

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

**Contents**

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

Fortsetzung Seite 2 bis 15

## 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).