

# Recherches sur les facteurs nécessaires à la culture « in vitro » de *Trypanosoma evansi* \*

par J. BALIS

Les premières cultures de trypanosomes pathogènes de mammifères en particulier de *T. brucei*, ont été réalisées en 1903 par NOVY et MAC NEAL.

Le milieu employé appelé N N était constitué de gélose nutritive peptonée à 1 ou 3 % à laquelle on incorporait du sang défibriné à raison de 1 à 2 fois son volume.

Les flagellés se développaient dans le liquide de condensation.

Ce milieu fut simplifié par NICOLLE en 1908, qui en supprimait la peptone et incorporait à la gélose un tiers ou un quart de son volume de sang défibriné de lapin (milieu N N N).

Par la suite, d'autres types de milieux furent mis au point par différents auteurs, qui insistèrent sur les rôles très importants du glucose et du sang. Citons les milieux de PONSELLE (1924), BRUTSAERT et HENRARD (1936), PACKANIAN (1959) et WEINMAN (1960).

Malheureusement, il semble qu'aucun ne permette une culture parfaite et abondante des trypanosomes pathogènes.

Les flagellés obtenus présentent les mêmes caractères que ceux trouvés dans le tube digestif de la glossine.

D'une façon générale, les auteurs sont d'accord pour affirmer que les trypanosomes de culture des groupes *brucei* et *congolense*, ne sont pas pathogènes. Cependant BRUTSAERT et HENRARD (1936), déclarent avoir pu infecter 2 chèvres avec un *T. congolense* en culture depuis 156 jours ; WEINMAN (1960) aurait pu rendre

virulente une souche de *T. rhodesiense* par addition de tréhalose au milieu. Mais plusieurs auteurs (FULTON 1960, LEHMAN 1961) n'ont jamais pu reproduire cette expérience. BOWMAN, VON BRAND et TOBIE (1960) ont même montré que *T. rhodesiense* était incapable d'utiliser le tréhalose.

Tous les trypanosomes pathogènes ne cultivent pas avec la même facilité. Ceux du groupe *brucei* sont les moins exigeants, à condition toutefois d'effectuer de temps en temps un passage par la glossine, car une souche entretenue trop longtemps sur l'animal perd toute faculté de croître, à la fois *in vitro* et chez l'insecte.

La culture de *T. congolense* est plus difficile mais a cependant été réalisée par plusieurs auteurs (REICHENOW 1934, 1936, 1937, BRUTSAERT et HENRARD 1936, TOBIE 1958, VON BRAND et TOBIE 1959, FULTON 1960, LEHMAN 1961).

Enfin, *T. evansi*, *T. vivax* et *T. equiperdum* ne se développent pas sur milieux inertes et on observe tout au plus une survie de 2 à 3 jours.

Il est surtout intéressant de pouvoir cultiver les trypanosomes sous leur forme pathogène ; d'après LWOFF (1940), ce caractère va presque toujours de pair avec une diminution du pouvoir de synthèse. C'est également ce qu'a constaté KRIGJSMAN (1936) à propos de *T. evansi*. Ce dernier ne possède, en effet, ni pepsine, ni trypsine, ni lipase et ne peut former des réserves de glycogène par manque de carbohydrases. Il est un gros consommateur de glucose dont il tire une grande partie de l'énergie nécessaire à ses synthèses. Nous pouvons poser comme hypothèse qu'un milieu de culture permettant à un tel flagellé de se multiplier, sera également capable de conserver le pouvoir

(\*) Nous avons écarté de notre exposé les méthodes de culture sur milieux vivants (cultures de tissus ou œufs embryonnés).

Rev. Elev. Méd. vét Pays trop. 1963, n° 2.

Reçu pour publication : Avril 1963.

pathogène d'autres trypanosomes moins exigeants et l'objet du présent travail est d'essayer de déterminer dans leurs grandes lignes, les groupes de facteurs nécessaires à la culture de *T. evansi*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre souche de *T. evansi* a été obtenue en décembre 1960, à partir d'un âne de Fort-Lamy. Elle a été conservée par passages sur rats et cobayes.

Le principe de la méthode consiste à ensemencher le milieu à essayer avec du sang de rat fortement parasité ; dans les heures ou les jours qui suivent on compte le nombre de trypanosomes vivants par champ microscopique. Cette évaluation est évidemment assez grossière mais s'avère tout à fait suffisante et a le grand avantage de permettre un travail rapide. Dans certains cas elle a été complétée par une numération à l'hématimètre.

Dans une première série de travaux, la survie ne dépassant pas 24 heures, nous avons pu travailler sans précautions spéciales de stérilité grâce à l'emploi de pénicilline à raison de 2.000 UI par cm<sup>3</sup> de milieu.

Par la suite la survie étant plus longue, nous avons été dans l'obligation de travailler stérilement.

Le milieu de base employé dans la première série de travaux a été le sang défibriné de cheval à raison de 2 ml par tube.

Dans un tel milieu *T. evansi* a en général disparu complètement au bout de 12 heures.

Par conséquent, toute substance additionnelle, permettant une survie nettement supérieure au témoin, pourra être considérée comme intéressante.

On ne tient compte dans chaque expérimentation que des résultats très nets. A titre d'exemple nous donnons un protocole sommaire dans lequel ont été expérimentés à la fois, le glucose, la glycérine et la vitamine C.

Chaque ensemble représente le contenu d'un tube à essais.

tube n° 1.

— 2 ml de sang de cheval + 5 gouttes de sang de rat parasité = S + s ;

tube n° 2.

S + s + Vit. C (1 mg) ;

tube n° 3.

S + s + Vit. C + 2 gouttes de glucose en solution à 25 p. 100 ;

tube n° 4.

S + s + Vit. C + 2 gouttes d'une dilution à 25 p. 100 de glycérine ;

tube n° 5.

S + s + glycérine ;

tube n° 6.

S + s + glucose.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau n° 1

Nombre de trypanosomes vivants par champ					
tube n°	après 1 h	après 2 h	après 5h	après 8h	après 13h
1	50	48	2,4	0,6	0
2	55	49	3,8	1,2	0
3	60	50	32	43	11,6
4	40	39	5,6	1,6	4,2
5	40	39	10,4	6	3,8
6	70	60	41	55	9,2

Nous voyons en premier lieu par comparaison des tubes 1 et 6 que le glucose est favorable à la survie des trypanosomes.

On peut encore déduire (tubes 1 et 5) que la glycérine peut être métabolisée par *T. evansi* mais à un moindre degré que le glucose.

Enfin pour la vitamine C, les résultats ne sont pas significatifs. Il serait fastidieux pour la suite de notre exposé de détailler l'exécution des 25 protocoles qui se recoupent partiellement et portent sur 420 essais.

## RÉSULTATS OBTENUS EN MILIEUX NON STÉRILES

Le milieu de base est constitué par du sang défibriné de cheval.

1) **Glucose** : c'est vraiment la principale source énergétique. Le sang circulant en contient environ 0,90 gr par l. mais *in vitro* la glycolyse est

très rapide et en l'espace de quelques heures il n'en persiste que des traces.

Une addition de glucose au sang permet une survie 3 à 4 fois plus longue ; la toxicité du glucose est pratiquement nulle puisqu'il faut atteindre des doses de 160 g par l pour supprimer toute survie.

La quantité optimum est comprise entre 10 et 20 g par l.

**2) Glycérine** : L'expérience montre que la glycérine peut être utilisée par *T. evansi* mais d'une façon moins importante que le glucose.

**3) Vitamine C et B 12** : Nous n'avons pu mettre en évidence leur action. On ne décèle aucune différence notable quand on ajoute au milieu des doses entre 12 et 200 mg de vitamine C par l.

Le sang en contient normalement 10 à 15 mg par l. Si *T. evansi* utilise la vitamine C, il n'est donc pas un gros consommateur et dans ce cas la quantité contenue dans le sang est tout à fait suffisante.

Des doses de vitamine B 12 variant entre 1 et 20 gammas par ml n'ont eu aucune influence.

**4) Apport azoté** : Il est évident, mais dans les conditions de nos expériences le métabolisme des substances azotées est beaucoup moins important que celui du glucose.

Nous avons essayé la peptone Difco, l'autodigestat de pancréas, mais les meilleurs résultats nous ont été fournis par un autodigestat de poisson connu sous le nom de « Nuoc mam ». On est limité par sa très forte concentration en chlorure de sodium et on ne peut dépasser 20 ml de produit brut par l de milieu. Outre le sel marin, le « Nuoc mam » contient des acides aminés (BLASS et RICHARD, 1952).

**5) Calcium** : introduit sous forme de chlorure il semble avoir une influence favorable à condition de ne pas dépasser 0,50 g par l.

Nous avons essayé d'introduire le calcium sous forme de gluconate mais *T. evansi* s'est révélé absolument incapable de métaboliser un tel produit.

**6) Influence du pH** : il a une très grande importance, l'optimum se trouve aux environs de pH 7,5.

**7) Oxygénation** : Classiquement *T. evansi* est un organisme aérobique qui assimilerait l'oxygène grâce à l'hémoglobine dont la nécessité absolue

pour de nombreux flagellés a été mise en évidence par LWOFF (1940).

L'expérience nous a montré qu'il est beaucoup plus intéressant d'introduire l'hémoglobine sous forme de sang hémolysé que sous forme de sang ayant ses hématies intactes. Le dixième en volume du milieu est suffisant. Dans un milieu pratiquement dépourvu de sang la survie n'est que de 2 ou 3 heures.

Une aération constante du milieu n'est pas nécessaire. Les résultats ont été en effet identiques sur les tubes laissés au repos, agités périodiquement, ou dans lesquels on faisait barboter de l'air en permanence.

**8) Pression osmotique** : elle doit autant que possible se rapprocher de celle du sang, c'est-à-dire 6,7 atmosphères.

Nous avons pu constater, en utilisant des solutions de glucose de concentrations croissantes, que la survie est stable entre 6 et 10 atmosphères, qu'elle est faible à partir de 18, et qu'elle est supprimée à partir de 29 atmosphères. Par contre une forte hypotonie est rapidement mortelle, l'eau distillée est même un excellent stérilisant.

Ces différentes recherches nous ont amené à formuler le milieu de survie suivant :

Sang de cheval .....	20 ml
Liquoide Roche (solution à 1 p. 100) ..	2 ml
Eau distillée .....	180 ml

Hémolyse à la température du laboratoire pendant 1 heure.

Nuoc mam ordinaire : .....	4 ml
Phosphate bipotassique: .....	2 g
Glucose .....	4 g
Chlorure de calcium à 1 p. 100 : .....	2 ml

Ajuster si nécessaire à pH 7,5 avec une solution de phosphate monopotassique à 10 p. 100.

Filtration plusieurs fois sur papier.

Filtration sur Seitz et répartition.

## RÉSULTATS OBTENUS EN MILIEUX STÉRILES

Le milieu précédemment mis au point a été essayé sous forme liquide et sous forme diphasique avec ou sans sérum.

Le tableau n° 2 résume cette expérimentation, 5 séries de 5 tubes ont été utilisées. Au départ de

l'expérience, le milieu liquide a été ensemencé en bloc puis réparti dans les tubes à essais des 5 séries. A l'examen direct on pouvait dénombrer 80 trypanosomes par champ.

Tableau n° 2

Série N°	Phase liquide	Phase solide	Nombre de trypanosomes par champ	
			Après 24 h	Après 48 hs
1	milieu liquide	gélose physiologique à 2%	16	2
2	milieu liquide	gélose à 4% + milieu liquide	29	10
3	milieu liquide + 50% sérum de cheval	gélose à 4% + milieu liquide	53	16
4	milieu liquide		16	5
5	milieu liquide + sérum de cheval		29	20

Nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1) Les milieux diphasiques sont nettement supérieurs aux milieux liquides (comparaison entre la 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> série).

2) Le sérum de cheval apporte un facteur de croissance (comparaison entre les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> séries d'une part, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> séries d'autre part).

3) Le facteur de croissance contenu dans le sérum diffuse en assez grande quantité dans la gélose en l'espace de 48 heures et se trouve donc perdu pour les trypanosomes alors qu'en milieu liquide aucune diffusion n'est possible (comparaison des 3<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> série). Cette diffusibilité apparaît également par comparaison des séries 1 et 2 ; en effet, dans la série 1 le facteur de croissance, présent en faible quantité dans le milieu liquide, diffuse dans la gélose physiologique et se trouve donc en grande partie perdu pour les trypanosomes.

D'après KLIGER, GEIGER et COMAROFF (1930), au cours du métabolisme du glucose, les trypanosomes libèrent surtout de l'acide lactique à un taux qu'ils ne peuvent supporter. Il est donc

nécessaire de neutraliser cet acide en ajoutant un carbonate ou un tampon.

Nous avons expérimenté successivement le carbonate de calcium et un tampon constitué par un mélange de phosphates mono et dipotassique en proportions convenables de façon à obtenir pH 7,5.

Le carbonate de calcium, étant insoluble ne peut par lui-même faire monter le pH. Il améliore quelque peu la survie mais les meilleurs résultats sont obtenus avec le tampon phosphaté.

En dehors de l'effet tampon, les phosphates minéraux semblent participer par leur phosphore au métabolisme des glucides.

Il était intéressant de rechercher si le facteur sérique est thermolabile. Nous avons donc réalisé l'expérience suivante, résumée dans le tableau n° 3 : 3 séries de 3 tubes ont été utilisées et comme précédemment, le milieu a été ensemencé en bloc puis réparti dans les 3 séries. Pour plus de précision la numération des trypanosomes a été faite à l'hématimètre. Au départ de l'expérience nous avions 106.000 flagellés au mm<sup>3</sup>.

Tableau n° 3

Série N°	Phase liquide	Phase solide	Nombre de trypanosomes par m/m <sup>3</sup>	
			Après 24 h	Après 48 h
1	milieu liquide		2.800	350
2	milieu liquide	gélose sérum de cheval	9.700	2.000
3	milieu liquide	gélose sérum de cheval chauffée à 80°	10.400	2.800

Les résultats après 24 et 48 heures font ressortir la supériorité manifeste du milieu diphasique au sérum sur le milieu liquide. De plus, on ne constate pas de grandes différences entre le sérum chauffé et non chauffé. Le facteur sérique est donc thermostable et il semble même que le chauffage à 80° qui coagule les protéines, améliore les résultats.

Le meilleur milieu empirique de survie pourrait donc être constitué comme suit :

— Phase liquide : milieu liquide précédemment décrit.

— Phase solide : gélose sérum de cheval coagulé.

Il est vraisemblable que le sérum d'autres espèces conviendrait et particulièrement le sérum de lapin qui dès 1908 était employé par NICOLLE.

### CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce travail serviront de base à des recherches ultérieures. Nous avons vu qu'il existait au moins un facteur de croissance dans le sérum. Il est thermostable et diffuse assez rapidement dans la gélose.

D'autre part, les milieux diphasiques ont toujours une nette supériorité sur les milieux liquides, parce qu'ils permettent un renouvellement presque continu de ce facteur dans la phase liquide et une dilution des déchets dans la phase solide.

L'hémoglobine et l'azote organique sont nécessaires, mais les survies les plus remarquables sont obtenues quand on ajoute du glucose et des phosphates.

L'étude du métabolisme des hydrates de carbone chez les trypanosomes pathogènes doit logiquement conduire à des résultats très intéressants.

Laboratoire national de recherches  
Vétérinaires de Farcha- (Rép. du Tchad)  
Service d'entomologie

### SUMMARY

#### Research on the factors necessary for the culture « in vitro » of *Trypanosoma evansi*

The study of the survival of *T. evansi* in conjunction with different substrates indicates the necessity for haemoglobin, nitrogen and glucose. An unidentified, thermostable serum factor is thought to play an important part.

### RESUMEN

#### Investigaciones respecto a los factores necesarios para el cultivo « In vitro » de *Trypanosoma evansi*

El estudio de la supervivencia de *T. evansi* en relación con distintos substratos, hace resaltar la necesidad de la hemoglobina, de una aportación nitrogenada y de glucosa. Un factor sérico, no identificado y termoestable, desempeña en este caso un papel de importancia primordial.

### BIBLIOGRAPHIE

- AGOSIN (M.), VON BRAND (T.). — Studies on the carbohydrate metabolism of *Trypanosoma congolense*. *Exper. Parasit.*, 1954, 3 : 517-24.
- BLASS (J.), RICHARD (C.). — Etude du Nuocmam par microchromatographie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83 : 791-99.
- BOWMAN (I. B. R.), VON BRAND (T.) et TOBIE (E. J.). — The cultivation and metabolism of trypanosomes in the presence of trehalose with observations on trehalase in blood serum. *Exper. Parasit.*, 1960, 10 : 274-83.
- BRAND (T. V.), REGENDANZ (P.). — Ueber störungen des Kohlenhydrat, stoffwechsels bei der Trypanosomiasis des Kaninchen. *Biach. Zeitschr.*, 1931, 242 : 451-68.
- BRAND (T. V.). — Studien über den Kohlenhydratstoffwechsel parasitischer Protozoen — II Der Zuckerstoffwechsel der Trypanosomen. *Zeitschr. f. vergleich. Physiologie.*, 1933, 19 : 587-614.
- BRAND (T. V.), TOBIE (E.), MEHLAN (B.). — The influence of some sulphhydryl inhibitors and fluoroacetate on the oxygen consumption

- of some trypanosomes. *J. cell. comp. Physiol.*, 1950, **35** : 273-300.
- BRAND (T. V.), TOBIE (E. J.). — Observation on the metabolism of the culture form of « *Trypanosoma congolense* ». *J. Parasit.*, 1959, **45** : 204-208.
- BRUTSAERT (P.), HENRARD (C.). — La culture des trypanosomes pathogènes. *Ann. Soc. belge. Med. trop.*, 1936, **16** : 479.
- BRUTSAERT (P.), HENRARD (C.). — L'hémoculture comme moyen auxiliaire de diagnostic de la maladie du sommeil. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127** : 1469.
- CANTRELL (W.). — The effect of oxaphenarsine on the phosphate metabolism of « *Trypanosoma equiperdum* » in the rat. *J. infect. Dis.*, 1954, **95** : 92-97.
- CHEN (G.), GEILING (E. M. K.). Glycolysis in « *Trypanosoma equiperdum* ». *Proceed. Soc. exper. Biol. méd.*, 1946., **63** : 486-87.
- FRENCH (M. H.). — Some disturbances of host's carbohydrate metabolism induced by *T. congolense* and *T. brucei*. *J. comp. Path. Therap.*, 1941, **51** (4) : 269.
- FULTON (J. D.). — Experiments on transformation of trypanosomes by desoxyribonucleic acid. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1960, **54** (4) : 296.
- GEIGY (R.), HUBER (M.). — Demonstration of trehalose in the vector of African trypanosomiasis : The Tsé tsé Fly. *Acta. trop.*, 1959, **16** : 255-62.
- HARVEY (S. C.). — Some effects of plasma and its fractions on *Trypanosoma hippicum*. *J. cell. comp. Physiol.*, 1950, **35** : 371-86.
- HENRARD (C.), PEEL (E.). — L'hémoculture moyen diagnostic de la trypanosomiase. *I. S. C. T. R.* (Anvers, 20-23 juin) *B. P. I. T. T.*, 1950, **191** : 254-6.
- HOPPE (J. O.), CHAPMAN (C. W.). — Role of glucose in acute parasitemic death of rat infected with « *Trypanosoma equiperdum* ». *J. Parasit.*, 1947, **33** : 509-16.
- KLIGLER (I. J.), GEIGER (A.), COMAROFF (R.). — Effect of the nature and composition of the substrate on the development and viability of trypanosomes. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1930, **24** : 329.
- KNIGHT (R. H.). — The biochemistry of trypanosomes. *I. S. C. T. R.*, 1960, **62** : 171.
- KRIIGSMAN (B. J.). — Vergleichend physiologische untersuchungen über den stoffwechsel von *Trypanosoma evansi* in Zusammenhang mit der Anpassung an das Wirtstier. *Zeitschr. F. vergleich. Physiol.*, 1936, **23** : 663.
- LAVERAN, MESNIL. — Trypanosomes et trypanosomiases. Masson et Cie, éditeurs 1912.
- LEHMANN (D. L.). — Some culture differences between *Trypanosoma rhodesiense* and *T. brucei* in autoclaved diphasic media. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1960, **54**, (4).
- LEHMANN (D. L.). — Attempts at the selective cultivation of *Trypanosoma rhodesiense* *T. brucei* and *congolense*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1961, **155** (4) : 440.
- LWOFF (M.). — Recherches sur le pouvoir de synthèse des Flagellés trypanosomides. Collection des monographies de l'Institut Pasteur, Paris, Masson et Cie Editeurs 1940.
- MORACZEWSKI, KELSEY (F. E.). — Distribution and rate of metabolism of phosphorus compounds in *Trypanosoma equiperdum*. *J. infect. Dis.*, 1948, **82** : 45-51.
- MULVEY (P. F.). — The uptake and fate of radioactive elements in *Trypanosoma equiperdum*. *J. infect. Dis.*, 1960 : 155-59.
- NGUYEN — THI-LAU, RICHARD (C.). — Le poisson dans l'alimentation du Vietnamiens. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays. trop.*, 1959, **12** : 313-24.
- NOVY (F. G.), MAC NEAL (W. J.). — The cultivation of *T. brucei*. *J. Amer. vet. Med. ass.*, 1903, **45** : 1266.
- NOVY (F. G.), MAC NEAL (W. J.). — On the cultivation of *T. brucei*. *J. infect. Dis.*, 1904, **1** : 1-30.
- NOVY (F. G.), MAC NEAL (W. J.). — La culture de trypanosome du surra des Philippines. *J. Amer. vet. Med. Ass.*, 1904 : 1413.
- PACKCHANIAN (A.). — On the cultivation of *Trypanosoma brucei* « in vitro » *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1959, **8**, 168-74.
- PONSELLE (A.). — Culture des Trypanosomes pathogènes. *C. R. Acad. Sci.*, 1924, 178:1219.
- REGENDANZ (P.). — Der Zuckerverbrauch der Trypanosomen (nach Versucher in « in vitro » bei 37 °) und seine Bedeutung für die pathologie der Trypanosomen infectionen *Zentralbl. f. bact.* 1., 1930, **118** : 175-86.

- REICHENOW (E.). — Die Züchtung der pathogenen trypanosomen. *Arch. Sch. u. trop. Hyg.*, 1914, **38** : 292-302.
- REICHENOW (E.). — Comptes rendus du XXII<sup>e</sup> Congrès International de Zoologie. Lisbonne 1937, sec. X : 1955-68.
- REICHENOW (E.). — Die bisherige erfahrungen mit der Dauerzüchtung africanischer pathogener trypanosomen. *Festschrift Bernhard nocht*, 1937 : 487-96.
- SCHERN (K.) ARTAGAVEYTIA — ALLENDE (R.). — Die glycoprive therapie der experimentellen trypanosomen infection mit anticoman. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1936, **89** : 484.
- TOBIE (E. J.), BRAND (T. Von) et MEHLMAN. — Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense*. *J. Parasit.*, 1950, **36** : 48-54.
- TOUBANGUI (M. A.), LOPE (M.) et YUTRIC. — The resistance and the blood sugar of animals infected with *trypanosoma evansi*. *Philippine. J. Sci.*, 1931, **44** : 93-107.
- WEINMAN (D.). — Cultivation of trypanosomes. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1957, **51** : 560-61.
- WEINMAN (D.). — Cultivation of the african sleeping sickness trypanosomes from the blood and cerebrospinal fluid of patients and suspects. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1960, **54** : 180-90.
- WEINMAN (D.). — Trehalose metabolism of trypanosomes. *Nature*, 1960, **186** : 166.
- ZELEDON (R.). — Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in cultures. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *J. Parasit.*, 1960, **46** (5) : 541-51.