

Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten

Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)
Allgemeine methodenspezifische Anforderungen

DIN
58 967
Teil 20

Serodiagnosis of infectious and immune diseases; indirect immunofluorescencetest (IIFT);
general methodical specific requirements

Inhalt

	Seite		Seite
1 Anwendungsbereich und Zweck	1	8.2 Verdünnungs-, Eindeckungs- und Waschmedium	2
2 Begriffe	1	8.3 Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat	2
2.1 Grundbegriffe	1	9 Durchführung der Untersuchung	3
2.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	1	9.1 Mitführung von Kontrollen	3
2.3 Fluorochrom	1	9.2 Herstellung der Antigenpräparate und Serumverdünnungen sowie Beschicken der antigenbeladenen Objektträger	3
2.4 Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat	1	9.3 Inkubieren und Waschen der Präparate	3
2.5 Verdünnungsmedium	1	9.4 Konjugatzugabe, Inkubieren, Waschen, Eindecken	3
2.6 Eindeckungsmedium	2	10 Auswertung	3
2.7 Waschmedium	2	11 Befundbeurteilung	3
3 Bezeichnung	2	12 Befundmitteilung	3
4 Prinzip der Methode	2	13 Qualitätssicherung	3
5 Untersuchungsgut	2	Zitierte Normen	4
6 Spezielle Ausrüstung	2	Erläuterungen	4
7 Annahme des Untersuchungsgutes	2		
8 Chemikalien und Reagenzien	2		
8.1 Test-, Kontroll-, Referenz-, Kalibrations- und Autoantigene	2		

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für den Nachweis von Antikörpern und Autoantikörpern mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT).

Die Anforderungen gelten für visuell-mikroskopisch auswertende Verfahren. Die mechanisierten Techniken müssen im Hinblick auf die diagnostische Aussage mindestens der bei mikroskopisch-visuellen Verfahren entsprechen.

Der hier beschriebene IIFT stellt methodische Mindestanforderungen dar. Für spezielle Untersuchungen sind weitergehende Anforderungen zu beachten, die in den DIN-Normen der jeweiligen Methode festgelegt sind (z. B. für den IIFT zum Nachweis von Autoantikörpern nach DIN 58 968 Teil 20*).

Zweck dieser Norm ist es, in der Serodiagnostik vergleichbare und reproduzierbare Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen.

2 Begriffe**2.1 Grundbegriffe**

Nach DIN 58 967 Teil 10.

*) Z. Z. Entwurf

2.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) weist die Bindung von Immunglobulinen an Testantigenen nach. Die Bindung wird durch Fluorochrom-markierte Anti-Immunglobuline sichtbar gemacht. Der IIFT dient zum Nachweis von Antikörpern oder Autoantikörpern verschiedener Klassen und Subklassen.

2.3 Fluorochrom

Fluorochrom ist ein Farbstoff, der nach Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge langwelligeres Licht einer anderen definierten Wellenlänge abgibt und der sich zur Konjugation an Proteine eignet.

2.4 Anti-Human-Immunglobulin-Konjugate

Anti-Human-Immunglobulin-Konjugate sind Anti-Human-Globuline bzw. Fragmente daraus, die mit Fluorochromen konjugiert sind.

2.5 Verdünnungsmedium

Verdünnungsmedium ist eine wäßrige und gepufferte Lösung verschiedener Substanzen zur Verdünnung von Reaktionspartnern.

Fortsetzung Seite 2 bis 4

2.6 Eindeckungsmedium

Eindeckungsmedium ist eine wäßrige oder alkoholische Lösung. Es dient zur Bedeckung des mikroskopischen Präparates und zur Stabilisierung des Fluorochromes.

2.7 Waschmedium

Waschmedium ist eine wäßrige gepufferte Lösung. Sie dient zur Ablösung (Auswaschung) nicht antigen gebundener Immunglobuline.

3 Bezeichnung

Bezeichnung der allgemeinen methodenspezifischen Anforderungen an den indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Nachweis von erregerspezifischen Antikörpern und Autoantikörpern

Antikörpernachweis DIN 58 967 – IIFT

4 Prinzip der Methode

Für den IIFT wird das Untersuchungsgut mit einem Festphasen-fixierten Antigen inkubiert und der dort gegebenenfalls gebundene Antikörper in einem zweiten Schritt nachgewiesen. Der Nachweis wird mittels eines Fluorochrom-markierten Anti-Humanimmunglobulin-Konjugates gegen das Patientenimmunglobulin erbracht.

Die Auswertung kann visuell-mikroskopisch oder mechanisiert-fluorometrisch vorgenommen werden. Bei mechanischen Verfahren sind die Anforderungen nach Abschnitt 10 zu erfüllen.

5 Untersuchungsgut

Probennahme, Gewinnung des Serums, Aufbewahrung und Versand des Untersuchungsgutes nach DIN 58 967 Teil 10.

6 Spezielle Ausrüstung

Über die Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10 hinausgehend ist für den IIFT zusätzlich folgende Ausrüstung erforderlich:

- Eichgenaue Pipetten
- Objektträgerhalter und Objektträgerwaschgefäße
- Mikroskopierarbeitsplatz nach DIN 58 941 Teil 6
- Mikroskop mit Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung, ausgerüstet mit einer Quecksilber-Höchstdrucklampe und deren visueller Kontrollmöglichkeit der Brennqualität.
- Filtersysteme (siehe Tabelle 1)
Gleichwertige Fluorochrom-Filtersysteme können verwendet werden.
- Okulare 10 x, Objektive 10 x und 40 x mit möglichst hoher numerischer Apertur.

7 Annahme des Untersuchungsgutes

Nach DIN 58 967 Teil 10.

8 Chemikalien und Reagenzien

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10.

8.1 Test-, Kontroll-, Referenz-, Kalibrations- und Autoantigene

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10.

Zur Bestimmung der Gebrauchsverdünnungen der Testantigene sind, soweit vorhanden, entsprechende spezielle Verfahrensrichtlinien zu beachten. Anderenfalls sind die Verdünnungen mittels positiver und negativer Seren in einer Schachbrett-Titration zu ermitteln.

8.2 Verdünnungs-, Eindeckungs- und Waschmedium

8.2.1 Verdünnungsmedien für Untersuchungsgut

Verdünnungsmedien sind bei pH = 7,2 gepufferte Salzlösungen mit einer Osmolarität von 280 bis 320 m Osmol/l-Lösung.

8.2.2 Verdünnungsmedium für Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat

Entsprechend Abschnitt 8.2.1. Darüber hinaus können zur Kontrasterhöhung Farbstoffzusätze wie z. B. Evans-Blau, zur Verminderung unspezifischer Bindungen Zusätze von Proteinen oder Detergentien verwendet werden.

8.2.3 Eindeckungsmedium

Entsprechend der Definition nach Abschnitt 2.6 können unterschiedliche Rezepte verwendet werden, z. B.:

- Gepuffertes Glycerin
9 Teile Glycerin für Immunfluoreszenz
1 Teil Verdünnungsmedium nach Abschnitt 8.2.1.
- Polyalkohole, die die Fluoreszenzausbleichung vermindern, können verwendet werden.

8.2.4 Waschmedium

Entsprechend Abschnitt 8.2.1.

8.3 Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat

Bei 90% der Konjugat-Moleküle soll der Farbstoffprotein-(Fp)-Quotient zwischen 1 und 3,5 liegen.

Je nach Untersuchungsziel sollten Anti-Human-Immunglobulin-Konjugate menschliche Immunglobuline der Klassen IgG und IgM gleichermaßen erkennen können oder einzeln gegen die μ -, α - oder γ -Kette gerichtet sein.

Spezifische Erfordernisse an die Anti-Human-Immunglobulin-Konjugate hinsichtlich der Definition ihrer Reinheit bei der Serodiagnostik von Immunkrankheiten sind in DIN 58 968 Teil 20*) festgelegt.

Vor Anwendung einer neuen Charge muß die Gebrauchsverdünnung bestimmt werden. Dazu wird eine Schachbrett-Titration durchgeführt. Ein Beispiel dafür ist in der Tabelle 2 dargestellt.

*) Z. Z. Entwurf

Tabelle 1. Filtersysteme

Farbstoff	Erregerfilter	Sperrfilter	Farbteiler
Fluorescein-isothiocyanat	Interferenz-Schmalbandfilter (485 ± 10) nm	Interferenz-Langpaßfilter 515 nm	510 nm
Rhodamin	Interferenz-Schmalbandfilter (546 ± 6) nm	Interferenz-Langpaßfilter 590 nm	580 nm
Texasrot	Interferenz-Bandpaßfilter 530 bis 585 nm	Langpaßfilter 615 nm	600 nm



Documents

Document Sharing Hub