

## MANUEL D'UTILISATION

# Bio-T kit<sup>®</sup> AIV genotype H9

Cat. N° BIOTK083 - 50 réactions

**Détection des Virus de l'Influenza Aviaire type A de sous-type H9 (H9)  
par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR)  
avec contrôle positif interne (IC) exogène**

### AVIAIRES

#### Types de prélèvements

- Ecouvillons Trachéaux ou Oropharyngés
- Ecouvillons Cloacaux
- Organes ou surnageants de broyats d'organes
- Analyses individuelles ou en mélange jusqu'à 10 selon la réglementation locale et selon le type de prélèvement, et sauf indications contraires, selon l'espèce animale, l'origine géographique et la date de prélèvement.

#### Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract<sup>®</sup> SuperBall<sup>®</sup> Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract<sup>®</sup> Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

*Réservé à l'usage vétérinaire*



## GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® AIV genotype H9 dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kits® Avian & Swine Influenza Virus, AIV genotypes H5 & H7 et AIV genotype H9, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® AIV genotype H9, détaillant les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit® AIV genotype H9.

En plus de ces deux manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® AIV genotype H9 sont disponibles sur demande, contacter BioSella (contact@biosellal.com).

## GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous :

| Gestion des révisions                         |                                                                               |                                                                          |                                                                          |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Type de modification<br>Couleur de Surlignage | Modifications mineures                                                        | Modifications majeures 1                                                 | Modifications majeures 2                                                 |
| Impact sur la révision/version                | Changement de la date de révision du document<br>Pas de changement de version | Changement de la date de révision du document<br>+ changement de version | Changement de la date de révision du document<br>+ changement de version |
| Impact sur l'adoption de la méthode autorisée | Aucun<br>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)                         | Aucun                                                                    | Nouvelle adoption nécessaire                                             |
| Exemples de modifications                     | Corrections :<br>typographique, grammaticale ou de mise en forme              | Changement de référence d'un EPC                                         | Modification de la recette du Master Mix                                 |
|                                               | Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction                                 | Changement de référence d'un IPC exogène                                 | Modification du protocole d'extraction validé                            |
|                                               | Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole    |                                                                          |                                                                          |
|                                               | Ajout/Suppression d'informations optionnelles                                 |                                                                          |                                                                          |

## PRESENTATION

### Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de RT-PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries/parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSellal recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

#### Prélèvements

Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

#### Envoi

Le prélèvement et la conservation des échantillons doivent répondre aux exigences de la législation de votre pays, et par défaut, aux spécifications du manuel de l'OIE.

#### Conservation après réception

Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception ou congélation à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  pour quelques mois et à  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  au-delà de 1 an.

## Gamme AVIAN

Ce kit appartient à la gamme AVIAN qui regroupe un ensemble de kits partageant des protocoles d'extraction et de RT-PCR communs, sauf exceptions (Informations disponibles via [contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)).

## Description du Bio-T kit® AIV genotype H9

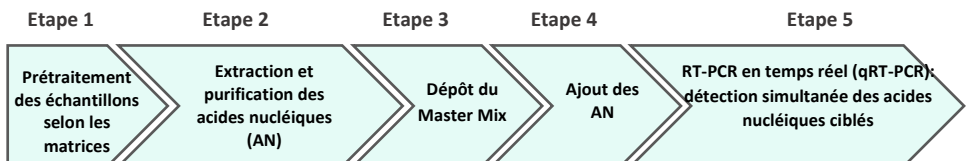
Le **Bio-T kit® AIV genotype H9** (Cat. N° BIOTK083) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- De **Virus** de l'Influenza Aviaire type A de sous-type H9 (H9) grâce à un marquage 6-FAM,
- D'un **contrôle positif exogène IC** ARN, grâce à un marquage Cy5, à ajouter, lors de l'extraction des acides nucléiques afin de valider la qualité de l'extraction des acides nucléiques et l'absence d'inhibition de la réaction de reverse transcription et d'amplification.

Ce kit, basé sur une détection qualitative de H9 (détecté ou non détecté), à partir de prélèvements de type écouvillons trachéaux ou oropharyngés, écouvillons cloacaux, organes ou surnageants de broyats d'organes, a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2** éditée par l'**AFNOR** et selon le **cahier des charges du Laboratoire National de Référence (LNR)** de l'Influenza aviaire (**ANSES Ploufragan-Plouzané**).

Les méthodes d'extraction validées sont décrites dans le manuel d'extraction commun aux **Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus**, **Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7** et **Bio-T kit® AIV genotype H9**.

## Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qRT-PCR



| Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus, Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7 et Bio-T kit® AIV genotype H9 |                                                  | Manuel d'utilisation du Bio-T kit® AIV genotype H9 |                                                                  |                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ecouvillons Trachéaux ou Oropharyngés*<br><br>Ecouvillons Cloacaux*<br><br>Organes ou Surnageants de broyats d'organes                  | BioExtract® SuperBall®<br><br>BioExtract® Column | Master Mix prêt à l'emploi MMH9-A                  | Echantillons NC/NCS<br>Témoin positif de processus EPC (EPCH9-A) | Détecteurs : FAM/Cy5<br><br>Référence passive : ROX<br><br>Programmes : PIG/AVIAN avec RT en ramping Fast ou Fast |

\* prétraitement obligatoire

**Tableau 1. Descriptif du contenu du kit**

| Description                                                                             | Référence | Volume /tube | Présentation                              | Conservation                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>Master Mix (MM)</b><br>Prêt à l'emploi                                               | MMH9-A    | 750 µl       | tube<br>bouchon gris<br>Sachet A          | ≤-16°C<br>à l'abri de la<br>lumière,<br>Zone « MIX »         |
| <b>Internal Control (IC)<br/>exogène</b><br>Contrôle d'amplification<br>exogène         | IPCRNA-A  | 250 µl       | tube<br>bouchon <b>violet</b><br>Sachet B | ≤-16°C<br>Zone<br>« Extraction »                             |
| <b>External Positive Control<br/>(EPC)</b><br>Contrôle positif d'amplification<br>de H9 | EPCH9-A   | 110 µl       | tube<br>bouchon <b>rouge</b><br>Sachet C  | ≤-16°C<br>Zone<br>« Ajout d'acides<br>nucléiques »           |
| <b>Eau</b><br>RNase/DNase free                                                          | Aqua-A    | 1 ml         | tube<br>bouchon <b>bleu</b><br>Sachet C   | 5°C ±3 ou ≤-16°C<br>Zone<br>« Ajout d'acides<br>nucléiques » |

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

## Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

**Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit**

| Consommable / Réactif         | Description                                                    | Fournisseur | Cat. N°  |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------|----------|
| <b>Tampon ATL</b>             | Tampon de Lyse                                                 | BioSellal   | ATL19076 |
| <b>BioExtract® Column</b>     | Kit d'extraction ADN/ARN<br>format colonne (50)                | BioSellal   | BEC050   |
| <b>BioExtract® Column</b>     | Kit d'extraction ADN/ARN<br>format colonne (250)               | BioSellal   | BEC250   |
| <b>BioExtract® SuperBall®</b> | Kit d'extraction ADN/ARN<br>format billes magnétiques (4 x 96) | BioSellal   | BES384   |

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

## Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (à minima : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- **Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à  $5^{\circ}\text{C} \pm 3$  lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.**
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la **gamme AVIAN** sont à ADN ou à ARN. **Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN** (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), **il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN:**
  - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
  - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
  - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
  - o Utiliser des consommables « RNases free ».
  - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  ou à défaut à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$ .
  - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

# DETECTION DU SOUS-TYPE H9 DE L'INFLUENZA AVIAIRE PAR qRT-PCR AVEC LE KIT BIOTK083

## Procédure globale à suivre

### 1) Etablir un plan de plaque définissant la position de chaque échantillon et incluant les contrôles décrits ci-dessous:

- **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction voir de prétraitement.  
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait d'acides nucléiques au moment du dépôt sur la plaque qRT-PCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.  
Ce contrôle est recommandé lors de la 1ère utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
- **Contrôle positif d'amplification de H9 (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCH9-A**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques de H9.  
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

 **ATTENTION** : La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur la plaque.

### 2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMH9-A** (tube bouchon gris) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).
-  Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à 5°C ± 3 lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.

#### Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau ou EPC: tube EPCH9-A, bouchon rouge)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, au contact du Master Mix et en évitant de faire des bulles.

*Note* : dans le cas où l'IC exogène n'aurait pas été ajouté lors de l'extraction des échantillons, il est possible de l'ajouter au moment de la préparation de la plaque qRT-PCR.

- **Ajouter 1 µl d'IC (bouchon violet) en plus des acides nucléiques extraits**
- Ou ajouter directement l'IC (1 µl par réaction) dans un aliquote de Master Mix avant de déposer 16 µl de ce mélange dans chaque puits d'intérêt et d'y ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits. Le volume réactionnel sera porté à 21 µl final, sans impacter l'efficacité de la qRT-PCR.

3. Filmer la plaque avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

#### Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 3, Tableau 4, Tableau 5)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles et de placer les acides nucléiques au contact du Master Mix.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 90 min.

### 3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping Fast et ramping Standard. Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

| Tableau 3. Configuration du thermocycleur |                                  |                                      |
|-------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
|                                           | ABI PRISM® 7500 Fast             | AriaMx™                              |
| <b>Mode</b>                               | Quantitation – Standard curve    | Quantitative PCR, Fluorescence Probe |
| <b>Ramping</b>                            | Ramping Standard ou Ramping Fast | Ramping Fast par défaut              |
| <b>Référence passive</b>                  | ROX                              | ROX                                  |

| Tableau 4. Paramètres de réglage du thermocycleur |            |                     |                                                                                |
|---------------------------------------------------|------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Cible                                             | Détecteurs |                     | Volume final / puits                                                           |
|                                                   | Reporter   | Quencher            |                                                                                |
| H9                                                | FAM        | NFQ-MGB<br>ou None* | 20 µl<br><br>= 15 µl Master Mix + 5 µl<br>d'acides nucléiques ou<br>contrôles† |
| IC exogène                                        | Cy5        | NFQ-MGB<br>ou None* |                                                                                |
| à attribuer aux échantillons et contrôles†        |            |                     |                                                                                |

\* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSellaal (tech@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), l'EPC (ADN cible de H9).

| Tableau 5. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN AVEC RT |                           |             |
|-------------------------------------------------------|---------------------------|-------------|
| Ramping Standard ou Fast                              |                           |             |
| Cycles                                                | Temps                     | Température |
| 1 cycle                                               | 20 min                    | 50°C        |
| 1 cycle                                               | 5 min                     | 95°C        |
| 40 cycles                                             | 10 sec                    | 95°C        |
|                                                       | 45 sec                    | 60°C        |
|                                                       | + acquisition des données |             |

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des kits de la gamme PIG et AVIAN.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qRT-PCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations selon les paramètres définis dans l'**Annexe C de la norme NF U47-600-1**. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de RT-PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qRT-PCR est validée si les contrôles (EPC, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

## Principaux cas de figures

### Lecture des Contrôles

Tableau 6. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

|                                                                                                                                              | Cibles                                       |                     | Interprétation                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                              | H9<br>(FAM)                                  | IC exogène<br>(Cy5) |                                                                                                                           |
| <b>NCS</b><br>Contrôle Négatif de<br>processus<br><br><b>OBLIGATOIRE</b>                                                                     | Neg                                          | Pos                 | <b>Validé</b>                                                                                                             |
|                                                                                                                                              | Pos                                          | Pos                 | Contamination avec un échantillon positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.                         |
|                                                                                                                                              | Neg                                          | Neg                 | Oubli d'ajout de l'IPC exogène ?<br>Extraction défectueuse                                                                |
| <b>NC</b><br>Contrôle Négatif<br>d'amplification<br><br><b>FACULTATIF</b>                                                                    | Neg                                          | Neg                 | <b>Validé</b>                                                                                                             |
|                                                                                                                                              | Au moins une des deux valences<br><b>Pos</b> |                     | Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau. |
| <b>EPC</b><br>Contrôle Positif<br>d'amplification de<br>H9<br><br><b>OBLIGATOIRE</b><br><i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF<br/>DE PROCESSUS</i> | Pos*                                         | Neg                 | <b>Validé</b>                                                                                                             |
|                                                                                                                                              | Neg                                          | Neg                 | Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix? Oubli de l'EPC?                                                        |
|                                                                                                                                              | Pos*                                         | Pos                 | Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.                                                     |

\* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).

† La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle

‡ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par Biosella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® AIV genotype H9. Biosella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

## Lecture des Echantillons extraits

**Tableau 7. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons**

| Cibles      |                      | Interprétation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H9<br>(FAM) | IPC exogène<br>(Cy5) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Neg         | Pos*                 | Négatif ou Non détecté                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Pos         |                      | Positif ou Détecté                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Pos         | Neg ou Ct>35         | Positif ou Détecté<br>Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène<br>Présence d'inhibiteurs <sup>†</sup> ?<br>Compétition avec la cible ?                                                                                                                                                                                                                 |
| Neg         | Neg ou Ct>35         | Ininterprétable = analyse à refaire<br>Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ?<br>Présence d'inhibiteurs <sup>†</sup> ?<br>Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ?<br>Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène ?<br>Problème lors de l'extraction ? |

\* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par Biosellal, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® AIV genotype H9. Biosellal recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

† En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qRT-PCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.



[www.biosellal.com](http://www.biosellal.com)

### Support Technique

[tech@biosellal.com](mailto:tech@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 62

### Renseignements et commandes

[contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 60

