



# ZYMUTEST™ Anti-VIII Monostrip IgG

Ref RK039A



www.hyphen-biomed.com



ELISA test pro stanovení protilátek proti Faktoru VIII (FVIII), IgG isotyp

155, rue d'Eragny  
95000 NEUVILLE SUR OISE  
FRANCE  
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10  
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36  
info@hyphen-biomed.com

Revize:12/2021

## POUŽITÍ:

ZYMUTEST™ Anti-VIII Monostrip IgG souprava je kvalitativní nebo kvantitativní sendvičový ELISA test pro stanovení autoprotilátek a alloprotilátek typu IgG proti Faktoru VIII v lidské plazmě.

## INFO:

ZYMUTEST™ Anti-VIII Monostrip IgG souprava měří specificky lidské auto a allo protilátky IgG typu proti Faktoru VIII. Reagují s imobilizovaným rekombinantním Faktorem VIII, bez ohledu na to jestli jsou neutralizující, nebo ne. IgM a IgA izotypy nejsou měřeny. Protilátky proti Faktoru VIII se mohou vyskytovat u hemofilie typu A s inhibitory a u získaných deficiencí Faktoru VIII<sup>1-7</sup>.

## PRINCIP:

Reděné vzorky jsou pipetovány do jamek s navázaným rekombinantním FVIII. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky (auto nebo allo), naváží se na znehynbný Faktor VIII. Následuje promývací krok. Po promytí jsou detekovány navázané IgG protilátky pomocí polyklonální koží protilátky IgG (Fcy specifický) s navázanou peroxidázou (HRP), která je specifická proti lidským protilátkám IgG. Po dalším promytí je přidán peroxidázový substrát, 3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidin (TMB) spolu s peroxidem vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a vytvoří se modrá barva. Barva se změní na žlutou po přidání zastavovacího roztoku – kyseliny sírové. Intenzita zbarvení přímo odpovídá množství protilátek proti FVIII typu IgG přítomných ve vzorku.

## REAGENCIE:

- COAT; ELISA proužky:** obsahuje 4 proužky po 8 jamkách, potažených lidským Faktorem VIII, stabilizovaným, každý proužek je balen individuálně v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem.
- SD-Anti-VIII; Diluent vzorku:** 2 lahvičky s obsahem 12 ml diluentu vzorku pro auto-immunitní stanovení (Anti-FVIII diluent vzorku) připraveného k použití. Obsahuje koží sérum.
- C+; Pozitivní kontrola:** 4 lahvičky pozitivní kontroly (Anti-VIII IgG kontrola), lyofilizováno. Po rozpuštění s 0,5 ml Diluentu vzorku (SD-Anti-VIII) jsou kontroly připraveny k použití (již ředěny 1:100). Obsahuje BSA.
- C-; Negativní kontrola:** 4 lahvičky negativní kontroly, lyofilizováno. Po rozpuštění s 0,5 ml Diluentu vzorku (SD-anti-VIII) je kontrola připravena k použití (již ředěna 1:100). Obsahuje normální lidskou ředěnou plazmu.
- IC; Immunokonjugát (Anti-IgG(Fcy)-HRP immunokonjugát):** 4 lahvičky immunokongujátů, lyofilizováno. Purifikované polyklonální koží protilátky specifické na lidské IgG-Fcy, navázané na HRP. Po rozpuštění s 2 ml diluentu konjugátu (CD) je immunokonjugát připraven k použití. Obsahuje BSA.
- CD; Diluent konjugátu:** 1 lahvička po 10 ml diluentu, připravena k použití. Obsahuje BSA.
- WS; Promývací roztok:** 2 lahvičky po 12 ml promývacího roztoku, 20krát koncentrovaného.
- TMB; 3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidine:** 1 lahvička po 10 ml diluentu, připraveno k použití. Obsahuje peroxid vodíku.
- SA; 0,45M Kyselina sírová (Stop solution):** 1 lahvička po 3 ml, připraveno k použití.

## VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Jedná se o produkt biologického původu, proto s ním musí být zacházeno s opatrností jako s potenciálně infekčním.
- V případě kontaminace se TMB substrát změní barvou na žlutou. V tomto případě musí být znehodnocen a musí se použít nová lahvička.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Užijte komponenty pouze z kitu stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kitů o různých šaržích v jednom testu.
- S reagenциemi zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Pokud je možné, snižte odpar reagenциe zmenšením plochy kontaktu reagenциe se vzduchem. Odpařování snižuje stabilitu reagenциe v analyzátoru.
- Pro zajištění dostatečné stability uzavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami.
- Studie stability trvající 3 týdny při 30°C prokázaly, že reagenциe může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.
- Bovinní sérový albumin (BSA) byl připraven z bovinní plazmy, která byla testována na nepřítomnost infekčních agens a byla odebrána od zvířat bez BSE.
- Pouze pro použití In Vitro.

SA: H290: U kovů může způsobit korozi.  
WS: H317: Může vyvolat kožní alergické reakce.

## PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Alespoň 30 minut před použitím vytemperujte reagenциe na pokojovou teplotu. Skladujte nepoužitá reagenциe při 2 – 8°C. Lahvičky jsou uzavřeny pod vakuem. Abyste předešli ztrátě lyofilizátu, otevřete lahvičky opatrně.

- COAT:** Otevřete hliníkové pouzdro a vyjměte proužek pro analýzu. Pokud jsou mimo pouzdro, musí být testovací proužky použity do 30 minut.
- SD-Anti-VIII:** Připraven k použití. Reagenциe Azid sodný. Stabilita otevřené reagenциe v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 4 týdny při 2-8°C
- C+:** Rozpusťte každou lahvičku s přesně 0,5 ml diluentu vzorku (SD-Anti-VIII), dobře promíchejte, dokud se obsah nerozpustí. Rozpuštěná reagenциe je připravena k použití a odpovídá plazmě obsahující IgG izotop auto-protilátky Faktoru VIII, již ředěné 1:100. Stabilita rozpuštěné reagenциe v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 2 týdny při 2-8°C

- C-:** Rozpusťte každou lahvičku s přesně 0,5 ml diluentu vzorku (SD-Anti-VIII), dobře promíchejte, dokud se obsah nerozpustí. Rozpuštěná reagenциe je připravena k použití a odpovídá negativní plazmě, již ředěné 1:100. Stabilita rozpuštěné reagenциe v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 2 týdny při 2-8°C
- IC:** Každá lahvička musí být rozpuštěna se 2 ml diluentu konjugátu (CD) alespoň 15 minut před použitím. Nechte částečky kompletně rozpustit. Stabilita rozpuštěné reagenциe v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
  - 4 týdny při 2-8°C
- CD:** Připraven k použití. Stabilita reagenциe v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 4 týdny při 2-8°C
- WS:** Podle potřeby inkubujte lahvičku ve vodní lázni při 37°C dokud se zcela nerozpustí pevné částečky. Promíchejte lahvičku a naředte požadovaný objem v poměru 1:20 v destilované vodě (obsah lahvičky 12 ml dovoluje získat 240 ml promývacího roztoku). Stabilita reagenциe v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci a odpařování:
  - Nerozpuštěná – 4 týdny při 2-8°C
  - Rozpuštěná – 7 dní při 2-8°C
- TMB:** Připraven k použití. Obsahuje oksylisčenou vodu. Stabilita reagenциe po otevření v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 4 týdny při 2-8°C
- SA:** Zastavovací roztok obsahuje 0,45M kyseliny sírové, připraven k použití. Stabilita otevřené reagenциe v originálním balení, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování:
  - 4 týdny při 2-8°C

## SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Nepoužitá reagenциe skladujte při 2 – 8 °C v originálním balení. V doporučených skladovacích podmínkách je souprava použitelná do data spotřeby, uvedeného na obalu.

## REAGENCIE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

### Reagenциe:

Destilovaná voda.

### Materiál:

8-kanálová pipeta nebo rozplňovací pipeta 50 – 300 µl.  
Pipety o různých objemech od 0-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl.  
Promývačka mikrotitračních ELISA destiček a třepačka.  
ELISA Reader s vlnovou délkou 450 nm.

## ODBĚR VZORKU:

Během přípravy a skladování vzorků dodržujte lokální předpisy.

### Vzorek:

Lidská plazma odebraná z citrátového antikoagulantu nebo EDTA lidská plazma. Skladovací podmínky jsou stejné jako s citrátovanou plazmou.

### Odběr

Krev (9 objemů) musí být odebrána do citrátů sodného (1 objem, 0,109M) přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

### Centrifugace

Do 2 hodin po odběru použijte metodu ve vaší laboratoři validovanou pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2 500 g a v pokojové teplotě 18-25°C. Plazma musí být stočena do plastové zkumavky.

### SKLADOVÁNÍ PLAZMY:

- 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 6 měsíce při -20°C

Vzorek plazmy rozmrazujte rychle při 37°C, promíchejte a ihned testujte. Zamíchejte po rozmrazení a před testováním.

## PROVEDENÍ:

### Provedení testu:

1. Kontroly jsou připravené k použití (již ředěné 1:100).

2. Naředte vzorky s puřem Diluentem vzorků (SD) podle tabulky níže:

Vzorek	Ředění
Plazma	1:100

Pokud má vzorek vysoký počet protilátek FVIII, ředte 1:200 nebo 1:400. Získání výsledku se pak musí násobit 2x nebo 4x.

3. Odeberte proužek z hliníkového pouzdra a dejte je do příslušného rámečku. Do jamek ELISA destičky přidávejte reagenциe podle postupu níže:

Reagent	Objem	Testovací krok
Anti-VIII IgG Pozitivní kontrola nebo negativní kontrola nebo 1:100 ředěný vzorek nebo Diluent vzorku (blank)	200 µl	Pipetujte: Pozitivní kontrolu nebo Negativní kontrolu nebo Ředěný vzorek nebo Diluent vzorku

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz



		do jamek mikrodestičky
<b>Inkubujte 60 minut v pokojové teplotě (18-25°C) (a)</b>		
<b>Promývací roztok</b> (20x ředěný destilovanou vodou)	<b>300 µl</b>	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (b)
<b>Konjugát (anti-IgG (Fcγ)-HRP</b> Immunokonjugát, rozpuštěný v 2 ml diluentu konjugátu	<b>200 µl</b>	Okamžitě po promytí, pipetujte Anti-IgG(Fcγ)-HRP <b>immunokonjugát</b> do jamek destičky
<b>Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (a)</b>		
<b>Promývací roztok</b> (20x ředěný destilovanou vodou)	<b>300 µl</b>	Proveďte 5 promytí za použití promývačky (b)
<b>TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrát</b>	<b>200 µl</b>	Okamžitě po promytí pipetujte substrát do jamek. Pozn.: pipetování substrátu, řádek za řádkem musí být v přesných časových intervalech (c)
<b>Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (a)</b>		
<b>0,45 M Kyselina sírová</b>	<b>50 µl</b>	Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sírové zastavíte rozvoj barvy. (c)
<b>Počkejte 10 minut, aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorbanci při 450 nm (A450). Odečtěte hodnotu blanku. (d)</b>		
<b>Poznámky:</b>		
a) Nenechávejte destičku na přímém slunci během doby inkubace a zvláště pak během vývoje zbarvení. Můžete použít třepačku ELISA.		
b) Nikdy nenechávejte destičku prázdnou mezi přidáním reagentů nebo po promytí. Následující reagent musí být přidán do 3 minut, aby se zabránilo vyschnutí destičky – poškodilo by navázané komponenty. Pokud je nezbytné, udržte destičku naplněnou promývacím roztokem a vyprázdněte až před pipetováním další reagentie. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala destičku jemně. Je nutné se vyhnout příliš energickému vyprázdnění jamek, aby se neshnula reaktivita destičky.		
c) Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku.		
d) Pro bichromatický odečet může být užita referenční vlnová délka 690 nm nebo 620 nm.		

#### **KVANTITATIVNÍ METODA:**

Protilátky na FVIII IgG mohou být měřeny kvantitativně, pokud se použije pozitivní kontrola jako kalibrátor. Koncentrace pozitivní kontroly jsou v AU/ml, specifické pro každou šarži reagentie. Tyto koncentrace jsou uvedeny v letáku přiloženém ke každému balení. Standardní roztok se získá ve zkumavkách sérii dvoukrokových ředění s 200 µl pozitivní kontroly a 200 µl Diluentu Vzorku od C:1 do C:16. Ostatní kroky jsou obdobné kvalitativní metodě.

#### **Kalibrační křivka:**

Stanovte koncentraci protilátek FVIII (v AU/ml) a vynesete ji na osu X. Odpovídající absorbanci (OD 450) vynesete na osu Y a vykreslete kalibrační křivku (best fit).

**Pro měření koncentrace anti-VIII protilátek** je třeba kalibrační křivka vytvořená pro danou sérii testů. Z křivky odečtete přímo koncentraci protilátek FVIII v testovaném vzorku. Pokud používáte vyšší poměr ředění vzorku, musí být **výsledek násoben použitým poměrem**.

Alternativně může být použit analytický software (Dynex, Biolise, atd.) pro stanovení (best fit) křivky a výpočtu výsledku.

#### **VALIDACE:**

Pozitivní a negativní kontroly jsou v soupravě a umožňují validaci správného průběhu testu. Předpokládané hodnoty OD pro pozitivní a negativní kontroly se mohou lišit mezi šaržemi, ale v případě, že je test proveden za pokojové teploty (18 - 25°C), jsou pokaždé:

Kvalitativní metoda:

**OD<sub>450</sub> pro pozitivní kontrolu ≥ 1,0**

**OD<sub>450</sub> pro negativní kontrolu ≤ 0,15**

Kvantitativní metoda:

**Koncentrace pro negativní kontrolu ≤ 12 AU/ml**

Získané hodnoty pro pozitivní a negativní kontroly při 20±1°C jsou uvedeny pro každou šarži na letáku přiloženém k soupravě.

Získané hodnoty OD<sub>450</sub> se mohou lišit podle teploty během průběhu testu.

#### **KONTROLA KVALITY:**

Užití kontrolních plazem umožňuje ověření kalibrační křivky stejně tak jako homogenity reaktivity testu mezi sériemi při použití stejné šarže reagentie.

Kontrola kvality by měla být provedena pro každou novou sérii, podle dobrých laboratorních praktik, aby bylo možné validovat výsledky. Nová kalibrace by měla být provedena při nové šarži reagentie, po každé významné údržbě nebo opravě přístroje, nebo když jsou výsledky kontrolních materiálů mimo přijatelné rozmezí.

Každá laboratoř by si měla ověřit vlastní přijatelné rozmezí pro vlastní podmínky.

#### **VÝSLEDEK:**

- Výsledky kvalitativní metody jsou vyjádřeny v OD<sub>450</sub> pro pozitivní a negativní kontroly.
- Výsledky kvantitativní metody jsou vyjádřeny s koncentrací Anti-VIII pozitivních kontrol.
- Pro vyšší ředění musí být použit dodatečný ředící faktor pro výpočet výsledků.

#### **INTERPRETACE VÝSLEDKŮ:**

##### **Kvalitativní metoda:**

Pokud je měření prováděno při 20±1°C, výsledky jsou:

**Pozitivní: OD<sub>450</sub> > 0,30**

**OD<sub>450</sub>: 0,15 < Šedá zóna ≤ 0,30**

**Negativní: OD<sub>450</sub> ≤ 0,15**

##### **Kvantitativní metoda:**

Pokud je měření prováděno při 20±1°C, výsledky jsou:

**Pozitivní: ≥ 24 AU/ml**

**12 AU/ml < Šedá zóna < 24 AU/ml**

**Negativní: ≤ 12 AU/ml**

**Distributor:** Diagnostica s.r.o, Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz), [www.diagnostica.cz](http://www.diagnostica.cz)



Pokud není pokojová teplota v doporučeném rozmezí, hodnoty absorbance mohou být ovlivněny. Pozitivní kontrola může být použita pro nastavení cut-off hodnoty. Přiložený leták uvádí hodnotu OD<sub>450</sub> získanou pro pozitivní kontrolu soupravy ZYMUTEST™ Anti-VIII MonoStrip IgG. Tato hodnota je v % OD<sub>450</sub>, odpovídající cut-off. Upravená hodnota cut-off pak odpovídá % absorbance naměřené pro pozitivní kontrolu v dané sérii testů.

#### **LIMITY:**

- Pro získání optimálního výkonu testu, který dodržuje specifikace, procesní instrukce validované společností HYPHEN BioMed musí být striktně dodrženy. Jakékoliv změny instrukcí postupu musí být validovány laboratoři.
- Jakékoliv reagentie s neobvyklým vzhledem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazeny.
- Jakékoliv vzorky vykazující známky kontaminace nebo jiné podezřelé znaky musí být vyřazeny.
- Jakékoliv plazma s koagulátem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazena.
- Pokud není promývací krok proveden správně, negativní kontrola může vykazovat vyšší hodnotu absorbance. Abyste předešli nespecifickému vývoji barvy, zkontrolujte, zda je promývací krok proveden dobře.
- Stejně tak jako u jiných autoimunitních testů, klinické situace jako záněty, infekční choroby, autoimunitní onemocnění, imunitní komplexy, vysoké koncentrace IgG ve vzorku mohou indukovat vysoký background, díky kterému je pak výsledek v šedé zóně nebo slabě pozitivní. V tom případě je potřeba provést kontrolní stanovení novým vzorkem odebraným v časovém odstupu.

#### **APLIKACE:**

- Hemofilie A je často způsobena vrozeným nedostatkem Faktoru VIII, ale i získané formy deficienci (kvůli inhibitorům FVIII) Faktoru VIII mohou být pozorovány, většinou ve vyšším věku. Pacienti, kteří mají získanou formu deficiencie, mohou prodlávat vážné krvácivé epizody, aniž by měli historii krvácivých problémů. I když je tato porucha vzácná, způsobuje vysokou chorobnost a úmrtnost.
- Protilátky (ne všechny) dokáží neutralizovat FVIII a mohou být alloprotilátky proti exogennímu FVIII nebo autoprotilátky.
- Inhibitory Faktoru VIII exogenního původu jsou IgG alloprotilátky, které vzniknou během náhradní terapie u 25 až 50 % pacientů s těžkou formou hemofilie A. Hydrolyza Faktoru VIII jeho protilátkami obsahuje mechanismus inaktivace Faktoru VIII.
- Inhibitory se mohou objevit i u pacientů bez hemofilie, i když vzácně, v těchto případech:
  1. Idiopatické stavy u jinak normálních starších jedinců.
  2. Autoimunitní porucha jako je systematický lupus erythematosus, revmatoidní artritida, atd.
  3. Karcinomy jako jsou lymfoproliferativní poruchy, lymfomy a solidní nádory.
  4. Reakce na medikamenty jako penicilin, chloramphenicol, phenytoin, atd.
  5. Těhotenství a porodní stav.
- Rizikové faktory rozvoje protilátek jsou:
  1. Vážnost hemofilie. Pacienti s těžkou formou hemofilie mají mnohem vyšší riziko tvorby protilátek, jelikož jsou vystaveni většímu množství terapie FVIII.
  2. Věk pacienta a míra vystavení FVIII: 15-20% intenzivně léčených dětí s hemofiili si do 20 let věku vyvinou protilátky.
  3. Genetické defekty, které jsou příčinou absence syntézy FVIII proteinu. Tito pacienti mají větší riziko tvorby protilátek po léčbě FVIII koncentráty.
- Charakteristika protilátek proti Faktoru VIII
  1. Většina inhibitorů FVIII jsou IgG protilátky, konkrétně pak IgG4 podtřída.
  2. Jsou zde dva hlavní typy protilátek
    - Typ I – Přítomny při klasické hemofilii. FVIII inhibitory následují lineární kinetiku.
    - Typ II – Tyto autoprotilátky a jejich projevy mají komplexní vzory inhibice.
  3. Protilátky jsou identifikovány jejich schopností neutralizovat FVIII při 37°C po inkubaci 2–3 hodin.

#### **NÁVAZNOST TESTU:**

Test detekuje neutralizující a non-neutralizující protilátky proti FVIII. Neutralizující efekt musí být potvrzen dodatečnými testy. Obtížné v identifikaci koexistence neutralizujících protilátek FVIII a lupus antikoagulant (LA) jsou hlavně způsobeny interferencí LA a anti-FVIII testy. Vyvinuli jsme enzymaticky spojený imunoturbidimetrický test (ELISA) metody, která používá rekombinantní Faktor VIII bez fosfolipidů jako antigen. Náš cíl bylo odhalit přítomnost anti-VIII protilátek za použití systému, který není ovlivněn LA.

#### **CHARAKTERISTIKA:**

Dynamické rozmezí: 0 až 300AU/ml.

Detekční limit: ≤ 5 AU/ml.

Intra-assay CV: ≤10%.

Inter-assay CV: ≤10%.

#### **REFERENCE:**

1. Werwitzke S. *et al.*, Diagnostic and prognostic value of factor VIII binding antibodies in acquired hemophilia A: data from the GTH-AH 01/2010 study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 14: 940-947, 2016.
2. Franchini M. and Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors. *Blood*. 112(2):250-5, 2008.
3. Shetty S. *et al.*, An ELISA assay for the detection of factor VIII antibodies - comparison with the conventional Bethesda assay in a large cohort of haemophilia samples. *Acta Haematol*. 109(1):18-22, 2003.
4. Towfighi F. *et al.*, Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. *Acta Haematol*. 114(2):84-90, 2005.
5. Peerschke EI *et al.*, Laboratory assessment of factor VIII inhibitor titer: the North American Specialized Coagulation Laboratory Association experience. *Am J Clin Pathol*. Apr;131(4):552-8, 2009.
6. Krudysz-Amblo J. *et al.*, Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. *Blood*. 113(11):2587-94, 2008.
7. Giangrande P. Acquired hemophilia. *Treatment of hemophilia*. 38:1-7, 2012.

#### **SYMBOLY:**

Použité symboly a znaky jsou uvedeny v seznamu ISO standard 15223-1, viz dokument definice symbolů.