

DE BEPALING VAN HET COMPLEMENT GEHALTE IN PATIENTE SERA
=====Algemeen

Complement is de verzamelnaam voor een groep van tenminste negen serum factoren die een rol spelen bij immunologische reacties. Samen met antistoffen vernietigt complement bacteriën, virussen, rode bloedlichaampjes enz. Ook speelt het een rol bij immune adherence reacties en phagocytose.

Bij een aantal ziekten is een verandering van het complementgehalte waarneembaar, waardoor het van belang is dit gehalte in serum te bepalen i.v.m. het stellen van een diagnose.

Werkwijze

Bij de bepaling van de complement activiteit in serum maakt men gebruik van het feit dat het rode bloedcellen vernietigt, de zgn. hemolyse.

Schape-erythrocyten (E) worden met behulp van een konijne antiserum tegen schape-erythrocyten (amboceptor A) gesensibiliseerd, waardoor deze het vermogen krijgen om met complement te reageren. Wanneer deze reactie heeft plaats gehad ontstaan er na enige tijd openingen in het cel membraan, waardoor hemoglobine naar buiten komt. De hoeveelheid hemoglobine in het reactiemengsel, die na afcentrifugeren van de overgebleven cellen in een spectrofotometer gemeten kan worden, is een maat voor het complement gehalte van het serum.

Dit gehalte wordt uitgedrukt in de zgn. CH50 titer.

De CH50 eenheid van complement is die hoeveelheid die in het reactiemengsel 50% van de gesensibiliseerde schapecellen hemolyseert.

Uitvoering

Benodigde apparatuur, reagentia en glaswerk:

1. Vitatron colorimeter met digitale aflezing
2. Tafelcentrifuge met rotor voor reageerbuisen 1,6 x 15 cm
3. Waterbad 32°C en 37°C. Beide met schudmachine
4. Whirlmix
5. Plastic bak
6. Reageerbuis rekjes

7. Waterstraalpompe
 8. Erlenmeyer van 200 ml, 300 ml en een van 500 ml
 9. 1 maatglas van 250 ml, drie van 100 ml en een van 5 ml
 10. 1 maatkolfje van 15 ml
 11. 2 reageerbuizen van 1,6 x 15
 12. 9 reageerbuizen 1,6 x 10 (verder 6 buizen voor iedere volgende bepaling)
 13. 1 vol. pipet van 1 ml
 14. 1 vol. pipet van 5 ml
 15. 1 meetpipet van 20 ml
 16. 2 meetpipetten van 0,5 ml
 17. 1 meetpipet van 5 ml
 18. 1 meetpipet van 0,2 ml
- } of een agla micro buret van 0,5 ml
19. Automatische pipet ("Cornwall") 5 ml
 20. Schapebloed in Alsever oplossing
 21. Spuitfles phys.zout en een met aqua dest
 22. Veronalbuffer (Isotonisch pH 7.4 met Ca^{++} en Mg^{++})
 23. Amboceptor oplossing 1 : 20
 24. Gelatine oplossing 0,5%
- } zie voorschrift

A. Bereiding van gesensibiliseerde schapecel suspensie (E^A)

1. De reageerbuizen 1,6 x 15 worden gevuld met schapebloed in Alsever oplossing en gedurende 5 min. bij 3000 rpm afgedraaid in de centrifuge. Na afdraaien de bovenstaande vloeistof met de waterstraalpompe afzuigen en de schapecellen suspenderen in phys.zout uit de spuitfles. Opnieuw afdraaien.
Deze bewerking tenminste 4 maal herhalen. Wanneer na de 4e x wassen de bovenstaande vloeistof kleurloos en helder is, zijn de cellen bruikbaar. Anders nieuwe cellen nemen.
2. Cel volume meten in maatglas van 5 ml (meestal 3 tot 5 ml packed cells), de cellen opnemen in 20 volumina veronal buffer en overbrengen in de 200 ml erlenmeyer.
Goed mengen zodat er geen cellen op de bodem van het vat liggen.
3. Met vol. pipet 1,00 ml cell suspensie in het maatkolfje van 15 ml overbrengen. Kolfje aanvullen tot de maatstreep en de inhoud mengen.

4. Extinctie van de oplossing meten in de vitatron fotometer bij 539 m μ , 1 cm cuvet, digilog op stand 1. Stel de aflezing b.v. 0,700.
5. Bereken de benodigde hoeveelheid schapecel suspensie als volgt:

$$\frac{0,286}{0,700} \times 100 \text{ ml}$$
 is de hoeveelheid die nodig is voor 100 ml gesensibiliseerde cel suspensie (EA), voor de bereiding van 200 ml het dubbele enz.
 Meet de benodigde hoeveelheid suspensie af in een maatglas van 100 ml en breng het over in de 500 ml erlenmeyer. Voeg nu zoveel veronalbuffer toe dat het volume 100 ml wordt. Dat is: 100 ml - (2,5 ml (amboceptor 1/20) + 10 ml (gelatine 0,5%) + ml cell suspensie) ml veronalbuffer.
 Voor 200 ml dus: 200 - (5mlA) + 20 ml (gel) + ml cell suspensie enz. ml veronalbuffer.
6. Voeg druppelgewijs 2,5 ml Amb. 1:20 toe. Tijdens en na toevoegen goed schudden. De eindverdunding van de amb. is dus 1:800.
 De cellen zijn dan optimaal gesensibiliseerd. Deze verdunding moet bij iedere nieuwe batch Amboceptor met een amboceptor titratie bepaald worden (zie analyse voorschrift)
7. Tenslotte 10 ml 0,5% gelatine oplossing toevoegen.
 Sluit de erlenmeyer af met een rubber stop en klem hem in de schudmachine vast in het waterbad van 37°C. Schudmachine aanzetten en de cellen een half uur incuberen.
 Na afloop wordt de suspensie in een koelkast bij +4°C bewaard tot hij gebruikt wordt. De gesensibiliseerde cellen zijn als regel slechts 1 dag houdbaar.

B. Complement titratie

1. Plaats een reageerbuisrekje in de plastic bak en vul deze voor 1/4 deel met water en vervolgens met zoveel ijssnippers dat het rekje ermee bedekt is.
2. 10 genummerde reageerbuizen van 1,6 x 10 cm worden in het ijsbad geplaatst. Voor iedere volgende titratie die gelijktijdig uitgevoerd wordt zijn 7 buizen voldoende.
 Maak in buis 7 van de serie een serumverdunding 1 : 10 door 0,5 ml patienteserum (meetpipet) te verdunnen met 4,5 ml VB (meetpipet). Vervolgens de inhoud goed mengen op de whirlmix.

Bij iedere serie bepalingen in patiente sera wordt een titratie in normaal serum uit vloeibare stikstof gedaan.

3. Pipetteer vervolgens serum 1:10 en veronalbuffer in de buizen volgens onderstaand schema: met 0,5 ml en 0,2 ml meetpipet. (zie blz.5 t/m 7)
4. Verdun een deel E A suspensie met een gelijk volume veronalbuffer en pipetteer van deze 1:2 verdunning 3 ml in buis 1 t/m 6 en buis 8 en 9. Bij deze laatste 2 wordt nog 1 ml V.B. gevoegd (blanco's).
5. Tot slot wordt nog een buis met hetzelfde hemoglobine gehalte gemaakt als overeenkomt met 50,0% hemolyse: 1,5 ml EA(onv.) wordt in een drøge buis (10) gepipetteerd en aangevuld met 6,5 ml aqua dest. De cellen hemolyseren direct.
6. Alle buizen worden afgesloten met rubber kapjes en gemengd op de whirl-mix.
7. Plaats de buizen in de schudmachine in het 32°C waterbad en laat ze 1 uur schudden. Na een uur is de complement hemolyse reactie beëindigd en worden de buizen in de centrifuge geplaatst om de overgebleven cellen te verwijderen. Afdraaien: 5 min. bij 3000 rpm.

Wanneer men meerdere complement titraties achter elkaar moet doen is het soms sneller om inplaats van het verdunde serum met meetpipetten af te meten, onverdund serum met een agla micro buret in te pipetteren. Door de kleine hoeveelheid serum die hierbij in de buizen gebracht wordt, wordt het totale volume nauwelijks beïnvloed zodat het aanvullen met V.B. tot 1 ml achterwege kan blijven en men slechts de EA suspensie iets verder verdunnen moet (d.w.z. 3 delen EA + 5 delen veronalbuffer) om dezelfde celconcentratie te houden ($+ 1,9 \times 10^8$ c/ml).

De punten 2 t/m 4 veranderen dan in 2a, 3a en 4a.

- 2a. Dezelfde buizen als onder 2. Zet de agla buret in elkaar en zet de micro met schroef op 12,0. Houdt de buret verticaal en let op dat de glazen plunger met de punt tegen de stalen staaf van de micrometer schroef komt.

Vul nu het glazen deel van de buret tot de rand met serum met een pasteur pipet en plaats het slijpstuk met de naald samen op de buret. Stevig aandrukken. Draai nu de schroef 1 à 2 maal rond en kijk of er serum zonder luchtbellens uit de naald komt. Lukt dit niet, dan opnieuw vullen. Nu de buret met de naald schuin naar beneden houden en de micrometer schroef tot 10.00 doordraaien. Overtollig serum met tissue wegvegen.

Schema Ia voor de bepaling van de CH50 titer van patiente sera

Dit schema kan gevolgd worden wanneer de CH50 titer ligt tussen 35,0 en 66,5

Het schema wordt dan:

Buis	Verdunning	Serum 1:10	Ver.buffer	E A 1:2				
1	1: 125,9	0,318	0,682	3,0 ml				
2	1: 151,4	0,264	0,736	3,0 ml				
3	1: 182,0	0,220	0,780	3,0 ml				
4	1: 218,8	0,183	0,817	3,0 ml				
5	1: 263,0	0,152	0,848	3,0 ml				
6	1: 316,2	0,127	0,873	3,0 ml				

Buis	Verdunning	Log.verd.	Ml serum	STAND AGLA BURET				E A 3:8
				Begin:		Eind:		
				Vert.	Horiz.	Vert.	Horiz.	
1	1: 125,9	2,100	0,03178	10,0	0,0	8,0	41,0	4,0 ml
2	1: 151,4	2,180	0,02643	8,0	41,0	7,0	9,0	4,0 ml
3	1: 182,0	2,260	0,02198	7,0	9,0	5,5	49,0	4,0 ml
4	1: 218,8	2,340	0,01829	5,5	49,0	5,0	7,5	4,0 ml
5	1: 263,0	2,420	0,01521	5,0	7,5	4,0	31,5	4,0 ml
6	1: 316,2	2,500	0,01265	4,0	31,5	3,5	18,0	4,0 ml

Schema Ib voor de bepaling van de CH50 titer in patiente sera
tussen 66 en 160

Schema bij gebruik van meetpipetten en serum 1:20

Buis	Log.verd.	Ml serum 1:20	Ver.buffer	E A 1:2				
1	2,42	0,304	0,696	3,0 ml				
2	2,50	0,253	0,747	3,0 ml				
3	2,58	0,210	0,790	3,0 ml				
4	2,66	0,175	0,825	3,0 ml				
5	2,74	0,146	0,854	3,0 ml				
6	2,82	0,121	0,879	3,0 ml				
Buis	Verdunning	Log.verd.	Ml serum	STAND AGLA BURET				E A 3:8
				Begin:		Eind:		
				Vert.	Horiz.	Vert.	Horiz.	
1	1: 263	2,42	0,03042	15,0	0,0	13,0	48,0	4,0 ml
2	1: 316	2,50	0,02530	13,0	48,0	12,0	21,5	4,0 ml
3	1: 380	2,58	0,02104	12,0	21,5	11,0	16,0	4,0 ml
4	1: 457	2,66	0,01750	11,0	16,0	10,0	28,5	4,0 ml
5	1: 550	2,74	0,01456	10,0	28,5	9,5	6,0	4,0 ml
6	1: 661	2,82	0,01211	9,5	6,0	8,5	45,5	4,0 ml

Schema Ic voor de bepaling van de CH50 titer in patiente sera
tussen 12 en 35

Pipetteer schema bij gebruik van meetpipetten en serum 1:10 verdund

Buis	Verdunning	Serum 1:10	Ver.buffer	E A 1:2				
1	1: 39,8	1,005	--	3,0 ml				
2	1: 50,1	0,799	0,201	3,0 ml				
3	1: 63,1	0,634	0,366	3,0 ml				
4	1: 70,4	0,504	0,496	3,0 ml				
5	1: 100,0	0,400	0,600	3,0 ml				
6	1: 125,9	0,318	0,682	3,0 ml				
7	1: 158,5	0,252	0,748	3,0 ml				

Buis	Verdunning	Log.verd.	Ml serum	STAND AGLA BURET				E A 3:8
				Begin:		Eind:		
				Vert.	Horiz.	Vert.	Horiz.	
1	1: 39,8	1,60	0,1005	20,0	0,0	14,5	47,5	4,0 ml
2	1: 50,1	1,70	0,07986	14,5	47,5	10,5	48,0	4,0 ml
3	1: 63,1	1,80	0,06340	10,5	48,0	7,5	31,0	4,0 ml
4	1: 79,4	1,90	0,05039	7,5	31,0	5,0	29,0	4,0 ml
5	1: 100,0	2,00	0,04000	5,0	29,0	3,0	29,0	4,0 ml
6	1: 125,9	2,10	0,03178	3,0	29,0	1,5	20,0	4,0 ml
7	1: 158,5	2,20	0,02524	1,5	20,0	0,0	44,0	4,0 ml

Serum in de buizen pipetteren volgens onderstaand schema:

Zie pipetteerschema I Agla Buret. (blz. 5 t/m 7)

Na afloop buret uit elkaar nemen en schoon en droog maken en weer in elkaar zetten enz.

3a. 4 ml EA 3:8 in de buizen spuiten met de automatische pipet.

4a. Blanco's: in twee droge buizen 4 ml EA 3:8 spuiten.

8. Meting van de hemolyse graad

Van een van de blanco's (buis 8) wordt het bovenstaande overgegoten in een droge buis, waarna nog 4 ml veronalbuffer wordt toegevoegd.

9. Spoel de doorstroom cuvet van de vitatron colorimeter met aqua dest en zuig hem daarna leeg. Spoel de cuvet even voor met de 1:2 verdunde blanco. Vul nu de cuvet met een paar ml vloeistof en stel met de fijnregelknop (11) links onder aan de colorimeter de extinctie in op 0. Controleer dit even door op de onderste knop (A) van de digilog te drukken (knop voor de vermenigvuldigingsfactor (c) op 1). Het cijfer dat nu afgedrukt wordt mag niet boven de 3 komen, anders bijstellen.
10. Cuvet leegzuigen, voorspoelen met de inhoud van buis 10 (50% hemolyse waarde) en vullen met een paar milliliter van deze vloeistof. Zet de knop voor de vermenigvuldigingsfactor op 3 en de potentiometer daarboven (D) op 0,9. Druk op A en stel met de potentiometer zolang bij tot de afgedrukte extinctie 500 is d.w.z. 50,0% H. Daarna potentiometer vergrendelen.
11. Cuvet leegzuigen en spoelen met aqua dest. Nu spoelen en vullen met blanco (9). Goed oppassen dat er geen cellen meekomen!
Knop C op 1 zetten en met 11 bijstellen op extinctie 0.
Controleren met digilog of het gedrukte getal maximaal 3 is.
12. Knop C terug zetten op 3. Teller van de digilog op 000 stellen door op knop B te drukken. Vervolgens de monsters 1 t/m 6 enz. meten.
Steeds even voor spoelen met een klein beetje van de te meten vloeistof.
Oppassen dat er geen cellen meegaan. De gedrukte cijfers geven nu direct de hemolyse graad (Y) in procenten aan.

Berekening van de CH50 titer

Bij de berekening van de CH50 titer wordt gebruik gemaakt van de formule van von Krogh: $\text{Log } x = \text{Log } K + \frac{1}{n} \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$ (x = serum verdunning, y = hemolyse graad).

Op grafiek papier wordt op de x as een schaal verdeling gemaakt van $\log \left(\frac{y}{1-y} \right)$. Van: -0,9; -0,8; -0,7 t/m -0,9; 0; +0,1; +0,2 t/m 1,0 (van links naar rechts). 0,1 schaal deel is 1 cm.

Op de y as wordt een verdeling gemaakt van de log van de verdunning van 2,0; 2,1 t/m 2,6 (van onder naar boven), weer is 0,1 schaal deel 1 cm.

De log van de zes verdunningen worden ingetekend op de y as, deze logaritmen staan vermeld in de tabel voor het maken van de verdunningen.

Het doel van de grafiek is het vinden van een rechtlijnig verband tussen de $\log \frac{y}{1-y}$ en de log verdunning. Het snijpunt van deze lijn met de waarde

$\log \frac{y}{1-y} = 0$ geeft de log van de verdunning waarbij 50% hemolyse optreedt.

De waarde van $\log \frac{y}{1-y}$ van iedere afzonderlijke verdunning vindt men door bij de hemolyse graad y die op de papierstrook gedrukt staat, in de tabel van $\log \frac{y}{1-y}$ waarden de bijbehorende waarde hiervan op te zoeken.

In de grafiek tekent men dan de gevonden punten in en trekt hierdoor een lijn zodanig, dat de meeste punten erop liggen. Wanneer de bepaling goed uitgevoerd is liggen tenminste vier punten op een rechte lijn. Lukt dit niet dan moet hij over gedaan worden.

Bij het snijpunt van deze lijn met $\log \frac{y}{1-y} = 0$ zoekt men de hiermee overeenkomende log verdunning op. Deze zoekt men terug in een anti-logaritmen tabel en vindt hiermee de verdunning waarbij 50% hemolyse optreedt. Deze verdunning is berekend t.o.v. een reactie volume van 4 ml. De reciproke waarde van deze verdunning wordt daarom door 4 gedeeld. Dit is dan de gezochte CH50 titer.

Behalve de CH50 titer wordt bij een patientserum ook nog het complement gehalte t.o.v. normaal serum opgegeven, dat is:

$$\frac{\text{CH50 titer patientserum}}{\text{CH50 titer normaal serum (uit vl.stikstof)}} \times 100\%$$

TABEL VAN DE LOG. Y / 1-Y WAARDEN

Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	-.955	-.951	-.943	-.939	-.935	-.932	-.924	-.921	-.917	-.914
11	-.907	-.903	-.900	-.896	-.889	-.886	-.883	-.876	-.873	-.870
12	-.866	-.860	-.857	-.854	-.848	-.845	-.842	-.839	-.833	-.830
13	-.827	-.824	-.818	-.815	-.810	-.807	-.804	-.799	-.796	-.793
14	-.788	-.785	-.780	-.777	-.775	-.770	-.767	-.765	-.759	-.757
15	-.754	-.750	-.747	-.742	-.740	-.737	-.733	-.730	-.726	-.723
16	-.721	-.717	-.714	-.710	-.708	-.703	-.701	-.699	-.695	-.692
17.	-.688	-.686	-.682	-.680	-.676	-.674	-.670	-.668	-.663	-.661
18.	-.658	-.656	-.654	-.650	-.648	-.644	-.640	-.638	-.634	-.633
19	-.629	-.627	-.623	-.622	-.618	-.616	-.613	-.611	-.607	-.605
20	-.602	-.599	-.597	-.593	-.592	-.588	-.587	-.583	-.580	-.578
21	-.575	-.573	-.570	-.567	-.565	-.562	-.559	-.557	-.554	-.553
22	-.550	-.547	-.545	-.542	-.539	-.538	-.535	-.532	-.530	-.527
23	-.524	-.523	-.520	-.517	-.516	-.513	-.510	-.507	-.506	-.503
24	-.500	-.498	-.496	-.493	-.491	-.488	-.487	-.484	-.481	-.479
25	-.478	-.475	-.472	-.470	-.468	-.466	-.463	-.461	-.458	-.456
26	-.455	-.452	-.450	-.447	-.445	-.442	-.441	-.439	-.436	-.434
27	-.432	-.429	-.427	-.425	-.424	-.421	-.419	-.417	-.414	-.412
28	-.410	-.408	-.406	-.403	-.401	-.399	-.397	-.395	-.394	-.391
29	-.389	-.387	-.385	-.383	-.381	-.379	-.377	-.375	-.372	-.370
30	-.367	-.365	-.363	-.361	-.359	-.357	-.356	-.354	-.352	-.350
31	-.348	-.346	-.344	-.341	-.339	-.337	-.335	-.333	-.332	-.330
32	-.327	-.325	-.323	-.321	-.320	-.318	-.315	-.313	-.312	-.310
33	-.307	-.305	-.304	-.302	-.299	-.298	-.296	-.294	-.292	-.290
34	-.288	-.286	-.284	-.282	-.281	-.278	-.276	-.275	-.272	-.271
35	-.269	-.267	-.265	-.263	-.261	-.259	-.257	-.256	-.253	-.252
36	-.249	-.248	-.246	-.244	-.243	-.240	-.239	-.237	-.235	-.233
37	-.231	-.229	-.228	-.225	-.224	-.222	-.220	-.218	-.216	-.215
38	-.212	-.210	-.209	-.207	-.205	-.203	-.201	-.200	-.198	-.196
39	-.194	-.192	-.190	-.189	-.187	-.185	-.183	-.182	-.180	-.178
40	-.176	-.175	-.173	-.171	-.169	-.167	-.165	-.164	-.162	-.160
41	-.158	-.156	-.154	-.152	-.151	-.149	-.147	-.146	-.144	-.142
42	-.140	-.138	-.137	-.135	-.133	-.131	-.130	-.128	-.126	-.124
43	-.123	-.121	-.119	-.116	-.115	-.113	-.112	-.110	-.108	-.106
44	-.105	-.103	-.101	-.100	-.097	-.096	-.094	-.093	-.090	-.089
45	-.087	-.085	-.083	-.082	-.080	-.078	-.077	-.075	-.073	-.072
46	-.070	-.068	-.066	-.064	-.062	-.061	-.059	-.057	-.055	-.054
47	-.052	-.051	-.049	-.047	-.045	-.043	-.042	-.040	-.038	-.037
48	-.035	-.033	-.031	-.030	-.028	-.026	-.024	-.023	-.021	-.019
49	-.017	-.015	-.014	-.012	-.011	-.009	-.007	-.005	-.003	-.002
Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

TABEL VAN LOG. Y / 1-Y WAARDEN

Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Y
50	.000	.002	.004	.005	.007	.009	.010	.012	.014	.016	50
51	.018	.019	.021	.022	.025	.026	.028	.029	.031	.033	51
52	.035	.037	.038	.040	.042	.043	.045	.047	.049	.050	52
53	.052	.054	.056	.057	.059	.061	.063	.065	.066	.068	53
54	.070	.072	.073	.075	.077	.079	.080	.082	.084	.085	54
55	.087	.089	.091	.092	.094	.096	.097	.099	.101	.103	55
56	.105	.107	.108	.110	.112	.114	.115	.117	.119	.121	56
57	.123	.124	.126	.128	.130	.131	.133	.135	.137	.138	57
58	.140	.142	.144	.146	.147	.149	.151	.153	.154	.156	58
59	.158	.160	.162	.164	.165	.167	.169	.171	.173	.174	59
60	.176	.178	.180	.182	.183	.185	.187	.189	.191	.193	60
61	.194	.196	.198	.200	.202	.203	.205	.207	.209	.211	61
62	.213	.215	.216	.218	.220	.222	.224	.226	.227	.229	62
63	.231	.233	.235	.237	.239	.241	.242	.244	.246	.248	63
64	.250	.252	.254	.256	.257	.259	.261	.263	.265	.267	64
65	.269	.271	.273	.275	.277	.279	.280	.282	.284	.286	65
66	.288	.290	.292	.294	.296	.298	.300	.302	.304	.306	66
67	.308	.310	.312	.313	.315	.317	.319	.321	.324	.325	67
68	.327	.329	.331	.333	.336	.338	.340	.341	.343	.345	68
69	.348	.350	.352	.354	.356	.358	.360	.362	.364	.366	69
70	.368	.370	.372	.374	.376	.378	.380	.383	.385	.387	70
71	.389	.391	.393	.395	.397	.400	.402	.404	.406	.408	71
72	.410	.412	.415	.417	.419	.421	.423	.425	.428	.430	72
73	.432	.434	.436	.439	.441	.443	.445	.448	.450	.452	73
74	.454	.457	.459	.461	.463	.466	.468	.470	.473	.475	74
75	.477	.479	.482	.484	.486	.489	.491	.494	.496	.498	75
76	.501	.503	.505	.508	.510	.513	.515	.518	.520	.522	76
77	.525	.527	.530	.532	.535	.537	.540	.542	.545	.547	77
78	.550	.552	.555	.557	.560	.562	.565	.568	.570	.573	78
79	.575	.578	.581	.583	.586	.589	.591	.594	.597	.599	79
80	.602	.605	.608	.610	.613	.616	.619	.621	.624	.627	80
81	.630	.633	.635	.638	.641	.644	.647	.650	.653	.656	81
82	.659	.662	.665	.668	.670	.673	.676	.679	.683	.686	82
83	.689	.692	.695	.698	.701	.704	.707	.711	.714	.717	83
84	.720	.723	.727	.730	.733	.737	.740	.743	.747	.750	84
85	.753	.757	.760	.764	.767	.771	.774	.778	.781	.785	85
86	.788	.792	.796	.799	.803	.807	.810	.814	.818	.822	86
87	.826	.829	.833	.837	.841	.845	.849	.853	.857	.861	87
88	.865	.869	.874	.878	.882	.886	.891	.895	.899	.904	88
89	.908	.912	.917	.922	.926	.931	.935	.940	.945	.949	89
90	.954	.959	.964	.969	.974	.979	.984	.989	.994	1.000	90
Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Y