

Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
**Serologische und molekularbiologische Diagnostik
 von Infektions- und Immunkrankheiten**

Teil 20: Allgemeine methodenspezifische Anforderungen an Immunfluoreszenztests (IFT)

DIN

58967-20

ICS 07.100.10

Ersatz für
Replacement for
 DIN 58967-20:1989-07

Medical microbiology and immunology — Diagnostics of infectious diseases and diseases of the immune system in serology and molecular biology — Part 20: General method-specific requirements for immunofluorescence tests (IFT)

Microbiologie médicale et immunologie — Diagnostic des maladies infectieuses et immunitaire en sérologie et biologie moléculaire —
 Partie 20: Exigences générales relative au tests d'immunofluorescence (TIF)

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
Einleitung	3
1 Anwendungsbereich	3
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung der Methode	7
4.1 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	7
4.2 Direkter Immunfluoreszenztest (DIFT)	7
5 Untersuchungsgut	7
6 Spezielle Ausstattung	7
7 Annahme des Untersuchungsguts	8
8 Chemikalien und Reagenzien	8
8.1 Allgemeine Anforderungen	8
8.2 Test-, Kontroll-, und Referenzantigene	8
8.3 Verdünnungsmedium, Eindeckmedium und Waschflüssigkeit	9
8.4 Konjugat	9
9 Durchführung der Untersuchung	11
9.1 Mitführen von Kontrollen	11
9.2 Herstellung der Antigenpräparate und Probenverdünnungen sowie Beschicken der antigenbeladenen festen Phase	11
9.3 Inkubieren und Waschen der Präparate	12
9.4 Konjugatzugabe, Inkubieren, Waschen, Eindecken	12
10 Auswertung	13
10.1 Allgemeines	13
10.2 Nachweis erregerspezifischer Antikörper	13
10.3 Nachweis von Autoantikörpern	14
10.4 Nachweis von Antigenen	14
11 Sensitivität und Spezifität	14
12 Befundbeurteilung	14
12.1 Allgemeines	14
12.2 Nachweis erregerspezifischer Antikörper	14
12.3 Nachweis von Autoantikörpern	14
13 Nachweis von Antigenen	15
14 Befundmitteilung	15
15 Qualitätssicherung	15

Contents

	Page
Foreword	2
Introduction	3
1 Scope	3
2 Normative references	4
3 Definitions	4
4 Concise description of the methodology	7
4.1 Indirect immunofluorescence assay (IIFA)	7
4.2 Direct immunofluorescence assay (DIFA)	7
5 Test material	7
6 Special equipment	7
7 Reception of the test materials	8
8 Chemicals and reagents	8
8.1 General requirements	8
8.2 Test, control and reference antigens	8
8.3 Diluent, fixative medium and washing solution	9
8.4 Conjugate	9
9 Performance of the assay	11
9.1 Inclusion of controls	11
9.2 Preparation of the antigen samples and sample dilutions as well as the application of the solid phase with fixed antigen	11
9.3 Incubation and washing of the preparations	12
9.4 Addition of conjugates, incubation, washing, fixation	12
10 Evaluation	13
10.1 General	13
10.2 Detection of pathogen-specific antibodies	13
10.3 Detection of autoantibodies	14
10.4 Detection of antigens	14
11 Sensitivity and specificity	14
12 Interpretation of results	14
12.1 General	14
12.2 Detection of pathogen-specific antibodies	14
12.3 Detection of autoantibodies	14
13 Detection of antigens	15
14 Report of findings	15
15 Quality assurance	15

Fortsetzung Seite 2 bis 15

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss E 9 „Serologische und molekulare Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. erarbeitet.

DIN 58967 *Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten* besteht aus:

- Teil 10: *Begriffe, Allgemeine Anforderungen*
- Teil 20: *Allgemeine methodenspezifische Anforderungen an Immunfluoreszenztests (IFT)*
- Teil 30: *ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay); Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen*
- Teil 40: *Immunoblot (IB); Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen*
- Teil 50: *Agglutinationsreaktionen; Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen (zz. in Vorbereitung)*
- Teil 60: *Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen*
- Teil 61: *Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (rt-PCR); Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen (zz. in Vorbereitung)*

Änderungen

Gegenüber DIN 58967-20:1989-20 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Redaktionelle Überarbeitung;
- b) Anpassung der Festlegungen an den neuen Stand der Wissenschaft;
- c) Aufnahme zusätzlicher Farbstoffe und Filtersysteme;
- d) Anpassung des Haupttitels an den erweiterten Anwendungsbereich der Reihe der Normen DIN 58967;
- e) Anwendung um den „Direkten Immunfluoreszenztest“ erweitert;
- f) Untertitel erweitert.

Frühere Ausgaben

DIN 58967-20: 1989-07

Foreword

This standard was drafted by the Technical Committee E 9 “Diagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system in serology and molecular biology” of the department for medical standards (Normenausschuss Medizin (NAMed)) of the German Institute for Standardization (DIN Deutsches Institut für Normung e.V.).

DIN 58967 *Diagnostics of infectious diseases and diseases of the immune system in serology and molecular biology* consists of:

- Part 10: *Concepts, general requirements*
- Part 20: *General method-specific requirements for Immunofluorescence assay (IFT)*
- Part 30: *ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay); Terms, general method-specific requirements*
- Part 40: *Immunoblot (IB); Terms, general method-specific requirements*
- Part 50: *Agglutination reactions; Definitions, general method-specific requirements (presently under preparation)*
- Part 60: *Polymerase chain reaction (PCR); Terminology, general method-specific requirements*
- Part 61: *Polymerase chain reaction after reverse transcription (rt-PCR); Terminology, general method-specific requirements (under preparation)*

Amendments

In comparison to DIN 58967-20:1989-20 the following amendments were made:

- a) Editorial revision;
- b) adaption of the provisions to the scientific state of art;
- c) incorporation of additional dyes and filter systems;
- d) adaption of the main title to the enlarged scope of the standards of the series DIN 58967.
- e) incorporation of Direct immunofluorescence assay
- f) adaption of the subtitle

Previous editions

DIN 58967-20: 1989-07

Einleitung

Der Immunfluoreszenztest (IFT) ist eine Methode, die sich seit einigen Jahrzehnten beim Nachweis von Infektionserregern und Antikörpern für die Analyse der Immunität und der Exposition bewährt hat. Beispiele sind das Auffinden von *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Chlamydia* und *Legionella*. Auch wenn die Methode des IFT einfach durchzuführen ist, kann sie für die Antigenbestimmung durch die sensitivere Nukleinsäure-Testung ersetzt werden.

Beispiele für das Testen von Antikörpern sind *Bartonella*-Infektion und Statusbestimmung bei EBV-Infektion über die Klassen IgM und IgG. Auch beim Antikörpernachweis ersetzen alternative Tests wie ELISA und Immunoblot den IFT, weil sie einfacher abzulesen und quantifizierbar sind. Die Bedeutung der Aussage eines IFT wird jedoch offenbar, wenn singuläres Antigen (z. B. pp65 von CMV) oder komplexes Antigen (z. B. *Legionella*) durch IFT nachgewiesen und so eine kausale Therapie ermöglicht wird. Das Erkennen von Antikörpern gegen zelluläre Strukturen (z. B. ANA und AMA) für die Autoantikörperdiagnostik ist immer noch eine der Anwendungsgebiete des IFT.

Diese Norm befasst sich im Wesentlichen mit den technischen Parametern der Erkennung von Infektionen. Dem Untersucher verbleibt, anhand seiner Erfahrung spezifische und unspezifische Strukturen zu unterscheiden und mit Hilfe der erhaltenen Bilder, Kontrollen und Serumverdünnungen zu beurteilen, wie die Fluoreszenz zu einer Infektion oder klinischen Diagnose passt.

Zweck dieser Norm ist es, bei der Anwendung des IFT in der Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten des Menschen vergleichbare und reproduzierbare Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für den Nachweis von Antikörpern und Antigenen mittels Immunfluoreszenztest (IFT) und definiert methodische Mindestanforderungen.

Die Anforderungen gelten für visuell-mikroskopisch auszuwertende Verfahren. Fluorometrische Techniken sind in dieser Norm nicht berücksichtigt. Für spezielle Untersuchungen sind weiter gehende Anforderungen zu beachten, die in den DIN-Normen der jeweiligen Methode festgelegt sind (z. B. für den indirekten Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Autoantikörpern nach DIN 58968-20).

Introduction

Since some decades the Immunofluorescence assay (IFA) has been a proven method for the detection of infectious agents and antibodies for analyzing immunity and exposition. Examples are the detection of *Toxoplasma*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Chlamydia* and *Legionella*. Although the IFA is a simple technique, it can be replaced for the detection of antigens by the more sensitive nucleic acid testing method.

Examples for the testing of antibodies are the *Bartonella* infection and the status determination with EBV infection over the classes IgM and IgG. For the detection of antibodies, too, the IFA is replaced by alternative assays such as ELISA and immunoblot as they are easier to read and to quantify. The importance of the evidence of an IFA becomes, however, obvious in cases where singular antigen (e.g. pp65 of CMV) or complex antigen (e.g. *Legionella*) is detected by IFA and thus enables a causal therapy. The identification of antibodies against cellular structures (e.g. ANA and AMA) for the diagnosis of autoantibodies is still one of the domains of the IFA.

This standard basically deals with the technical parameters for the detection of infections. It remains with the investigator to distinguish, based on his experience, between specific and unspecific structures and to assess by means of the obtained pictures, controls and serum dilutions how the fluorescence is related to an infection or a clinical diagnosis.

1 Scope

This standard applies to the detection of antibodies and antigens by means of the immunofluorescence assay (IFA) and defines methodological basic requirements.

The requirements apply to methods to be evaluated visual-microscopically. Fluorometric techniques are not considered in this standard. For specific applications of this procedure additional requirements are to be observed which are specified in the DIN standards of the respective method (e.g. for the indirect immunofluorescence assay for the detection of autoantibodies according to DIN 58968-20).

Zweck dieser Norm ist es, bei der Anwendung des IFT in der Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten des Menschen vergleichbare und reproduzierbare Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 58959-4, *Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie — Teil 4: Anforderungen an lichtmikroskopische Untersuchungen*.

DIN 58967-10, *Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten — Teil 10: Begriffe, allgemeine Anforderungen*.

DIN 58967-30:1999-08, *Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten — Teil 30: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay); Begriffe, Allgemeine methodenspezifische Anforderungen*.

DIN 58968-20, *Immunologie — Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Immunkrankheiten — Teil 20: Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT); Spezielle Anforderungen zum Nachweis von Autoantikörpern*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die in DIN 58967-10 angegebenen und die folgenden Begriffe.

3.1 Immunfluoreszenztest (IFT)

Verfahren, bei dem die spezifische Bindung von Antikörpern an Antigene durch die Beteiligung von Fluorochrom-markierten Antikörpern oder Antigenen an der Reaktion durch Erkennung der induzierten Fluoreszenz sichtbar gemacht wird

The purpose of this standard is to enable comparable and reproducible test results when using IFA in the diagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system of the human.

2 Normative references

This standard incorporates by dated and undated references, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendments or revision. For undated references the latest edition of the publication referred to applies (including amendments).

DIN 58959-4, *Quality management in medical microbiology — Part 4: Requirements for investigations using light microscopes*.

DIN 58967-10, *Diagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system in serology and molecular biology — Part 10: Concepts, general requirements*.

DIN 58967-30:1999-08, *Diagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system in serology and molecular biology — Part 30: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay); Terms, general method-specific requirements*.

DIN 58968-20, *Immunology — Serological and molecular biological diagnosis of immune diseases — Part 20: Indirect immunofluorescence assay (IIFA); Specific requirements for the detection of autoantibodies*.

3 Definitions

For the purpose of this standard the definitions according to DIN 58967-10 and the following apply:

3.1 Immunofluorescence assay (IFA)

method in which the specific binding of antibodies to antigens through the participation of fluorochrome-labeled antibodies or antigens to the reaction is visualized by the detection of induced fluorescence

3.2**Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)**

Immunfluoreszenztest, bei dem Antikörper aus der Probe durch Bindung an Testantigene nachgewiesen werden. Die Bindung wird durch Fluorochrom-markierte Antikörper, die gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichtet sind, sichtbar gemacht

ANMERKUNG Mit dem IIFT können Antikörper verschiedener Klassen und Subklassen nachgewiesen werden.

3.3**Direkter Immunfluoreszenztest (DIFT)**

Immunfluoreszenztest, bei dem Ziel-Antigene aus der Probe durch Bindung eines Fluorochrom-markierten Testantikörpers nachgewiesen werden

3.4**Fluorochrom**

Substanz, die nach Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge Licht einer anderen Wellenlänge abgibt und sich z. B. zur Konjugation an Proteine oder Nukleinsäuren eignet

3.5**Antigen-/Antikörper-erkennendes Konjugat für IFT**

definierter Fluorochrom-Protein-Komplex, der an Antigene oder Antikörper bindet. Protein kann Antigen oder Antikörper sein; beim IIFT handelt es sich um ein Antikörper-erkennendes Antikörper- oder Antigen-Konjugat. Beim DIFT handelt es sich um ein Ziel-Antigen erkennendes Antikörper-Konjugat

3.6**Komplement-erkennendes Konjugat für IFT**

Fluorochrom-Protein-Komplex, der über Komplementaktivierung gebundene Komplementkomponenten erkennen kann. Nachweis der gebundenen Antikörper über Fluorochrom-markierte Komplementfixation ist ebenfalls möglich

3.7**Verdünnungsmedium für IFT**

wässrige, gepufferte Lösung verschiedener Substanzen zur Verdünnung von Reaktionspartnern, welche die Bindung der Reaktionspartner nicht beeinträchtigt

3.8**Eindeckmedium für IFT**

Wässriges oder alkoholisches Medium zum Bedecken und Stabilisieren des mikroskopischen Präparates

3.9**Waschflüssigkeit für IFT**

wässrige, gepufferte Flüssigkeit zum Auswaschen nicht gebundener Reaktionspartner und anderer nicht spezifisch an der Reaktion teilnehmender Komponenten

3.2**Indirect Immunofluorescence assay (IIFA)**

Immunofluorescence assay in which antibodies in the sample are detected by binding to test antigens. The binding is visualized through fluorochrome-labeled antibodies which are directed against the antibodies to be detected

NOTE Antibodies of different classes and subclasses can be detected by means of IIFA.

3.3**Direct Immunofluorescence assay (DIFA)**

Immunofluorescence assay in which target antigens in the sample are detected by binding a fluorochrome-labeled test antibody

3.4**fluorochrome**

substance which after stimulation with light of a defined wave length emits light of another wave length and is suitable e.g. for conjugation to proteins or nucleic acids

3.5**antigen-/antibody-detecting conjugate for IFA**

specified fluorochrome-protein complex which binds to antigens or antibodies; protein can be antigen or antibody. The IIFA is an antibody-detecting antibody or antigen conjugate whereas the DIFA is a target antigen-detecting antibody conjugate

3.6**complement-detecting conjugate for IFA**

fluorochrome-protein complex which is able to detect bound complement components by complement activation. The detection of bound antibodies by means of fluorochrome-labeled complement fixation is also possible

3.7**Diluent for IFA**

aqueous, buffered solution of various substances for the dilution of reaction partners without interfering with the binding of the reaction partners

3.8**fixative for IFA**

aqueous or alcoholic medium for the fixation and stabilization of the microscopic preparation

3.9**washing solution for IFA**

aqueous, buffered solution for the washing of non-bound reaction partners and other components that are not specifically incorporated in the reaction