

VIROTECH Helicobacter pylori IgG LINE Immunoblot

(H. pylori IgG LINE-32)

N° articolo: WE243G32

(H. pylori IgG LINE-96)

N° articolo: WE243G96

VIROTECH Helicobacter pylori IgA LINE Immunoblot

(H. pylori IgA LINE-32)

N° articolo: WE243A32

(H. pylori IgA LINE-96)

N° articolo: WE243A96

SOLO PER USO DIAGNOSTICO 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**



Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test.....	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit per 32 determinazioni	3
3.2 Kit per 96 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 Impiego del controllo cut off	6
9.2 Significato degli antigeni	7
9.3 Criteri di valutazione.....	7
9.4 Limiti del test	8
10. Bibliografia.....	8
11. Simboli.....	8
12. Schema di svolgimento del test.....	9

1. Finalità d'uso

Kit LINE per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG e/o IgA specifici dell'*Helicobacter pylori* nel siero umano.

2. Principio del test

Le proteine dell'antigene 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 IgA 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 IgA.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per 32 determinazioni

1. Strisce di prova di IgG o IgA nitrocellulosa con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso	1x	32 strisce
2. Controllo cut off IgA 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 IgA (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 96 determinazioni

1. Strisce di prova di IgG o IgA nitrocellulosa con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso	3x	32 strisce
2. Controllo cut off IgA o IgG , siero umano, prediluito	2x	1,0 ml
3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris	4x	50 ml
4. Coniugato IgG o IgA (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante	3x	0,7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso	3x	57 ml
6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati	3x	1 pz.

Su richiesta sono disponibili anche:

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

Per le bande positive $\geq$ banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE243P60 o IgA: WE243P40)

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

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

(Art. n°: IgG/IgA: WE243N20)

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.
2. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza.
3. Non conservare i reattivi in ambiente con luce abbagliante.

4. La soluzione per substrato BCIP/ NBT è fotosensibile e va conservata al buio.
5. **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)	<i>oppure</i> temperatura ambiente	2 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

1. 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.
2. Durante l'esecuzione dell'Immunoblot indossare guanti monouso e utilizzare pinzette di plastica.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.
4. 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)

1. Vasca di incubazione (se necessario disponibile come art. n° WE300.08)
2. Agitatore (verticale non centrifugo)
3. Un flacone spruzzatore per bloccare la reazione
4. Pipetta o lavatore manuale
5. Micropipette da 5 µl - 1500 µl
6. Puntali pipettatori
7. Tubetti per campioni, volumi 2-20 ml
8. Pinzetta di plastica
9. Acqua distillata o deionizzata
10. 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/ plasma per la classe IgG e 30 µl per la classe IgA.
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'attendibilità diagnostica della serie di test.
5. **Coniugato IgG e/o IgA**
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 una corretta esecuzione e valutazione del test LINE per Helicobacter pylori , occorre includere anche un controllo cut off specifico dei parametri e del lotto per ogni serie di test.

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 **15µl di siero/plasma del paziente nella classe IgG e 30µl del siero/plasma del paziente nella classe IgA e 100µl del controllo cut off / positivo / negativo**, se possibile sull'estremità superiore opportunamente contrassegnata. Incubare il siero del paziente e il controllo per **30 minuti** sull'agitatore. 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).
 7. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
 8. Dispensare 1,5 ml della **diluizione di coniugato** preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per **30 minuti** sull'agitatore.
 9. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
 10. **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**.
 11. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
 12. Dispensare 1,5 ml di **soluzione per substrato** pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per **10 ± 3 minuti**.
 13. **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.
 14. Fare scolare l'acqua distillata/deionizzata e lasciare asciugare le strisce su un 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.
 15. 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 Impiego del controllo cut off

Le bande di intensità inferiore a quella della banda cut off del controllo cut off non vengono incluse nella valutazione.

Banda cut off IgG e IgM: Cag A

9.2 Significato degli antigeni

Antigene/ Descrizione	Peso molecolare	Significato degli antigeni	Specificità degli anticorpi nel test LINE	Si manifesta in caso di <i>H. pylori</i>
CagA (Cytotoxin- associated- gene A)	140 kD	Il gene CagA viene traslocato nelle cellule ospiti, distruggendo in tal modo le cellule gastriche acidosecernenti. Ciò favorisce di conseguenza la formazione di ulcere gastriche e carcinomi gastrici. È caratteristico dei ceppi particolarmente virulenti di tipo I, non è presente nei ceppi meno virulenti di tipo II Altamente immunogeno	Altamente specifico	Tipo I
VacA (Vacuolating Cytotoxin A)	87 kD	La citotossina VacA viene rilasciata nel mezzo circostante, causando la distruzione delle cellule della mucosa gastrica e svolgendo un'azione immunosoppressiva locale (12). È caratteristica dei ceppi particolarmente virulenti di tipo I, non è presente nei ceppi meno virulenti di tipo II Risposta degli anticorpi irregolare rispetto a CagA	Altamente specifico	Tipo I
p30	30 kD	Proteina non ancora caratterizzata.	Altamente specifico	Tipo I e Tipo II
UreA Ureasi A Sottounità	26 kD	L'ureasi A non presenta alcuna affinità con le ureasi di altri organismi ed è pertanto un marker altamente specifico per un'infezione da <i>Helicobacter pylori</i> .	Altamente specifico	Tipo I e Tipo II
P25	25 kD	Proteina di membrana che media il legame dell' <i>Helicobacter pylori</i> con le cellule epiteliali dello stomaco (13).	Altamente specifico	Tipo I e Tipo II
p19	19 kD	Proteina di membrana non ancora sufficientemente caratterizzata.	Altamente specifico	Tipo I e Tipo II

9.3 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 raccomandata delle IgG e delle IgA

Banda/e comparsa/e $\geq$ banda cut off	Interpretazione
Nessuna banda o una sola banda di: p30, p19	negativo
Una sola banda di: VacA, UreA, p25	incerto
CagA oppure Comparsa di ≥ 2 bande fra le seguenti:	positivo

9.4 Limiti del test

1. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); non eseguire la valutazione di queste bande, poiché in questi casi l'immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con altri opportuni metodi sierologici.
2. Gli anticorpi IgA possono persistere da 6 mesi a 3 anni dopo la conclusione positiva del trattamento. Gli anticorpi IgG persistono di norma molti anni.

10. Bibliografia

1. *Helicobacter pylori* – Von der Grundlage zur Therapie (1996) Herausgeber P. Malfertheiner, Thieme Verlag
2. Homepage, Nationales Referenzzentrum für *Helicobacter pylori*; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg (2010)
3. Zöller et al (1993) Nachweis der *Helicobacter pylori*-Infektion: Rolle der Immundiagnostik. *Klin. Lab.* 39: 45-54
4. Epidemiologisches Bulletin, 2005, Nr. 24
5. Kist M., Glocker E., Suerbaum S., Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion, Bundesgesundheitsblatt, 2005
6. *Helicobacter-pylori* und gastroduodenale Ulkuserkrankung, AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 021/001, 2008
7. Figura N., *Helicobacter* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996;10, Suppl. I : 79-96
8. Xiang Z., et al., Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin., *Infect. Immun.* 1995 Jan., 63 (1):94-98
9. Covacci A.S. et al., Molecular characterisation of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *PNAS*, 1993, 90:5791
10. Cover T.L. et al., Serologic detection of infection with cagA + *Helicobacter pylori* strains, *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33 (6), 1496-1500
11. Weel J.F.L., The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin and *Helicobacter pylori*-related diseases, *JID*, 1996, 173: 1171-5
12. Gebert B. et al., The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolating to immunosuppressive activities, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152(1): 205-220
13. Moran Anthony P. et al., In vivo expression of the 25-kDa laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43 (2005) 331-337

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 nella classe IgG; 30 µl di siero/plasma del paziente nella classe IgA / 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 1 x 1 minuto	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio Con acqua distillata/deionizzata
Incubazione substrato	10 ± 3 minuti	Con 1,5 ml per campione di soluzione per substrato
Arresto	3 x senza incubazione intermedia	Con 1,5 ml per campione di acqua distillata/deionizzata.

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