

VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot

(T. pallidum IgG LINE-16)

Nº de pedido: WE150G16

(T. pallidum IgG LINE-32)

Nº de pedido: WE150G32

VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot

(T. pallidum IgM LINE-16)

Nº de pedido: WE150M16

(T. pallidum IgM LINE-32)

Nº de pedido: WE150M32

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Índice

1. Finalidad	3
2. Principio de la prueba	3
3. Contenido	3
3.1 Kit para 16 determinaciones	3
3.2 Kit para 32 determinaciones	3
4. Conservación y caducidad del kit y de los reactivos	4
5. Medidas de precaución y advertencias	4
6. Material adicional necesario (no suministrado)	4
7. Material de muestra	5
8. Realización de la prueba	5
8.1 Preparación de las muestras	5
8.2 Preparación de los reactivos.....	5
8.3 Realización de la prueba de inmunotransferencia	5
8.4 Empleo de procesadores de inmunotransferencia	6
9. Valoración del ensayo	6
9.1 Evaluación de las muestras de paciente.....	7
9.2 Empleo del control de corte	7
9.3 Significado de los antígenos	7
9.4 Criterios de evaluación.....	7
9.5 Limitaciones del ensayo	8
10. Bibliografía	8
11. Esquema de la realización de la prueba	9

1. Finalidad

Kit de ensayo por inmunotransferencia de línea para la determinación cualitativa en suero humano de anticuerpos IgG o IgM específicos contra *Treponema pallidum*. El kit puede emplearse como prueba de confirmación para un diagnóstico de sífilis ampliado si el resultado de la prueba de detección es dudoso o positivo.

2. Principio de la prueba

Las proteínas del antígeno del organismo patógeno se transfieren sobre una membrana de nitrocelulosa mediante un procedimiento de pulverización especial. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se corta en tiras individuales.

La incubación de las tiras de nitrocelulosa portadoras de antígeno con muestras de suero/plasma humano permite la identificación de los anticuerpos específicos existentes. Estos anticuerpos forman complejos inmunitarios con los antígenos fijados en las tiras de prueba. Una vez eliminados los anticuerpos no ligados mediante pasos de lavado, las tiras de nitrocelulosa se incuban con anticuerpos IgG o IgM antihumanos conjugados con fosfatasa alcalina. Después de eliminar los anticuerpos conjugados no ligados mediante un paso de lavado adicional tiene lugar la visualización de los complejos antígeno-anticuerpo (de los anticuerpos ligados) mediante la adición de un sustrato incoloro que, al reaccionar con las enzimas, genera bandas azul-violeta ("bandas de antígeno"). La reacción enzima-sustrato se interrumpe lavando las tiras de nitrocelulosa con agua destilada o desionizada. En función de los patrones de bandas observados puede determinarse la presencia de anticuerpos IgG o IgM específicos.

3. Contenido

3.1 Kit para 16 determinaciones

- | | | |
|---|-----------|----------|
| 1. Tiras de prueba de IgG / IgM nitrocelulosa con antígenos pulverizados sobre las mismas, reforzadas con lámina de plástico, clasificadas en cuadernillos, listas para usar | 1x | 16 tiras |
| 2. Control de nivel de corte IgG / IgM , suero humano, prediluido | 1x | 1,0 ml |
| 3. Tampón de dilución/lavado , pH 7,3 (conc. 10x), con conservante y Tris | 1x | 50 ml |
| 4. Conjugado IgG/ IgM (concentración 100x) antihumano, (caprino)-fosfatasa alcalina, con conservante | 1x | 0,7 ml |
| 5. Sustrato (BCIP/NBT), listo para usar | 1x | 57 ml |
| 6. Hoja de protocolo de valoración , para protocolizar y archivar los resultados | 1x | 1 unidad |

3.2 Kit para 32 determinaciones

- | | | |
|---|-----------|----------|
| 1. Tiras de prueba de IgG / IgM nitrocelulosa con antígenos pulverizados sobre las mismas, reforzadas con lámina de plástico, clasificadas en cuadernillos, listas para usar | 2x | 16 tiras |
| 2. Control de nivel de corte IgG / IgM , suero humano, prediluido | 1x | 1,0 ml |
| 3. Tampón de dilución/lavado , pH 7,3 (conc. 10x), con conservante y Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Conjugado IgG/ IgM (concentración 100x) antihumano, (caprino)-fosfatasa alcalina, con conservante | 1x | 0,7 ml |
| 5. Sustrato (BCIP/NBT), listo para usar | 1x | 57 ml |
| 6. Hoja de protocolo de valoración , para protocolizar y archivar los resultados | 1x | 1 unidad |

Bajo demanda puede suministrarse adicionalmente:

IgG ó IgM- Control positivo, suero humano, prediluido, 0,5 ml.

Las bandas positivas > bandas Cut off se indican en el certificado suministrado.

(Art. no.: IgG: WE150P60 ó IgM: WE150P80)

IgG/IgM- Control negativo, suero humano, prediluido, 0,5 ml.

El control negativo no muestra ninguna banda o bien ninguna banda relevante para la evaluación > banda Cut off.

(Art. no.: IgG/IgM: WE150N10)

4. Conservación y caducidad del kit y de los reactivos

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. No congele los reactivos ni los exponga a temperaturas elevadas.
2. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
3. Evite conservar los reactivos en un lugar expuesto a luz intensa.
4. La solución de sustrato BCIP/NBT es fotosensible y debe conservarse en un lugar oscuro.
5. **Tiras de prueba de nitrocelulosa:** Utilice las tiras inmediatamente después de sacarlas de la bolsa. Vuelva a cerrar bien la bolsa con las tiras que no necesite y consérvela a 2-8°C. Para archivar los resultados, es imprescindible proteger las tiras de prueba de nitrocelulosa contra la incidencia directa de la luz solar, para evitar una descoloración de las bandas.

Material	Estado	Almacenamiento	Estabilidad
Muestras de análisis	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Tiras de análisis	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (almacenamiento en la bolsa suministrada)	3 meses
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	aprox. 6h
Sustrato	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegida contra la luz)	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +8°C	4 semanas
	dilución final (lista para el uso)	o a temperatura ambiente	2 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todos los sueros de control, muestras, muestras diluidas, conjugados y tiras de prueba de nitrocelulosa deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Al realizar la inmunotransferencia deben utilizarse guantes desechables y pinzas de plástico.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.
4. Las cubetas de incubación han sido diseñadas por el fabricante exclusivamente para un único uso. Si las cubetas de incubación se emplean más de una vez, la responsabilidad recae sobre el usuario. En caso de que se decida emplear las cubetas más de una vez, recomendamos que después de su uso se desinfecten durante varias horas en una solución de hipoclorito sódico al 1%, se limpien y se enjuaguen a fondo con agua corriente y posteriormente con agua destilada o desionizada.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Cubeta de incubación (disponible con el nº de pedido WE300.08)
2. Agitador (vertical, no centrífugo)
3. Frasco lavador para interrumpir la reacción
4. Pipeta o lavador manual
5. Micropipetas de 5 µl - 1500 µl
6. Puntas de pipeta
7. Tubos de ensayo, volumen 2-20 ml
8. Pinzas de plástico
9. Agua destilada o desionizada

10. Papel de filtro

7. Material de muestra

Como material de análisis se pueden utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el folleto sólo se mencione el suero.

8. Realización de la prueba

Para obtener resultados correctos es imprescindible respetar exactamente las instrucciones de trabajo de VIROTECH Diagnostics.

8.1 Preparación de las muestras

1. Para cada muestra de paciente son necesarios 15 µl de suero o de plasma.
2. Las muestras de sangre se deben extraer por punción venosa bajo condiciones asépticas. Tras la coagulación completa se debe separar el suero (no procede para el plasma). Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse a -20°C.
3. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas de los sueros.
4. Los sueros térmicamente inactivados o que presenten lipemia, hemólisis o contaminación microbiana pueden llevar a resultados incorrectos, por lo que no deben utilizarse.
5. No utilice muestras de suero turbias (especialmente después de la descongelación); en caso necesario, centrifúguelas (5 min a 1000 x g), pipetee el sobrenadante transparente y utilícelo para la prueba.

8.2 Preparación de los reactivos

1. Para la adaptación a la rutina de laboratorio se pueden utilizar todos los LINEs y EcoBlots en un ciclo de prueba (con tiempos de incubación idénticos y parámetros y lotes de componentes similares). Los controles Cut off se realizan de forma específica para los parámetros y lotes.
2. Antes de diluir todos los reactivos de ensayo, el correspondiente reactivo concentrado debe llevarse a temperatura ambiente. Sólo debe utilizarse agua destilada o desionizada de alta calidad y a temperatura ambiente.
3. Antes de iniciar el ensayo, las diluciones deben mezclarse bien.
4. **Tampón de dilución/lavado**
El tampón de dilución/lavado se suministra en una concentración de 10x. Diluya el concentrado de tampón de dilución/lavado al 1:10 con agua destilada o desionizada (10ml/50ml/100ml de concentrado + 90ml/450ml/900ml a. dest./desionizada) y mézclelo bien.
Tanto el tampón de dilución/de lavado concentrado como el diluido pueden presentar una coloración amarilla. Esta coloración amarilla no afecta a la estabilidad del tampón de dilución/de lavado ni a la funcionalidad y capacidad diagnóstica de la preparación de ensayo.
5. **Conjugado IgG / IgM**
Diluya el conjugado (1+100) con tampón para dilución/lavado ya diluido y mezcle bien. Por cada muestra de suero se necesitan 1,5 ml de solución de conjugado lista para usar. Consulte la tabla de dilución del conjugado (apartado "Esquema de la realización de la prueba").
6. **Solución de sustrato**
La solución de sustrato se suministra lista para usar.

8.3 Realización de la prueba de inmunotransferencia

Atención: Las tiras de prueba de nitrocelulosa sólo deben utilizarse para la clase Ig autorizada (véanse la etiqueta del cuadernillo de inmunotransferencia y la denominación en cada tira individual).

Para la realización y evaluación correctas de la prueba *Treponema pallidum* LINE debe utilizarse en todas las pruebas un control del nivel de corte específico para los parámetros y el lote correspondientes.

Para un diagnóstico seguro de *Treponema pallidum* debe realizarse la prueba LINE para IgG e IgM.

1. La prueba se realiza a temperatura ambiente.
2. Por cada prueba, coloque 1 tira en la ranura de una cubeta de incubación limpia. En la medida de lo posible, la tira sólo debe sujetarse por el extremo superior marcado.
3. Pipetee en cada tira 1,5 ml de **tampón de dilución/lavado** listo para usar y colóquela en el agitador. Asegúrese de que las tiras de prueba de nitrocelulosa estén uniformemente cubiertas de líquido: no debe secarse en ningún momento del ensayo.
4. Las tiras de prueba de nitrocelulosa reforzadas están totalmente humedecidas al cabo de un minuto, y pueden incubarse hacia arriba, hacia abajo o de lado.
5. Agregar cada vez **15µl de suero/plasma de paciente ó 100µl del control Cut off / positivo / negativo**, en lo posible en el extremo superior y marcado de la banda Incube el suero de paciente y el control durante **30 minutos** en el agitador. Durante el pipeteado y el posterior vertido debe prestarse atención a evitar contaminaciones cruzadas entre las distintas muestras de paciente.
6. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo cuidadosamente. El verter el líquido, las tiras de prueba de nitrocelulosa permanecen adheridas al suelo de las ranuras. Seque el líquido residual con papel absorbente.
7. **Lave** las tiras: incúbelas **3 veces durante 5 minutos** en el agitador con 1,5 ml de tampón de dilución/lavado listo para usar por cada vez. Aspire o vierta siempre el tampón de lavado en su totalidad. Antes de realizar el último paso de lavado, prepare la cantidad necesaria de conjugado diluido fresco (véase tabla).
8. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo (véase el punto 6).
9. Pipetee 1,5 ml del **conjugado diluido** preparado en cada ranura de incubación e incube durante **30 minutos** en el agitador.
10. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo.
11. **Lave** las tiras: incúbelas **3 veces durante 5 minutos** en el agitador con 1,5 ml de tampón de dilución/lavado listo para usar por cada vez. Aspire o vierta siempre el tampón de lavado en su totalidad. A continuación, lávelas **1 vez durante 1 minuto con agua destilada/desionizada**.
12. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo (véase el punto 6).
13. Pipetee 1,5 ml de **solución de sustrato** lista para usar en cada ranura y revele las tiras durante **10 ± 3 minutos** en el agitador.
14. **Interrumpa** el revelado del color vertiendo la solución de sustrato. A continuación, lave **3 veces** las tiras sin incubación intermedia con 1,5 ml de **agua destilada/desionizada** cada vez.
15. Vierta el agua destilada/desionizada y seque las tiras sobre un papel absorbente limpio. La coloración de fondo que puede observarse en las tiras de prueba de nitrocelulosa húmedas desaparece por completo al secarse. En comparación con las tiras de prueba de nitrocelulosa normales, las tiras de prueba de nitrocelulosa reforzadas tardan algo más en secarse.
16. Utilice el protocolo de valoración adjunto para la evaluación. Las indicaciones que figuran en las bandas altamente específicas en la hoja de protocolo facilitan la evaluación de las muestras de paciente.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

8.4 Empleo de procesadores de inmunotransferencia

Para el procesamiento automatizado de los Blot y de las LINE se han validado los equipos siguientes: Apollo y Profiblot. Por principio son adecuados todos los equipos automáticos para Blot de tipo usual en el comercio.

9. Valoración del ensayo

Para la valoración segura, cada tira LINE está equipada con dos controles:

1. **Control de suero** (= serum control):
La marca de incubación con suero debajo de la línea de marca (= markline) sólo aparece después de incubar la tira con suero de paciente.
2. **Control de conjugado** (= conjugate control):
La tira LINE está dotada de una banda de control de conjugado que aparece después de la incubación con el correspondiente conjugado.

La prueba realizada es válida si, una vez revelada, en la tira de prueba de nitrocelulosa aparecen claramente tanto la banda de control de suero como la de control interno de conjugado.

La posición de las bandas de control de suero y de conjugado se indican en la hoja de protocolo.

9.1 Evaluación de las muestras de paciente

La posición y denominación de las bandas reactivas se indican en la hoja de protocolo.

Bandas IgG y IgM: TpN47, TmpA, TpN17, TpN15, BMP

9.2 Empleo del control de corte

Las bandas cuya intensidad sea menor que la banda de corte (TpN 47) del control de corte no deben tenerse en cuenta para la valoración. La banda TpN 47 debe mostrar una intensidad débil.

Valoración de la intensidad de las bandas:

Banda TpN 47: La intensidad de la banda TpN 47 del control de corte determina la valoración de todas las bandas de proteínas en la prueba IgG e IgM del modo siguiente:

- **Menor intensidad que la banda TpN 47 del control de corte** = 0
- **Misma intensidad que la banda TpN 47 del control de corte** = 1
- **Mayor intensidad que la banda TpN 47 del control de corte** = 2

La evaluación global se desprende de la suma de las intensidades de las bandas (sin incluir la banda BMP).

9.3 Significado de los antígenos

Enumeración de las proteínas recombinantes del antígeno de *Treponema pallidum* empleadas (5, 6).

Antígeno / denominación	Significado de los antígenos	Especificidad de los anticuerpos de la prueba LINE
TpN47	Marcadores de sífilis primaria, secundaria y latente (5, 6)	Altamente específicos para todos los estadios de la infección
TmpA		
TpN17		
TpN15		
BMP	Esta banda no se incluye en la evaluación. (**)	Menor especificidad

Observación:

La combinación de los antígenos altamente específicos que figuran en la tabla se orienta por lo establecido en la patente nº DE 195 36 166 C1 / EP 0 855 032 B1 (titular S. Krell) y por las directrices sobre diagnóstico serológico de la sífilis MIQ 2001: Syphilis (Hagedorn) (4).

9.4 Criterios de evaluación

La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y otros resultados analíticos existentes.

Observación sobre la banda BMP ():**La banda BMP no se incluye en la evaluación global al no disponerse de suficiente experiencia con esta proteína. No constituye un marcador temprano. Sin embargo, existen indicios de que la concentración de anticuerpos contra BMP disminuye antes en caso de éxito del tratamiento en comparación con los anticuerpos contra los demás antígenos. Además, parece volver a aparecer o aumentar en caso de infecciones recurrentes.

Evaluación para IgG	
Suma de las intensidades de las bandas	Interpretación
< 3	negativo
= 3	llamativo (*)
> 3	positivo

Evaluación para IgM	
Suma de las intensidades de las bandas	Interpretación
< 2	negativo
= 2	llamativo (*)
> 2	positivo

(*): En caso de resultado llamativo debe solicitarse un segundo suero o emplear otra técnica de prueba.

9.5 Limitaciones del ensayo

1. Un resultado negativo de la inmunotransferencia no permite descartar por completo la posibilidad de una infección por *Treponema pallidum*. La muestra puede haberse extraído antes de la aparición de anticuerpos, o la concentración de anticuerpos puede encontrarse por debajo del límite de detección del ensayo.
2. En casos poco frecuentes, los sueros de pacientes pueden presentar bandas "invertidas" (fondo oscuro, bandas blancas); si ocurre esto no es posible evaluar la prueba. En ese caso, el suero debe analizarse mediante otros métodos serológicos.
3. No es posible efectuar un diagnóstico en relación con neurosífilis y sífilis neonatal, ya que no se dispuso de las correspondientes muestras de suero o líquido cefalorraquídeo para la evaluación.
4. Debido a la elevada homología de ADN de *T. pallidum* subsp. *pallidum* (sífilis), *endemicum* (sífilis endémica) y *pertenue* (frambesia, yaws), y en parte también *Treponema carateum* (pinta), cabe esperar reactividades cruzadas. Esto significa que el uso de pruebas serológicas no permite distinguir por diagnóstico diferencial las treponematosi no venéreas (4).
5. En pacientes con lúes latente, en casos aislados pueden producirse resultados discrepantes entre las pruebas 19S-IgM-FTA-ABS y las pruebas de inmunotransferencia recombinantes o también las pruebas de inmunoensayo enzimáticas. En la actualidad no está clara la causa de estas discrepancias.
6. En la interpretación de resultados aislados IgM límite o positivos en embarazadas, se debe tener en cuenta la posibilidad de la presencia de anticuerpos IgM multireactivos. Estos resultados se deberían aclarar mediante la realización de otros tests (test 19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) o VDRL).

10. Bibliografía

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. Esquema de la realización de la prueba

Resumen de la realización de la prueba:

Incubación de muestras	30 minutos	15 µl de suero/plasma del paciente/100 µl de control en cada caso en 1,5 ml de tampón de dilución/lavado
Lavado	3 x 5 minutos	con 1,5 ml de tampón para dilución/lavado en cada caso
Incubación de los conjugados	30 minutos	con 1,5 ml de dilución para el uso (1 + 100)
Lavado	3 x 5 minutos	con 1,5 ml de tampón para dilución/lavado en cada caso
	1 x 1 minuto	con agua destilada/desionizada
Incubación del sustrato	10 ± 3 minutos	con 1,5 ml de solución de sustrato en cada caso
Parada	3 x sin incubación intermedia	con 1,5 ml de agua destilada/desionizada en cada caso

Tabla para dilución de conjugado: (valores redondeados)

Número de tiras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampón de dilución/lavado	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Conjugado concentrado	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volumen final	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Número de tiras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampón de dilución/lavado	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Conjugado concentrado	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volumen final	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Número de tiras	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampón de dilución/lavado	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Conjugado concentrado	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volumen final	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Número de tiras	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampón de dilución/lavado	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Conjugado concentrado	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volumen final	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml