

VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot

(T. pallidum IgG LINE-16)

N° articolo: WE150G16

(T. pallidum IgG LINE-32)

N° articolo: WE150G32

VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot

(T. pallidum IgM LINE-16)

N° articolo: WE150M16

(T. pallidum IgM LINE-32)

N° articolo: WE150M32

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH

Löwenplatz 5

D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 13.11.2018

REV 17 / VIROTECH T. pallidum IgG & IgM LINE Immunoblot IT

Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test.....	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit per 16 determinazioni	3
3.2 Kit per 32 determinazioni	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi	3
5. Precauzioni e avvertenze	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito).....	4
7. Materiale di analisi.....	4
8. Esecuzione del test	5
8.1 Preparazione dei campioni.....	5
8.2 Preparazione dei reattivi	5
8.3 Esecuzione del test di Immunoblot.....	5
8.4 Impiego di processori Immunoblot.....	6
9. Valutazione del test	6
9.1 Valutazione dei campioni	6
9.2 Impiego del controllo cut off	7
9.3 Significato dell'antigene	7
9.4 Criteri di valutazione	7
9.5 Limiti del test.....	7
10. Bibliografia.....	8
11. Simboli	8
12. Schema di svolgimento del test.....	9

1. Finalità d'uso

Kit Line Immunoblot per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG e/o IgM specifici di *Treponema pallidum* nel siero umano. Il kit può essere utilizzato come test di conferma in caso di diagnosi estesa di sifilide, qualora il risultato del test d'indagine sia dubbio o positivo.

2. Principio del test

Le proteine dell'antigene dell'agente patogeno vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante una speciale tecnica a spruzzo. Tale membrana viene in seguito tagliata in singole strisce.

L'incubazione delle strisce di nitrocellulosa che supportano l'antigene assieme ai campioni di siero/plasma umano consente di individuare la presenza di anticorpi specifici. Tali anticorpi formano immunocomplessi con l'antigene fissato sulle strisce di prova. Dopo avere rimosso gli anticorpi non legati mediante opportune fasi di lavaggio, le singole strisce di nitrocellulosa vengono incubate con anticorpi IgG e/o IgM anti-umani coniugati a fosfatasi alcalina. Mediante un'ulteriore fase di lavaggio si rimuovono poi gli anticorpi coniugati non legati e si esegue la visualizzazione del complesso antigene/anticorpi (gli anticorpi legati), aggiungendo un substrato non colorato il quale, per reazione enzimatica propria, genera bande di colore violetto (bande dell'antigene). La reazione enzima/substrato viene arrestata lavando le strisce di nitrocellulosa in acqua distillata/deionizzata. A seconda del pattern delle bande osservato, si può rilevare la presenza di anticorpi specifici IgG e/o IgM.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per 16 determinazioni

- | | | |
|---|-----------|------------|
| 1. Strisce di prova di IgG o IgM nitrocellulosa con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso | 1x | 16 strisce |
| 2. Controllo cut off IgM o IgG, siero umano, prediluito | 1x | 1,0 ml |
| 3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris | 1x | 50 ml |
| 4. Coniugato IgG o IgM (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso | 1x | 57 ml |
| 6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati | 1x | 1 pz. |

3.2 Kit per 32 determinazioni

- | | | |
|---|-----------|------------|
| 1. Strisce di prova di IgG o IgM nitrocellulosa con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso | 2x | 16 strisce |
| 2. Controllo cut off IgM o IgG, siero umano, prediluito | 1x | 1,0 ml |
| 3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Coniugato IgG o IgM (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso | 1x | 57 ml |
| 6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati | 1x | 1 pz. |

Su richiesta sono disponibili anche:

IgG o IgM- Controllo positivo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Per le bande positive > banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE150P60 o IgM: WE150P80)

IgG/IgM- Controllo negativo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Il controllo negativo non presenta nessuna banda, né bande rilevanti per la valutazione > banda cut off.

(Art. n°: IgG/IgM: WE150N10)

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Non esporre i singoli reattivi a temperature eccessivamente basse o elevate.

- Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza.
- Non conservare i reattivi in ambiente con luce abbagliante.
- La soluzione per substrato BCIP/ NBT è fotosensibile e va conservata al buio.
- Strisce di reazione in nitrocellulosa:** utilizzare immediatamente le strisce dopo averle estratte dalla scatola. Chiudere perfettamente le scatole contenenti strisce non utilizzate e conservare a 2-8°C. Per l'archiviazione dei risultati, si raccomanda di proteggere le strisce di reazione in nitrocellulosa dalla luce diretta del sole, in modo da evitare lo scolorimento delle bande.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Strisce di reazione	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (conservazione nella busta in dotazione)	3 mesi
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	circa 6 ore
Substrato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +8°C	4 settimane
	diluizione finale (pronta per l'uso)	oppure temperatura ambiente	2 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

- Come sieri di controllo si impiegano esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV ed agli antigeni di superficie dell'epatite B. Tuttavia i sieri di controllo, i campioni, i campioni diluiti, i coniugati e le strisce di reazione in nitrocellulosa devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
- Durante l'esecuzione dell'immunoblot indossare guanti monouso e utilizzare pinzette di plastica.
- Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.
- Le vasche di incubazione sono state concepite dal produttore come prodotti monouso. L'uso ripetuto di tali vasche ricade sotto la responsabilità dell'utilizzatore. In caso di uso ripetuto, raccomandiamo di disinfettare le vasche di incubazione per parecchie ore utilizzando soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, pulendo e risciacquando a fondo con acqua corrente e acqua distillata/deionizzata.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

- Vasca di incubazione (se necessario disponibile come art. n° WE300.08)
- Agitatore (verticale non centrifugo)
- Un flacone spruzzatore per bloccare la reazione
- Pipetta o lavatore manuale
- Micropipette da 5 µl - 1500 µl
- Puntali pipettatori
- Tubetti per campioni, volumi 2-20 ml
- Pinzetta di plastica
- Acqua distillata o deionizzata
- Carta filtrante

7. Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

8. Esecuzione del test

Il rigoroso rispetto del metodo indicato da VIROTECH Diagnostics è la premessa indispensabile per conseguire risultati corretti.

8.1 Preparazione dei campioni

1. Per ogni campione prelevato dai pazienti sono necessari 15 µl di siero o di plasma.
2. Si raccomanda di eseguire il prelievo venoso in condizioni asettiche. Separare il siero quando la coagulazione è completa (non presente per il plasma). Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato a - 20°C.
3. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente i sieri.
4. I sieri inattivati al calore, lipemici, emolitici o contaminati da batteri possono dare origine a risultati falsati e se ne sconsiglia pertanto il riutilizzo.
5. Non impiegare campioni di siero torbidi (specialmente dopo scongelamento), eventualmente centrifugarli (5 min. a 1000x g), quindi utilizzare per il test il surnatante limpido.

8.2 Preparazione dei reattivi

1. Per l'adattamento alla routine di laboratorio, è possibile elaborare tutti i LINE e gli EcoBlot in un unico ciclo di prova con gli stessi tempi di incubazione e componenti con una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli cut off saranno predisposti in modo specifico ai parametri e ai lotti.
2. Prima di diluire i reattivi di prova, portare i concentrati a temperatura ambiente. Utilizzare esclusivamente acqua distillata/deionizzata di alta qualità e a temperatura ambiente.
3. Mescolare accuratamente le diluizioni prima di eseguire il test.
4. **Tampone di diluizione / lavaggio**
Il tampone di lavaggio e di diluizione è concentrato 10 volte. Diluire il concentrato del tampone di lavaggio e di diluizione 1:10 con acqua distillata o deionizzata (concentrato 10ml/50ml/100ml + 90ml/450ml/900ml acqua dist./deionizzata) e miscelare bene.
Sia i tamponi di diluizione/di lavaggio concentrati che quelli diluiti possono a volte presentare una colorazione giallastra. Tale fenomeno non ha alcun effetto né sulla durata del tampone, né sulla funzionalità e sull'affidabilità diagnostica della serie di test.
5. **Coniugato IgG e/o IgM**
Diluire il coniugato 1 + 100 con tampone di diluizione/lavaggio a diluizione finale, mescolare accuratamente. Per ciascun campione di siero si richiedono 1,5 ml di soluzione d'uso di coniugato. Vedere la tabella di diluizione del coniugato (punto: Schema del test).
6. **Soluzione per substrato**
La soluzione per substrato viene fornita pronta per l'uso.

8.3 Esecuzione del test di Immunoblot

Attenzione: Le strisce di nitrocellulosa possono essere testate esclusivamente nella classe Ig idonea (vedere l'etichetta sulla bustina del blot e la descrizione su ciascuna singola striscia di prova).

Per l'esecuzione e la valutazione corrette degli LINE per la *Treponema pallidum*, utilizzare anche un controllo cut off specifico del parametro e del lotto per ogni serie di test.

Al fine di formulare una diagnosi certa di *Treponema pallidum*, si raccomanda di eseguire il test LINE nelle IgG e IgM.

1. Il test va eseguito a temperatura ambiente.
2. Inserire 1 striscia per ciascun campione nell'apposita scanalatura di una vasca d'incubazione pulita. Se possibile, afferrare le strisce solo dall'estremità superiore contrassegnata.
3. Dispensare su ciascuna striscia 1,5ml di **tampone di diluizione / lavaggio** pronto per l'uso e inserire nell'agitatore. Fare attenzione che le strisce di prova in nitrocellulosa siano coperte dal liquido in modo uniforme e che non si asciughino per l'intera durata di esecuzione del test.

4. Le strisce di prova rinforzate in nitrocellulosa vanno inumidite completamente entro un minuto e possono essere incubate in posizione rovesciata verso l'alto, capovolta o di lato.
5. Aggiungere su ogni striscia **15 µl di siero/plasma del paziente o 100 µl del controllo cut off / positivo / negativo**, se possibile sull'estremità superiore contrassegnata. Incubare il siero del paziente e il controllo per 30 minuti sull'agitatore. Durante la dispensazione e il successivo versamento, fare attenzione a evitare contaminazioni crociate tra i singoli campioni.
6. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare scolare con precauzione. Mentre si fa defluire il liquido, le strisce di prova in nitrocellulosa rimangono attaccate al bordo delle scanalature. Asciugare con carta assorbente il liquido residuo.
7. Lavaggio delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per 3 x 5 minuti sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Prima di procedere con l'ultima fase di lavaggio, preparare la necessaria quantità di diluizione fresca di coniugato (v. tabella).
8. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
9. Dispensare 1,5 ml della diluizione di coniugato preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per 30 minuti sull'agitatore.
10. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
11. Lavaggio delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per 3 x 5 minuti sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Successivamente sciacquare per 1 x 1 minuti con acqua distillata/deionizzata.
12. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
13. Dispensare 1,5 ml di soluzione per substrato pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per 10 ± 3 minuti.
14. Arrestare lo sviluppo cromatico facendo defluire la soluzione per substrato. Successivamente sciacquare le strisce per 3 volte senza incubazione intermedia, utilizzando 1,5 ml di acqua distillata/deionizzata per ciascuna.
15. Fare scolare l'acqua distillata/deionizzata e lasciare asciugare le strisce su una carta assorbente pulita. La colorazione di fondo, osservabile sulle strisce di prova in nitrocellulosa umide, scompare completamente sulle strisce asciutte. Rispetto alle strisce di prova in nitrocellulosa tradizionali, quelle rinforzate richiedono un tempo leggermente più lungo per asciugarsi.
16. Per la valutazione, utilizzare il relativo protocollo allegato. La dicitura delle bande altamente specifiche riportata sulla scheda di protocollo facilita la valutazione dei campioni dei pazienti.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

8.4 Impiego di processori Immunoblot

Per l'elaborazione automatica dei Blot e dei LINE, sono stati convalidati i seguenti apparecchi: Apollo e Profiblot. In linea di principio, sono idonei tutti i dispositivi automatici per Blot disponibili in commercio.

9. Valutazione del test

Per una valutazione sicura, ciascuna striscia LINE è provvista di due controlli:

1. **Controllo del siero** (= serum control):
La banda di incubazione del siero compare sotto la linea di marcatura (= markline) soltanto dopo l'incubazione con il siero del paziente.
2. **Controllo coniugato** (= conjugate control):
La strip LINE è dotata di una banda di controllo del coniugato che compare dopo l'incubazione con il coniugato corrispondente.

L'esecuzione del test è valida se sulle strisce di prova in nitrocellulosa sviluppate è chiaramente riconoscibile non solo il controllo del siero ma anche il controllo del coniugato interno.

Per la posizione della banda del controllo del siero/coniugato si rimanda alla scheda di protocollo.

9.1 Valutazione dei campioni

Per la posizione e la descrizione delle bande reattive si rimanda alla scheda di protocollo.

Bande delle IgG e IgM: TpN47, TmpA, TpN17, TpN15

9.2 Impiego del controllo cut off

Le bande di intensità inferiore alla banda cut off del controllo cut off (TpN 47) non vengono incluse nella valutazione. La banda TpN47 deve mostrare un'intensità debole.

Valutazione dell'intensità delle bande:

Banda TpN 47: L'intensità della banda TpN 47 del controllo cut off definisce la valutazione di tutte le bande proteiche nelle IgG e IgM nel modo seguente:

- Intensità inferiore alla banda TpN 47 del controllo cut off = 0
- Intensità uguale alla banda TpN 47 del controllo cut off = 1
- Intensità superiore alla banda TpN 47 del controllo cut off = 2

La somma delle intensità delle bande fornisce la valutazione globale.

9.3 Significato dell'antigene

Elenco delle proteine ricombinanti utilizzate del *Treponema pallidum* - Antigene (5, 6).

Denominazione antigene	Significato dell'antigene	Specificità degli anticorpi nella LINE
TpN47	Marker per sifilide primaria, secondaria e latente (5, 6)	Altamente specifico per tutti gli stadi dell'infezione
TmpA (TpN44,5)		
TpN17		
TpN15		

Avvertenza: La combinazione degli antigeni altamente specifici riportati in tabella si orienta secondo i dati contenuti nei brevetti (titolare S. Krell) n°: DE 195 36 166 C1 e EP 0 855 032 B1 e alle direttive riguardanti la diagnosi sierologica della sifilide, MIQ 2001:Syphilis (Hagedorn) (4).

9.4 Criteri di valutazione

L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio disponibili.

Valutazione delle IgG	
Somma dell'intensità delle bande:	Interpretazione
< 3	Negativo
= 3	Incerto (*)
> 3	Positivo

Valutazione delle IgM	
Somma dell'intensità delle bande:	Interpretazione
< 2	Negativo
= 2	Incerto (*)
> 2	Positivo

(*): In caso di risultato incerto, si raccomanda di richiedere un secondo siero e/o ricorrere a un altro metodo di prova.

9.5 Limiti del test

1. Un risultato negativo del Blot non esclude completamente la possibilità di un'infezione da *Treponema pallidum*. Il campione può essere stato prelevato prima della comparsa degli anticorpi oppure la concentrazione degli anticorpi si trova al di sotto del limite d'individuazione del test.
2. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); in tal caso non eseguire la valutazione, ossia l'immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con altri opportuni metodi.
3. Non è possibile esprimere una diagnosi relativamente a neurosifilide e sifilide neonatale, non essendo presenti per la valutazione i corrispondenti sieri e/o campioni di liquor.

4. A causa dell'elevata omologia del DNA di *T. pallidum* subsp. *pallidum* (sifilide), *endemicum* (sifilide endemica) e *pertenue* (framboesia, yaws), e in parte anche *Treponema carateum* (Pinta), sono da prevedersi reazioni crociate. Per l'impiego di test serologici, ciò significa che non è possibile limitare mediante diagnosi differenziale le treponematosi non veneree (4).
5. Nei pazienti affetti da sifilide latente, possono occasionalmente comparire risultati discrepanti tra il test ABS FTA 19S per IgM e il test Blot ricombinato o anche il test EIA. La causa di queste discrepanze è al momento ancora oscura.
6. Nell'interpretazione di singoli risultati IgM al limite o positivi nelle donne in stato di gravidanza, si deve tener presente la possibilità della presenza di anticorpi IgM multireattivi. Questi risultati si dovrebbero chiarire tramite ulteriori test (19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) o test VDRL).

10. Bibliografia

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

11. Simboli



Vedere le Istruzioni per l'uso

12. Schema di svolgimento del test

Esecuzione del test in breve:

Preincubazione	30 minuti	15 µl di siero/plasma del paziente / 100 µl di controllo in 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
Lavaggio	3 x 5 minuti	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
Incubazione coniugato	30 minuti	Con 1,5 ml di diluizione d'uso (1 + 100)
Lavaggio	3 x 5 minuti	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
	1 x 1 minuto	Con acqua distillata/deionizzata
Incubazione substrato	10 ± 3 minuti	Con 1,5 ml per campione di soluzione per substrato
Arresto distillata/deionizzata.	3 x senza incubazione intermedia	Con 1,5 ml per campione di acqua

Tabella di diluizione coniugato: (valori arrotondati)

Numero strisce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampone di diluizione/lavaggio	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
coniugato Concentrato	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volumi finali	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Numero strisce	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampone di diluizione/lavaggio	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
coniugato Concentrato	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volumi finali	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Numero strisce	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampone di diluizione/lavaggio	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
coniugato Concentrato	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volumi finali	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Numero strisce	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampone di diluizione/lavaggio	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
coniugato Concentrato	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volumi finali	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml