

qPCR-Kit zum Nachweis klinisch relevanter *Candida*-Spezies – 50 Tests

EINLEITUNG

Pilzinfektionen sind weltweit jährlich für ca. 1,4 Millionen Todesfälle verantwortlich (1). Dennoch werden Pilzinfektionen häufig missverstanden und erhalten im Vergleich zu durch Bakterien, Viren und Parasiten verursachten Erkrankungen weniger öffentliche Aufmerksamkeit. Personen mit geschwächtem Immunsystem, wie Krebspatienten und HIV-Patienten, sowie Patienten nach Knochenmark- oder Organtransplantationen, haben das höchste Risiko, eine invasive Pilzinfektion zu entwickeln (2). Die wichtigsten klinisch relevanten Pilzpathogene sind *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* und *Cryptococcus spp.* (3). *Candida* rangiert auf Platz 4 der häufigsten Blutstrominfektionen (4). Patienten mit einer durch *Candida* verursachten Sepsis haben trotz antimykotischer Therapie eine Überlebenschance von nur 60 % (5–11). *Candida* zeigt zunehmend Resistenzen gegenüber Erst- und Zweitlinien-Antimykotika (12). Die wenigen verfügbaren Therapieoptionen sind kostenintensiv und können für bereits geschwächte Patienten toxisch sein.

CandID ist ein Kit, das 2 Multiplex-qPCR-Tests enthält, die jeweils 3 häufig isolierte *Candida*-Spezies nachweisen. *CandID* detektiert *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis*, während *CandID* PLUS *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. dubliniensis* nachweist. Das *CandID*-Kit ist als Hilfsmittel zur Beurteilung und Bewertung von Patienten mit Verdacht auf eine *Candida*-Infektion vorgesehen.

INHALT DES KITS

- CandID* Primer/Sondenmischung (50 REAKTIONEN). (ROTE KAPPE)
FAM-, HEX-, Cy5- und ROX-markiert (siehe Tabelle unten)
- | Target | Fluorophor | Absorption (nm) | Emission (nm) |
|------------------------------|------------|-----------------|---------------|
| <i>C. albicans</i> | FAM | 494 | 518 |
| <i>C. glabrata</i> | HEX | 535 | 556 |
| <i>C. parapsilosis</i> | Cy5 | 646 | 669 |
| Interne Extraktionskontrolle | ROX | 575 | 602 |

Tabelle 1. Inhalt der Primer/Sondenmischung und Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe

- CandID* Positivkontrolle (*C. albicans*/*C. glabrata*/*C. parapsilosis*) (ROTE KAPPE)
- DNA der internen Extraktionskontrolle (IEC) (WEISSE KAPPE)
- qPCR Mastermix (WEISSE KAPPE)
- RNase/DNase-freies Wasser (WEISSE KAPPE)
- CandID* PLUS Primer/Sondenmischung (50 Reaktionen). (BLAUE KAPPE)
FAM-, HEX-, Cy5- und ROX-markiert (siehe Tabelle unten)

Target	Fluorophor	Absorption (nm)	Emission (nm)
<i>C. tropicalis</i>	FAM	494	518
<i>C. krusei</i>	HEX	535	556
<i>C. dubliniensis</i>	Cy5	646	669
Interne Extraktionskontrolle	ROX	575	602

Tabelle 2. Inhalt der *CandID* PLUS Primer/Sondenmischung und Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe

- CandID* PLUS Positivkontrolle (*C. tropicalis*/*C. krusei*/*C. dubliniensis*) (BLAUE KAPPE)

BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE NICHT ENTHALTEN SIND

- qPCR-Gerät
- Pipetten und Spitzen
- Vortex und Zentrifuge
- 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen
- qPCR-Platte und Plattenversiegelungen
- DNA-Extraktionskit

LAGERUNG DES KITS

Das *CandID*-Kit von IMMY sollte bei -20 °C gelagert werden und ist dort ab Herstellungsdatum 18 Monate stabil. Die Komponenten sollten bei 0 °C gelagert werden, dürfen nicht länger als jeweils 30 Minuten Temperaturen über -20 °C ausgesetzt werden, und unnötiges wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Bitte beachten Sie, dass Lichteinwirkung zu einer Photobleichung der fluoreszierenden Reporter führt und somit die Empfindlichkeit des Assays verringert. IMMY empfiehlt, das Kit nicht nach dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum zu verwenden.

GEEIGNETES PROBENMATERIAL

Die DNA sollte aus Kulturmateriel oder geeigneten klinischen Proben extrahiert werden. Gute Laborpraxis empfiehlt die Einbeziehung von mindestens einer positiven und einer negativen Extraktionskontrolle pro Analyse. Extrahierte Proben sollten zur Langzeitlagerung bei -80 °C bis -20 °C aufbewahrt werden. Bitte beachten Sie, dass niedrige DNA-Konzentrationen bei längerer Lagerung instabil sein können. Wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen sollten vermieden werden. Das *CandID*-Kit von IMMY kann mit jeder Probe verwendet werden, die

mit einem für die PCR-Amplifikation geeigneten Nukleinsäure-Extraktionsverfahren aufbereitet wurde. Bitte stellen Sie sicher, dass die Proben hinsichtlich Reinheit, Konzentration und DNA-Integrität geeignet sind. Führen Sie immer mindestens eine negative Kontrolle (ohne Template) zusammen mit den Proben mit. Zur Herstellung einer Negativkontrolle ersetzen Sie die Template-DNA durch RNase/DNase-freies Wasser.

DYNAMISCHER BEREICH DES TESTS

Unter optimalen PCR-Bedingungen erreichen die Primer in den *CandID*-Kits von IMMY Amplifikationseffizienzen von >95 %. Der Test verfügt über einen breiten dynamischen Bereich von mindestens sechs Größenordnungen und ist sensitiv für <1 *Candida*-Genom.

RISIKOANALYSE

Im Herstellungsprozess des *CandID*-qPCR-Kits sind keine gefährlichen Substanzen enthalten. Die Reagenzien des Kits stellen kein bekanntes spezifisches Risiko für den Anwender dar. Für die in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren können zusätzliche Chemikalien und Materialien erforderlich sein. IMMY empfiehlt, alle vom Lieferanten bereitgestellten Warnhinweise, Anweisungen und Sicherheitsdatenblätter sorgfältig durchzulesen. Beim Umgang mit Chemikalien, biologischen Gefahrenstoffen und anderen Materialien sind die allgemeinen Sicherheitsvorschriften zu beachten.

ALLGEMEINE VORSICHTSMAßNAHMEN

- Das *CandID* qPCR-Kit ist nur für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Das Testverfahren ist gemäß der bereitgestellten Gebrauchsanweisung (IFU) durchzuführen. Abweichungen von den beschriebenen Protokollen können zu Testversagen oder fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Beim Umgang mit Proben sind Standardvorsichtsmaßnahmen sowie lokale Labor- und Institutsrichtlinien einzuhalten.
- Niedrige DNA-Konzentrationen können bei längerer Lagerung instabil sein. IMMY empfiehlt, die Lagerzeit der Proben vor den Tests so kurz wie möglich zu halten.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kits dürfen nicht vermischt werden.
- Für jeden der 3-Plex-Assays (*CandID* und *CandID* PLUS) muss eine separate PCR-Vormischung hergestellt werden.
- Die beiden Primer/Sonden-Reagenzien dieses Kits dürfen nicht miteinander vermischt werden.
- Es ist sicherzustellen, dass die jeweils passende Positivkontrolle mit dem entsprechenden Assay verwendet wird (die Röhrchen sind farbcodiert).
- Geben Sie die beiden verschiedenen Vormischungen nicht in dieselbe Reaktionsvertiefung Ihrer PCR-Platte.
- Da beide Tests (*CandID* und *CandID* PLUS) in denselben Fluoreszenzkanälen arbeiten, müssen die Vertiefungen der PCR-Platte eindeutig beschriftet werden, um die jeweiligen Testziele zu unterscheiden.
- Reagenzien unterschiedlicher Hersteller dürfen nicht ersetzt oder kombiniert werden.
- Vermeiden Sie Reagenzienverunreinigungen, indem Sie gute Laborpraxis einhalten und Arbeitsabläufe gegebenenfalls trennen.
- Alle zusätzlich benötigten Verbrauchsmaterialien müssen RNase/DNase-frei sein.
- Tragen Sie bei der Durchführung des Tests Schutzkleidung und Einweghandschuhe.
- Verwenden Sie für alle Pipettievorgänge Einwegfilterspitzen.
- DNA-Proben auf Eis auftauen und auf Eis aufbewahren.
- CandID*-Reagenzien stets vollständig auftauen, gut mischen, kurz zentrifugieren und auf Eis lagern.
- Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

TESTEINSCHRÄNKUNGEN

- Positive Ergebnisse schließen eine Koinfektion mit anderen Organismen nicht aus.
- Die Extraktionseffizienz kann einen negativen Einfluss auf die Ergebnisse des *CandID*-Tests haben. IMMY empfiehlt, die bereitgestellte interne Extraktionskontrolle bei allen Probenextraktionen zu verwenden, um dies zu überwachen.

TESTPRINZIPIEN

ECHTZEIT-PCR

Individuelle Primer- und Probendesigns zum Nachweis von sechs klinisch relevanten *Candida*-Arten (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. dubliniensis*) wurden in zwei separate 4-Plex-Assays kombiniert, und deren DNA kann über die unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle wie im Kit-Inhalt beschrieben nachgewiesen werden.

CandID von IMMY nutzt die am weitesten verbreitete qPCR-Chemie, die auf der Detektion von Licht basiert, das durch hydrolysebasierte Detektionsmoleküle emittiert wird (Abbildung 1).

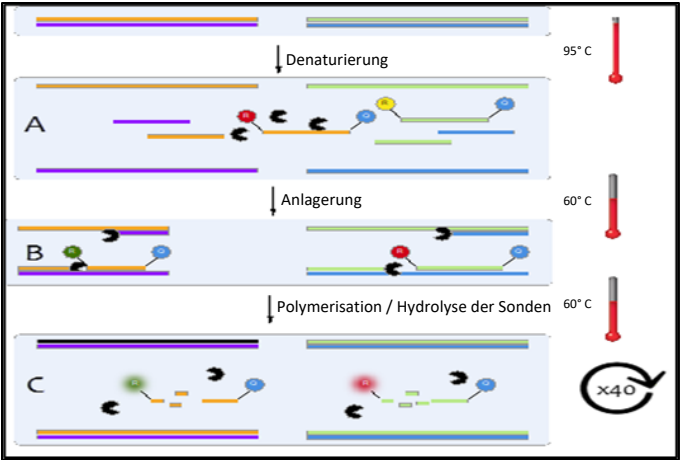


Abbildung 1. Prinzip eines auf hydrolysebasierter Detektion basierenden Tests.
A. Doppelsträngige genomische DNA, dargestellt durch die orangefarbenen und violetten Stränge, wird denaturiert, indem die Probe kurz auf 95°C erhitzt wird. Falls vor der DNA-Extraktion zugesetzt, enthält der Assay zudem eine interne Extraktionskontrolle, dargestellt durch blaue und grüne Stränge. **B.** Während der Anlagerungsphase der PCR wird die Temperatur reduziert, und Forward- sowie Reverse-Primer (kurze farbige Linien) hybridisieren an die komplementäre Ziel-DNA. Die gleiche Reaktionsmischung enthält zudem fluorogene DNA-Oligonukleotide zur Zielsequenzdetektion, die mit einem 5'-Fluoreszenzreporter (R) und einem Quencher (Q) markiert sind. Im Fall des *CandidID*-Kits von IMMY sind diese fluorogenen DNA-Oligonukleotide zur Zielsequenzdetektion spezifisch für (i) *C. albicans* (FAM), *C. glabrata* (HEX), *C. parapsilosis* (Cy5) und die interne Extraktionskontrolle (ROX) unter Verwendung der *CandidID*-Vormischung (ROTE KAPPE) sowie (ii) *C. tropicalis* (FAM), *C. krusei* (HEX), *C. dubliniensis* (Cy5) und die interne Extraktionskontrolle (ROX) unter Verwendung der *CandidID* PLUS-Vormischung (BLAUE KAPPE). **C.** Während der Polymerisationsphase der PCR werden hybridisierte, gebundene fluorogene DNA-Oligonukleotide zur Zielsequenzdetektion durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase (schwarze Kreise) verdrängt und gespalten, was zur physikalischen Trennung von Reporter und Quencher führt. Dies führt zur Emission von Licht bei einer fluorophorspezifischen Wellenlänge (siehe Tabellen 1 und 2), das in den entsprechenden Kanälen eines qPCR-Instruments detektiert werden kann.

POSITIVKONTROLLE

Das Kit enthält 2 Fläschchen mit Positivkontrolle, die jeweils eine Vorlage enthalten, welche drei *Candida* -Arten als Zielwerte spezifiziert, die den Zielwerten des *Cand ID*- und *CandidID* PLUS-Assays entsprechen. Die Positivkontrolle wird wie ein normaler Nukleinsäureextrakt behandelt und zeigt an, dass die Primer und Detektionskomponenten zum Nachweis von *Candida*-Arten im Lauf korrekt funktionieren. Die Verwendung der Positivkontrolle ist vom Anwender abhängig und nicht in jedem Lauf zwingend erforderlich. IMMY empfiehlt jedoch deren Einsatz in jedem Lauf, da sie zusätzliche Sicherheit bietet, insbesondere wenn alle Proben negativ sind. Die Positivkontrolle muss keinem Nukleinsäureextraktionsverfahren unterzogen werden. Es ist darauf zu achten, eine Kreuzkontamination anderer Proben beim Hinzufügen der Positivkontrolle in den Lauf zu vermeiden. Dieses Risiko kann minimiert werden, indem alle anderen Proben und Negativkontrollen vor dem Pipettieren der Positivkontrolle in die entsprechende Vertiefung versiegelt werden.

NEGATIVKONTROLLE OHNE MATRIZEN-DNA (NTC)

Zum Nachweis der Abwesenheit von Kontamination muss in jedem PCR-Lauf mindestens eine Negativkontrolle ohne Matrizen-DNA (NTC) enthalten sein. Für diese Reaktion ist RNase/DNase-freies Wasser anstelle der Template-DNA zu verwenden.

INTERNE EXTRAKTIONS-KONTROLLE (IEC)

Die interne Extraktionskontrolle (IEC) wird hinzugefügt, um echte negative Proben von falsch negativen Proben zu unterscheiden, die durch Nukleinsäureabbau, Fehler im Nukleinsäure-Extraktionsschritt, PCR-Inhibition oder Fehlfunktionen des qPCR-Geräts entstehen können. Die Primer und die Detektionskomponenten sind in der Multiplex-Primer- und -Oligonukleotid-Vormischung enthalten. Die IEC-Vorlage wird entweder dem DNA-Lyse-/Extraktionspuffer oder der Probe zugegeben, nachdem diese im Lysepuffer resuspendiert wurde. IEC ergibt einen Quantifizierungszyklus (Cq)-Wert von >25, wobei die Variation von der Effizienz der Probenaufarbeitung und dem Verdünnungsgrad der Probe abhängt.

TESTPROTOKOLL

Nehmen Sie das *CandidID*-Kit aus dem Gefrierschrank und lassen Sie die Reagenzien auftauen. Auftaute Reagenzien müssen auf Eis gelagert werden. Alle *CandidID*-Reagenzröhrchen vor Gebrauch kurz vortexen und zentrifugieren.

DNA-EXTRAKTION

Die IEC-DNA kann entweder zum DNA-Lysepuffer/Extraktionspuffer oder zur Probe nach deren Resuspension im Lysepuffer hinzugegeben werden. Die interne Extraktionskontrolli-DNA darf NICHT direkt zur unaufgearbeiteten biologischen Probe gegeben werden, da dies zu Degradation und Signalverlust führt.

- 5 µL IEC-DNA zu jeder Probe im DNA-Lysepuffer/Extraktionspuffer geben, für eine Elution in 50 µL. Um in unterschiedliche Volumina zu eluieren, muss das Volumen der IEC-DNA entsprechend angepasst werden.
- Führen Sie die DNA-Extraktion gemäß den vom Hersteller empfohlenen Protokollen durch.

PCR-NACHWEISPROTOKOLL

- Bereiten Sie eine PCR-Vormischung gemäß Tabelle 3 vor. Stellen Sie sicher, dass *Cand ID* und *Cand ID* PLUS Vormischungen separat zubereitet werden.

Die Volumina sind pro Reaktionsvertiefung angegeben und müssen mit der Anzahl der benötigten Vertiefungen multipliziert werden, einschließlich ausreichender Ansätze für Positiv- und Negativkontrollen. Die vorbereitete PCR-Vormischung muss gründlich gemischt und kurz zentrifugiert werden.

Komponente	Volumen/Reaktion
qPCR Mastermix	10 µl
<i>CandidID</i> / <i>CandidID</i> PLUS Primer/Sondenmischung	2 µl
RNase-/DNase-freies Wasser	2 µl
Endvolumen	14 µL

Tabelle 3. *CandidID* / *CandidID* PLUS Assay-Vormischung (Volumen pro Reaktion)
Aufgrund kleinerer Abweichungen bei der Pipettiergenauigkeit wird empfohlen, zusätzlich 10 % des Endvolumens einzuplanen, d. h. wenn Sie zehn Proben untersuchen, stellen Sie ausreichend Reaktionsmischung für 11 Tests her.

- Pipettieren Sie 14 µL der vorbereiteten PCR-Vormischung in jede Reaktionsvertiefung entsprechend dem qPCR-Plattenlayout.
- Bereiten Sie für jede Ihrer Proben DNA-Vorlagen vor (siehe Schritt der DNA-Extraktion).
- Pipettieren Sie 6 µL DNA-Vorlage in jede Vertiefung gemäß Ihrem Plattenlayout.
- Für Negativkontrollen 6 µL RNase/DNase-freies Wasser verwenden. Für Positivkontrollen 6 µL der entsprechenden *CandidID*-/*CandidID* PLUS-Positivkontrolle verwenden. Das Endvolumen pro Vertiefung beträgt 20 µL.

Stellen Sie sicher, dass Ihre PCR-Reaktionsplatte versiegelt und kurz zentrifugiert ist, bevor Sie sie zur Amplifikation in einen validierten Thermocycler geben.

AMPLIFIKATIONS-PROTOKOLL

- Bei Geräten, die ROX als passive Referenz verwenden, muss die passive Referenz deaktiviert oder auf „keine“ gesetzt werden, da die IEC den ROX-Kanal nutzt.
- Anweisungen zur Einrichtung eines Amplifikationslaufs finden Sie in der Bedienungsanleitung Ihres Geräts. Die Amplifikation sollte gemäß den in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen durchgeführt werden.

	Schritt	Zeit	Temperatur
	Enzymaktivierung	2 Min.	95 °C
40 Zyklen	Denaturierung	5 Sek.	95 °C
	Datenerfassung*	20 Sek.	60 °C

* Fluoreszenzdaten werden in diesem Schritt über die FAM-, HEX-, ROX- und Cy5-Kanäle erfasst.

Tabelle 4. PCR-Protokoll

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Informationen zur Bedienung des qPCR-Geräts und zur Durchführung der Datenanalyse finden Sie in der Bedienungsanleitung Ihres Thermocyclers. Sowohl *CandidID*- als auch *CandidID* PLUS-Assays arbeiten in den Kanälen FAM, HEX, ROX und Cy5. Daher ist eine entsprechende Kennzeichnung der Reaktionsplattenvertiefungen erforderlich. Gegebenenfalls ist eine Farbkorrektur im qPCR-System durchzuführen.

Es ist wichtig, die Amplifikationskurven jeder Probe einer Sichtprüfung zu unterziehen, um sicherzustellen, dass die aufgezeichneten Ergebnisse auf eine tatsächliche Amplifikation zurückzuführen sind und nicht auf Hintergrundrauschen, das oberhalb der festgelegten Schwellenwerte aufgezeichnet wurde.

Hinweis: Die unten angegebenen Cq-Schätzwerte wurden unter Verwendung eines Schwellenwerts berechnet, der in der Mitte des log-linearen Bereichs der PCR-Amplifikationskurve liegt.

POSITIVKONTROLLE

Die mitgelieferten Positivkontrollen sollten jeweils charakteristische Amplifikationskurven in den Kanälen FAM, HEX und Cy5 mit einem Cq-Wert von 28 ± 2 aufweisen. Da die Positivkontrolle keine interne Kontrollvorlage enthält, sollte der ROX-Kanal kein Signal anzeigen (flache Verstärkungskurven). Jede Positivkontrolle erzeugt ein Signal, das anzeigt, dass der Assay beim Nachweis der drei Zielarten von *Candida* ordnungsgemäß funktioniert.

NEGATIVKONTROLLE OHNE MATRIZEN-DNA (NTC)

NTC sollte über alle Kanäle hinweg eine gerade Linie (flache Verstärkungsdiagramme) ergeben. Signale in der NTC können auf eine Kreuzkontamination während der Plattenvorbereitung hinweisen.

PROBENDATEN (ZUSAMMENGEFASST IN TABELLE 5 UND 6)

- Eine erfolgreiche Probenaufarbeitung wird durch ein positives Signal im ROX-Kanal (Cq > 25) angezeigt; niedrigere Cq-Werte weisen auf eine effizientere Extraktion hin.
- Ein Signal im FAM/HEX/Cy5-Kanal zeigt das Vorhandensein von *C. albicans*/*glabrata*/*parapsilosis* (*CandidID*) bzw. *C. tropicalis*/*krusei*/*dubliniensis* (*CandidID* PLUS) an. Das Vorhandensein eines Signals in mehr als einem dieser Kanäle deutet auf eine Mischinfektion (gemischte *Candida*-Arten) hin.

3.

Es ist möglich, ein Signal im FAM/HEX/Cy5-Kanal zu erhalten, ohne gleichzeitig ein Signal im ROX-Kanal zu erfassen. In der Regel tritt dies auf, wenn eine hohe Ziellast zu einer frühen Amplifikation (d. h. niedrigen Cq-Werten) führt und die Anreicherung der Ziel-DNA die Amplifikation der IEC-DNA hemmt.
4.

Wenn in keinem der Kanäle ein Signal vorliegt, ist der Assay fehlgeschlagen, und es lassen sich keine Schlussfolgerungen ziehen.

CandID: Nachweiskanäle				
FAM	HEX	Cy5	ROX	Ergebnis
+	-	-	+	C. albicans POSITIVE Probe. IEC BESTANDEN. Gültiges Ergebnis.
-	+	-	+	C. glabrata POSITIVE Probe. IEC BESTANDEN. Gültiges Ergebnis.
-	-	+	+	C. parapsilosis POSITIVE Probe. IEC BESTANDEN. Gültiges Ergebnis.
-	-	-	-	Ungültiges Ergebnis.

Tabelle 5. Zusammenfassung der Ergebnisinterpretation: CandID

CandID PLUS: Nachweiskanäle				
FAM	HEX	Cy5	ROX	Ergebnis
+	-	-	+	C. tropicalis POSITIVE Probe. IEC BESTANDEN. Gültiges Ergebnis.
-	+	-	+	C. krusei POSITIVE Probe. IEC BESTANDEN. Gültiges Ergebnis.
-	-	+	+	C. dubliniensis POSITIVE Probe. IEC BESTANDEN. Gültiges Ergebnis.
-	-	-	-	Ungültiges Ergebnis.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Ergebnisinterpretation: CandID PLUS

LITERATURNACHWEISE

1.

Brown GD *et al.* Sci Transl Med 2012;4(165): 165rv13.
2.

Rüping MJ *et al.* Drugs 2008;68(14): 1941-62.
3.

Schmiedel Y *et al.* Swiss Med Wkly 2016;146: w14281.
4.

Wisplinghoff *et al.* Clin Infect Dis 2004;39: 309-17.
5.

Kollef M *et al.* Clin Infect Dis 2012;54: 1739-1746.
6.

Hadley S *et al.* Crit Care Med 2002;30(8): 1808-14.
7.

Leroy O *et al.* Crit Care Med 2009;37(5): 1612-8.
8.

Guzman JA *et al.* Clin Med Res 2011;3: 65-71.
9.

Charles PE *et al.* Intensive Care Med 2003;29(12): 2162-9.
10.

Nolla-Salas J *et al.* Intensive Care Med 1997;23(1): 23-30.
11.

Bougnoux ME *et al.* Intensive Care Med 2008;34(2): 292-9.
12.

Alexander BD *et al.* Clin Infect Dis 2014;58(5): 754.

VERWENDUNG VON INTERNATIONALEN SYMBOLEN

	Hersteller
	Verwendbar bis
	Lesen Sie die Gebrauchsanweisung
	Chargenbezeichnung
	Produktkennzeichnung
	In-vitro-Diagnostikum
	Reizend
	Bevollmächtigter in der EU

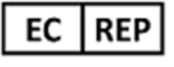
HERSTELLERANGABEN

Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte:



IMMY, Inc.

2701 Corporate Centre Dr.
Norman, OK 73069 USA
+1 (405) 360-4669 / (800) 654-3639
Fax: +1 (405) 364-1058
E-Mail: info@immy.com
www.immy.com

	Advena Ltd. Tower Business Centre, 2 nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta
--	--

© 2026 IMMY. Alle Rechte vorbehalten.