

VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot

(T. pallidum IgG LINE-16)

objednací číslo: WE150G16

(T. pallidum IgG LINE-32)

objednací číslo: WE150G32

VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot

(T. pallidum IgM LINE-16)

objednací číslo: WE150M16

(T. pallidum IgM LINE-32)

objednací číslo: WE150M32

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Německo

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Webové stránky: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu.....	3
3. Obsah balení.....	3
3.1 Souprava pro 16 analýz	3
3.2 Souprava pro 32 analýz	3
3.3 Ctrl set (control set): Available as accessory	3
4. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů	4
5. Preventivní opatření a varovná upozornění.....	4
6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně).....	4
7. Vyšetřovaný materiál	5
8. Provedení testu	5
8.1 Příprava vzorků	5
8.2 Příprava reagensů.....	5
8.3 Provedení testu Imunoblot	5
8.4 Použití analyzátorů Imunoblot.....	6
9. Vyhodnocení testu	6
9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů	6
9.2 Použití hraniční kontroly Cut off	6
9.3 Význam antigenů	7
9.4 Kritéria vyhodnocení	7
9.5 Omezení testu	7
10. Literatura.....	8

1. Účel použití

Testovací souprava (kit) Line Immunoblot slouží ke kvalitativnímu prokázání protilátek IgG, popř. IgM, specifickým vůči *Treponema pallidum* v lidském séru. Tato souprava může být použita při rozšířené diagnostice syfilis jako potvrzující test, pokud je výsledek předchozího orientačního testu sporný nebo pozitivní.

2. Princip testu

Bílkoviny patogenu (antigeny) jsou speciální technikou přeneseny ve formě pásků na nitrocelulóзовou membránu. Nitrocelulóзовá membrána je potom rozstříhána na jednotlivé proužky.

Inkubace nitrocelulóзовých proužků nesoucích antigen se vzorky lidského séra/plazmy umožňuje prokázat stávající specifické protilátky. Po odstranění nenavázaných protilátek promytím jsou jednotlivé nitrocelulóзовé proužky inkubovány s alkalickou fosfatázou konjugovanou s protilátkami proti lidským IgG popřípadě IgM. Po odstranění nenavázaného konjugátu promytím zviditelní se vytvořené imunokomplexy antigen-protilátka reakcí se substrátem, který působením enzymu vytváří modrofialově zbarvené proužky v místě lokalizace imunokomplexu. Reakce enzym-substrát se zastaví promytím nitrocelulóзовých proužků destilovanou vodou / deionizovanou vodou. Podle vytvořeného spektra pásků na membráně, odpovídajících jednotlivým antigenům lze usuzovat na přítomnost specifických protilátek třídy IgG popřípadě IgM proti těmto antigenům.

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 16 analýz

1. IgG popř. IgM Nitrocelulóзовé testovací proužky s antigeny, zesílené fólií, setříděné v sešitku, připravené k použití	1x	16 proužků
2. Kontrola hraniční (cutoff) IgG popř. IgM , lidské sérum, předem zředěný	1x	1,0 ml
3. Ředící roztok/promývací pufr , pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris	1x	50 ml
4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s koží protilátkou proti lidským IgG nebo IgM (100 x konc.)s konzervačním prostředkem	1x	0,7 ml
5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití	1x	57 ml
6. Protokolovací list k záznamům a archivování výsledků	1x	1 kus

3.2 Souprava pro 32 analýz

1. IgG popř. IgM Nitrocelulóзовé testovací proužky s antigeny, zesílené fólií, setříděné v sešitku, připravené k použití	2x	16 proužků
2. Kontrola hraniční (cutoff) IgG popř. IgM , lidské sérum, předem zředěný	1x	1,0 ml
3. Ředící roztok/promývací pufr , pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris	2x	50 ml
4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s koží protilátkou proti lidským IgG nebo IgM (100 x konc.)s konzervačním prostředkem	1x	0,7 ml
5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití	1x	57 ml
6. Protokolovací list k záznamům a archivování výsledků	1x	1 kus

3.3 Ctrl set (control set): Available as accessory

T. pallidum IgG LINE Ctrl-Set WN150K60

T. pallidum IgM LINE Ctrl-Set WN150K80

IgG nebo IgM	ovládací prvky připravené k použití	Zkratka
0,5 ml IgG, nebo 0,5 ml IgM	neg. ctrl. / negativní kontrola, lidské sérum/plazma se stabilizátory bílkovin a konzervační látkou, připraveno k použití	NEG
1,0 ml IgG, nebo 1,0 ml IgM	Vypnutí klávesy Ctrl. / Cut off control, lidské sérum/plazma se stabilizátory bílkovin a konzervační látkou, připravené k použití	CO
0,5 ml IgG, nebo 0,5 ml IgM	poz. Ctrl. / pozitivní kontrola, lidské sérum/plazma se stabilizátory bílkovin a konzervační látkou, připravené k použití	POS

Pozitivní pásma > mezní pásma lze převzít z dodaného certifikátu.

Negativní kontrola nevykazuje žádné pásy nebo žádné pásy relevantní pro hodnocení > cut off band..

4. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů

Testovací soupravu přechováváte při 2 až 8°C. Upotřebitelnost jednotlivých složek je vyznačena na jejich štítcích, upotřebitelnost soupravy (datum expirace- viz příslušný certifikát o kontrole kvality).

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmrznout a nevystavujte je vysokým teplotám.
2. Reagensie nepoužívejte po uplynutí jejich data upotřebitelnosti.
3. Neponechávejte reagensie na přímém světle.
4. Roztok substrátu BCIP/ NBT je citlivý na světlo a musí být přechováván ve tmě..
5. **Nitrocelulóзовé testovací proužky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými proužky opět pevně uzavřete a přechováváte při teplotě 2 až 8°C. K archivaci výsledků by měly být nitrocelulóзовé testovací proužky bezpodmínečně chráněny před přímým slunečním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
testovací proužky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v současně dodaném sáčku)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zředění (připravený k použití)	nebo pokojová teplota	2 týdny

5. Preventivní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra jsou využívána pouze séra, která byla testována a sledována negativně na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Přesto by měla být kontrolní séra, vzorky, zředěné vzorky, konjugáty a nitro-celulóзовé testovací proužky považována za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práci v laboratořích..
2. Při provádění imunoblotu je třeba používat jednorázové rukavice a pinzetu z umělé hmoty.
3. Likvidace použitého materiálu se uskutečňuje podle specifických směrnic platných v konkrétní zemi použití.
4. Inkubační vaničky jsou výrobcem koncipovány pouze pro jedno použití. Vícenásobné použití těchto inkubačních vaniček je na zodpovědnosti uživatele. Při event. vícenásobném použití doporučujeme inkubační vaničky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyčistit a důkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)

1. Inkubační vaničky (v případě potřeby lze objednat pod objednacím číslem WE300.08)
2. Vertikální třepačka, případně s naklápěním (ne rotační!)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Špičky mikropipet
7. Zkumavky na vzorky objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umělé hmoty

9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrační papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulancií), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

8. Provedení testu

Předpokladem dosažení správných výsledků je přesné dodržování pracovních pokynů.

8.1 Příprava vzorků

1. Na vzorek pacienta je zapotřebí 15 µl séra nebo plazmy.
2. Vzorky krve by měly být odebírány asepticky venepunkcí. Po úplné koagulaci je třeba sérum oddělit (u plazmy odpadá). Pro delší přechovávání musí být séra zmrazena na - 20°C.
3. Séra se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.
4. Séra, která byla tepelně inaktivována nebo jsou lipémicky, hemolyticky nebo mikrobiálně kontaminována mohou vést k chybným výsledkům a neměla by být proto používána.
5. Nepoužívejte zakalená séra (zejména po roztání pokud byla zmrazená), popřípadě se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), čirý supernatant odpipetujte a použijte při testu.

8.2 Příprava reagensí

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE a EcoBlot v jednom testovacím cyklu se stejnými časy inkubace a komponenty různých parametrů z různých šarží. Cut off kontroly se provádějí podle parametrů a šarže.
2. Před zředováním koncentrovaných reagensí se musí vytemperovat na teplotu místnosti. Používejte pouze destilovanou vodu / deionizovanou vodu vysoké kvality a pracujte při teplotě místnosti.
3. Zředěné roztoky před použitím dobře promíchejte.
4. **Zředovací / promývací pufr**
Ředící roztok/promývací pufr je k dispozici v 10ti násobné koncentraci. Ředící roztok/promývací pufr se ředí v poměru 1:10 destilovanou nebo deionizovanou vodou (10ml/50ml/100ml koncentrátu + 90ml/450ml/900ml A. dest./deioniz.), dobře promíchat.
Koncentrovaný i naředěný ředící/promývací pufr může vykazovat žluté zabarevení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkčnost ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG popř. IgM**
Konjugát 1 + 100 nařeďte finálně zředěným zředovacím / promývacím pufr a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředování konjugátu (bod: „Schéma průběhu testu“).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití..

8.3 Provedení testu Immunoblot

Pozor : Nitrocelulózové testovací proužky smějí být testovány pouze ve schválené (povolené) třídě Ig (viz etiketu na sešitku Blot a označení na každém jednotlivém testovacím proužku).

Pro správné provedení a posouzení *Treponema pallidum* LINE musí být při každém testu současně provedena Cut off kontrola odpovídající parametrům a šarži.

Pro spolehlivou diagnostiku bakterie *treponemy pallidum* by měl být v testu LINE proveden průkaz protilátek třídy IgG a IgM

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom proužku do žlábků čisté inkubační vaničky. Proužků se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředovací / promývací pufr** a vložte na třepačku.. Dbejte na to, aby nitrocelulózové testovací proužky byly kapalinou pokryty stejnoměrně. Proužky nesmějí během celého provádění testu oschnout.

4. Zesílené nitrocelulózové testovací proužky se během minuty zcela navlhčí a mohou být inkubovány v poloze zadní stranou dolů, přední stranou dolů nebo v poloze na straně.
5. Na každých **15µl séra/plazmy pacienta** či **100µl pozitivní / negativní kontroly Cut off** pipetujte, pokud možno na horním, označeném konci proužku. Pacientovo sérum a kontrolu nechte **30 minut** inkubovat na třepačce.. Při pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci ostatních vzorků.
6. Zcela odsajte kapalinu ze žlábků nebo opatrně odlijte. Při odlévání kapaliny zůstanou nitrocelulózové testovací proužky ulpělé na dně žlábků. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.
7. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství čerstvého zředěného konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **zředěného konjugátu** do žlábků s proužky a inkubujte **30 minut** na třepačce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků.
11. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do žlábků a nechte vyvíjet zbarvení na **třepačce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odlitím roztoku substrátu. Dále promýjte proužky bez meziinkubace **3 x** vždy 1,5 ml **destilované nebo deionizované vody**.
15. Odlijte destilovanou nebo deionizovanou vodu a nechte proužky oschnout na čistém filtračním papíře. Zabarvení pozadí, které lze pozorovat u vlhkých nitrocelulózových testovacích proužků, se u oschlých proužků zcela ztrácí. Zesílené nitrocelulózové testovací proužky vyžadují v porovnání s obvyklými nitrocelulózovými testovacími proužky trochu více času, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte připojený vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých proužků na protokolu a přímo na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátorů Imunoblot

Pro automatické zpracování Blot a LINE jsou schváleny tyto přístroje: Apollo a Profiblot. V zásadě jsou vhodné všechny automaty Blot obvyklé na trhu.

9. Vyhodnocení testu

Je spolehlivému vyhodnocení je každý z proužků LINE vybaven dvěma kontrolami:

1. kontrolou séra

Pouze po inkubaci se sérem pacienta se pod označovací linií objeví pruh inkubace séra.

2. kontrolou konjugátu

Pásek LINE je vybaven kontrolním pásem konjugátu, který se zobrazí po inkubaci s odpovídajícím konjugátem.

Provedení testu je platné, pokud je na vyvolaných nitrocelulózových proužcích zřetelně rozeznatelná jak kontrola séra tak i interní kontrola konjugátu.

Polohu kontrolního pásu séra a konjugátu najdete na protokolu..

9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů

Polohu a označení reakčních pruhů zjistíte v protokolovacím listu.

pruhy IgG a IgM: TpN47, TmpA, TpN17, TpN15

9.2 Použití hraniční kontroly Cut off

Pruhy, jejichž intenzita je slabší než pruhů Cut off (Tpn 47) hraniční kontroly Cut off, nejsou do vyhodnocení zahrnovány. Pruhy TpN47 musí vykazovat slabou intenzitu.

Posuzování intenzity pruhů:

Pruhy TpN 47: Intenzita pruhů TpN 47 hraniční kontroly Cut off stanovuje zhodnocení všech bílkovinných pruhů tříd IgG a IgM takto:

- Nižší intenzita než pruhu TpN 47 hraniční kontroly Cut off = 0
- Stejná intenzita jako pruhu TpN 47 hraniční kontroly Cut off = 1
- Silnější intenzita než pruhu TpN 47 hraniční kontroly Cut off = 2

Ze součtu intenzit pruhů vyplývá celkové posouzení.

9.3 Význam antigenů

Soupis použitých rekombinantních bílkovin antigenu *Treponema pallidum* (5, 6).

Antigen / označení	Význam antigenů	Specifičnost protilátek v testu LINE
TpN47	Detektor pro primární, sekundární a latentní syfilis (5, 6)	vysoce specifické pro všechna stádia infekce
TmpA (TpN44,5)		
TpN17		
TpN15		

Upozornění : Kombinace vysoc e specifických antigenů, které jsou uvedeny v tabulce, se zaměřuje na podmínky patentů (držitel patentů S. Krell) číslo: DE 195 36 166 C1 a EP 0 855 032 B1, a směrnice k sérologické diagnostice syfilidy, MIQ 2001: syfilis (Hagedorn) (4).

9.4 Kritéria vyhodnocení

Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologické údaje a další laboratorní nálezy, které jsou k dispozici.

posouzení IgG		posouzení IgM	
součet intenzit proužků	interpretace	součet intenzit proužků	interpretace
< 3	negativní	< 2	negativní
= 3	nápadný (*)	= 2	nápadný (*)
> 3	pozitivní	> 2	pozitivní

(*): Při "nápadném" nálezu by měl být vyžádán druhý vzorek séra a/nebo by měl být proveden jiný testovací postup.

9.5 Omezení testu

1. Negativní výsledek testu Blot přesto zcela nevylučuje možnost infekce vyvolané *Treponema pallidum*. Vzorek mohl být odebrán před vznikem protilátek nebo titr protilátek leží pod průkazní hranici tohoto testu.
2. V málo četných případech mohou séra pacientů vykazovat "inverzní" proužky (tmavé pozadí, bílé proužky); tyto nemohou být vyhodnocovány, to znamená že test Immunoblot nelze v těchto případech vyhodnotit. Sérum by mělo být vyšetřeno jinými sérologickými metodami.
3. Nelze učinit diagnostický závěr ohledně neurosyfilidy a novorozenecké syfilidy, protože k evaluaci nebyla k dispozici odpovídající séra, popřípadě vzorky moku.
4. Na základě vysoké homologie DNA *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* (syfilida), *endemicum* (endemická syfilida) a *pertenue* (frambézie, yaws), částečně i *Treponema carateum* (pinta) lze očekávat křížové reakce. To pro aplikaci sérologických testů znamená, že není možné diferenciální diagnózou oddělit nevenerické treponematózy (4).
5. U pacientů s latentní syfilidou (*Lues latens*) může v ojedinělých případech docházet k diskrepančním výsledkům mezi 19S-IgM-FTA-ABS a rekombinantními testy Blot nebo také EIAs. Příčina těchto diskrepancí zatím není známa.
6. Při interpretaci výsledků IgM, které jsou izolovaně s mezními hodnotami popř. pozitivní, u gravidních žen, je nutno zohlednit možnost přítomnosti multi-reaktivních protilátek IgM. Tyto výsledky by měly být prokázány dalšími testy (19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) nebo testem VDRL).

10. Literatura

1. Lukehart, S.A., and C.M. Marra. 2007. Isolation and Laboratory Maintenance of *Treponema pallidum*. Curr. Protoc. Microbiol. Chapter 12:Unit 12A.1
2. Peeling R.W., and E.W. Hook. 2006. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. J. Pathol. 208(2):224-32.
3. Scotti, A.T., and L. Logan. 1968. A specific IgM antibody test in neonatal congenital syphilis. J. Pediatr. 73:242-243.
4. H.-J. Hagedorn, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, MiQ 2001 (16):1-40
5. Gerber, A., S. Krell, and J. Morenz. 1996-7. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology, Immunobiology. 196(5):535-49
6. Sambri, V., et al. 2001. Western Immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of Syphilis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. (8). 3:534-539
7. Alfen, I., and H.J. Wellensiek. 1994. Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. Lab. Med. (18):12-19

10. Schéma provedení testu

Provedení testu

inkubace vzorků	30 minut	15 µl séra/plazmy pacienta / 100 µl kontrola v 1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
inkubace s konjugátem	30 minut	1,5 ml p zředěného konjugátu (1 + 100)
promývání	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	1,5 ml zředovacího / promývacího pufru destilovanou / deionizovanou vodou
inkubace se substrátem	10 ± 3 minut	1,5 ml roztoku substrátu
zastavení vývoje barvy	3 x bez meziinkubace	1,5 ml destilované / deionizované vody

Tabulka ředění konjugátu : (zaokrouhleně)

počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředovací / promývací pufr	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrovaný konjugát	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
konečný objem	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

počet proužků	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
zředovací / promývací pufr	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrovaný konjugát	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
konečný objem	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

počet proužků	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
zředovací / promývací pufr	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrovaný konjugát	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
konečný objem	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

počet proužků	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
zředovací / promývací pufr	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrovaný konjugát	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
konečný objem	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml