) des 3 étalons (P10, P50 et P75) en ordonnées en fonction de leur concentration (UA/ml) en abscisses.
2. Tracer, à partir des points, la courbe la mieux adaptée.
3. A partir de la courbe d'étalonnage, interpoler la valeur des concentrations (en UA/ml) des échantillons correspondant à chaque absorbance mesurée (exemple 1).

Exemple 1: Interpolation des résultats:

Lire la valeur d'absorbance des échantillons sur l'axe des ordonnées (Y) et tracer une ligne horizontale jusqu'à la courbe d'étalonnage.

Au point d'intersection de la courbe d'étalonnage, tracer une ligne verticale jusqu'à l'axe des abscisses (X). Lire la concentration de l'échantillon en UA/ml.

Calibrators	IgA BU/ml	OD 450/620 nm
P10	10	0.460
P50	50	1.260
P75	75	1.657
Sample	x1=60	y1=1.408



Interprétation des résultats

IgA UA/ml	Résultat	Interprétation diagnostique
< 10 UA/ml	Négatif Pas d'anticorps IgA détectés	Pas d'infection à <i>M. pneumoniae</i>
≥ 10 UA/ml ≤ 20 UA/ml	Douteux	Doser un deuxième échantillon, prélevé 2-4 semaines après, en parallèle avec le premier. Si le second échantillon est douteux, le résultat doit être considéré négatif
> 20 UA/ml	Positif Concentration significative d'anticorps IgA	Infection à <i>M.pneumoniae</i> en cours ou chronique

Afin d'obtenir un profil d'anticorps complet, les IgM et les IgG devraient également être dosés

Interprétation des résultats à partir de la détection combinée des anticorps IgG, IgM et IgA.

Niveau d'anticorps <i>M.pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	
Négatif	Négatif	Négatif	Pas d'infection à <i>M.pneumoniae</i>
Négatif ou Positif	Positif	Négatif ou P ositif	Infection à <i>M.pneumoniae</i> en cours
Positif	Négatif	Négatif	Infection à <i>M.pneumoniae</i> ancienne ou en cours
Négatif ou positif	Négatif	Positif	Infection en cours ou réinfections

Réactions croisées

Des patients hospitalisés, infectés par des agents pathogènes du tractus respiratoire : *Chlamydia pneumoniae*, *Influenza A.*, *Influenza B.*, *Parainfluenza 1, 2 et 3* ainsi que par *Adenovirus* et *EBV* diagnostiqués par des tests sérologiques commercialisés, ont été aussi étudiés avec la trousse SeroMP. La plupart des sérums ont été trouvés négatifs, il n'a pas été détecté de réactions croisées significatives.

Limites du dosage

1. Le diagnostic final ne doit pas reposer sur le seul résultat sérologique. Toutes les données cliniques et de laboratoire doivent être prises en considération.
2. Les échantillons dosés trop tôt pendant la primo-infection ne contiennent pas toujours d'anticorps décelables. Si une infection à *M.pneumoniae* est suspectée, un second échantillon doit être prélevé 2 à 4 semaines plus tard et dosé en parallèle avec l'échantillon d'origine.
3. Substances interférentes: Il n'est pas conseillé d'utiliser du sérum lipémique, trouble ou contaminé. Du sérum contenant du précipité ou des particules en suspension peut conduire à des résultats erronés. Ces échantillons devraient être clarifiés par centrifugation ou par filtration avant le dosage.

Performances du dosage

Sensibilité et Spécificité

Une étude a été réalisée en utilisant la trousse SeroMP™ IgA et une autre trousse commercialisée, sur 14 sérums provenant de patients hospitalisés atteints de pneumonie et 82 sérums de donneurs de sang sains.

ELISA commercialisée SeroMP™ IgA	Positif	Négatif	Total
Positif	14	1	15
Négatif	0	81	81
Total	14	82	96

Sensibilité: $14/14 \times 100 = 100\%$

Spécificité: $81/82 \times 100 = 98.8\%$

Accord total: $95/96 \times 100 = 99\%$

Précision

Répétabilité (précision Intra-essai)

Echantillon	n	Valeur moyenne	CV%
Positif	10	1,252	4,7%
Négatif	10	0,314	4%

Reproductibilité (précision inter-essais):

Echantillon	n	Valeur moyenne	CV%
Positif	10	0,896	2,6%
Négatif	10	0,285	7,2%

Bibliography

1. Liberman D., Schlaffer F., Boldur I., Liberman D., Horowitz S., Friedman, M.G., Leioninen M., Horowitz O., Manor E. and Porath A. (1996) Multiple pathogens in adult patients admitted with Community - aquired pneumonia, a one year prospective study of 346 consecutive patients Thorax 1996 51: 179-184.
2. Okada T., Kato I., Miho I., Minami S., Kinoshita H., Akao I., Kemmochi M., Miyabe S. and Takeyama I (1996) Acute Sensorimeural Hearing Loss Cause by *M. Pneumoniae* Acute Otolaryngol (Stockh) 1996 522: 22-25
3. Lieberman, D., Shvartzman, P., Lieberman, D., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Hoffman, S., Mosckovitz, R., Ohana, B., Leinonen, M., Luffy, D. and Boldur I. (1998) Etiology of Respiratory Tract Infection in Adults in a General Practice Setting. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17: 685-689.
4. Raisanen S.M. Suni J.I. and Leinikki P.O.: (1980) "Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections by enzyme immunoassay" : J.Clin. Pathol. 33, 836-840.
5. Seggav J.S., Sedmark G.V. and Krup V., (1996) Isotype-specific antibody responses to acute *M. pneumoniae* infection Ann Allergy Asthma Immuno. 77: 67-73.
6. Samra Z., and Gadba R.,(1993) "Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by specific IgM antibodies using a new capture-enzyme-immunoassay; Eur. J. Epidermol. 9: 97-99.
7. Lieberman, D., Lieberman, D., Printz, S., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Ohana, B., Friedman, M.G., Dvoskin, B., Leinonen, M. and Boldur, I. (2003) Atypical Pathogen Infection in Adults with Acute Exacerbation of Bronchial Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 167: 406-410.
8. Lieberman, D., Leibrman, D., Ben-Yaakov, M., Shmarkov, O., Gelfer, Y., Varshavsky, R., Ohana, B., Lazarovich, Z. and Boldur, I. (2002) Serological evidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbation of COPD. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 44: 1-6.
9. Lieberman, D., Leibrman, D., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Ohana, B., Friedman, M.G., Dvoskin, B., Leinonen, M. and Boldur, I. (2003) Age and Ageing 32: 95-101.

10. Lieberman, D., Leibman, D., Koronsky, I., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Friedman, M.G., Dvoskin, B., Leinonen, M. Ohana, B., and Boldur, I. (2002). A comparative study of the etiology of adult upper and lower respiratory tract infections in the community. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 42: 21-28.
11. Lim, T.H., Muhlestein, J.B., Carlquish, J.F., Ohana, B., Lipson, M., Horne, B.D., Anderson, J., L. (2002). *Mycoplasma Pneumoniae* High IgA Titer but Not IgG Predicts Increased Hazard of Death or Myocardial Infarction Among Patients with Angiographically Defined Coronary Artery Disease. Abstract presented at the 51st Annual Scientific Session of the American College of Cardiology, March 17-20, 2002. Atlanta, Georgia.



Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL
Tel.: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com



Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels
Tel: +32.2.732.59.54
Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net