



## Efecto de *Trichinella spiralis* y de *Trichinella patagoniensis* n.sp. sobre la desialización.

**>>>** Hasta hace unos años, *Trichinella spiralis* era el único taxón del género *Trichinella* detectado en animales domésticos y salvajes de América del Sur. Recientemente, se identificó un nuevo genotipo en un puma de montaña, en la provincia de Río Negro, "*Trichinella patagoniensis*", a partir de este hallazgo se comenzó a estudiar más sobre este nuevo genotipo. Su efecto sobre la desialización eritrocitaria en comparación con *Trichinella spiralis*., se aborda en el siguiente trabajo.

### **>>> AUTORES**

Dre Patricia Ponce de León(1<sup>a</sup>)\*, Ernesto Lamagni(2<sup>a</sup>),  
Juan José Ivancovich(3<sup>b</sup>), Hebe Bottai(4<sup>b</sup>)

1 Doctora en Ciencias Biomédicas.

2 Pasante Área Parasitología.

3 Bioquímico.

4 Bioquímica.

a Área Parasitología.

b Área Estadística y Procesamiento de Datos.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Acta Bioquím Clín Latinoam 2019; 53 (1): 37-42

### **>>> CORRESPONDENCIA**

Dra. Patricia Ponce de León  
E-mail: tefu1958@hotmail.com

### **>>> RESUMEN**

El ácido siálico tiene importantes funciones





# LA ELECCIÓN DE HOY QUE LO ACOMPAÑARÁ EN EL FUTURO

*La más amplia gama de Analizadores de Electrolitos*

Nuestros equipos, con diseño y producción en Argentina, son comercializados en todo el mundo.

- Fácil de operar
- Libre de mantenimiento
- Bajo costo por determinación
- Se adapta a las necesidades de su laboratorio

Na+

K+

Cl-

Ca<sup>++</sup>

Li+



Industria Argentina  
[www.diestroweb.com](http://www.diestroweb.com)  
[info@diestroweb.com](mailto:info@diestroweb.com)

Comuníquese  
con nosotros:  
+ 54 11 4709 7707

**Diestro**  
MEDICAL DEVICE TECHNOLOGY

biológicas, muchas de las cuales determinan su participación en la respuesta inmune. El objetivo del trabajo fue comparar el efecto de *Trichinella spiralis* y *Trichinella patagoniensis* n.sp. sobre la desialización eritrocitaria. Se trabajó con 10 concentrados de larvas musculares de *T. spiralis* y 10 de *T. patagoniensis* de la misma concentración larval. Se realizó el tratamiento incubando el sedimento de eritrocitos frescos con igual volumen de concentrado larval (37 °C), tomando muestra a los 30, 60 y 90 minutos. Los controles fueron incubados de la misma forma con solución salina. Se aplicó el método de Titulación de la Agregación por Polibrene y se determinó el CexpST. Los resultados mostraron que el valor medio del CexpST en los eritrocitos tratados con *T. spiralis* fue significativamente menor que en los glóbulos tratados con *T. patagoniensis*, para todos los tiempos estudiados. El aumento del tiempo de tratamiento también disminuyó significativamente el valor medio del CexpST para las dos especies. Éste fue significativamente menor a los 90 minutos de incubación que a los 60 minutos y éstos a su vez menores que a los 30 minutos. Se concluye que *T. spiralis* provocó mayor desialización eritrocitaria que *T. patagoniensis* en las condiciones experimentales estudiadas.

**Palabras clave:** *Trichinella spiralis* \* *Trichinella patagoniensis* n.sp. \* desialización

En la actualidad se reconoce la existencia de más de 50 estructuras de ácidos siálicos y no sólo se están identificando nuevos, sino que, además, se está profundizando en el estudio de sus funciones (1). Los ácidos siálicos se sitúan en el extremo de las moléculas de las que forman parte y fueron hallados en vertebrados, algunos tipos de bacterias, virus e invertebrados, pero no han sido identificados en vegetales (1). Presentan importantes funciones biológicas, por lo que puede deducirse que algunas de ellas en los

glucoconjugados están determinadas, al menos parcialmente, por la participación de los ácidos siálicos en su composición. Los ácidos siálicos presentes en glucoproteínas y glucolípidos están involucrados en funciones biológicas tales como procesos de reconocimiento celular, vida media de células y proteínas plasmáticas, modulación del sistema inmune y apoptosis. También son ligandos de moléculas de adhesión, mediando adhesión celular o transducción de señales (2). Su estudio ha permitido relacionarlos con enfermedades, y ya existen ejemplos concretos en infecciones bacterianas y virales. Lo mismo sucede con enfermedades parasitarias como malaria (3)(4) y tripanosomiasis (5-10). Actualmente se considera que tendrían un papel importante en la interacción parásito-hospedador, pues a pesar de que los mecanismos celulares de muchos procesos infecciosos no se conocen con exactitud, se ha comunicado que involucrarían a los glucoconjugados de superficie del parásito y del hospedador(11).

La trichinellosis es una zoonosis transmitida por consumo de carne que contiene larvas musculares del parásito *Trichinella* spp. En la Argentina la enfermedad es endémica y principalmente transmitida por cerdos. Durante años, la única especie involucrada en brotes humanos y focos porcinos en nuestro país fue *Trichinella spiralis*. Sin embargo, Krivokapich et al. (12) comunicaron la presencia de un nuevo genotipo en un puma de montaña, en la provincia de Río Negro. Este genotipo hoy es una nueva especie encapsulada: *Trichinella patagoniensis* (12). Estudios experimentales con esta nueva especie demostraron que los felinos y los ratones son los animales más susceptibles de adquirir la infección, mientras que los cerdos y las ratas presentan una carga parasitaria muy baja (12)(13) y en las aves domésticas, la infección no se desarrolla más allá del intestino(14).

Debido a su reciente hallazgo, los conocimientos respecto de la biología de esta nueva especie aún son escasos.

En experiencias previas, utilizando eritrocitos para el estudio de la desialización, se ha comunicado que las larvas musculares (LM) de *T. spiralis* alteran la agregación globular (15-19).

El objetivo del trabajo fue comparar el efecto de *T. spiralis* y *T. patagoniensis* n.sp. sobre la desialización eritrocitaria.

### >>> MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras:

Se trabajó con 10 concentrados de larvas musculares de *T. spiralis* y 10 concentrados de

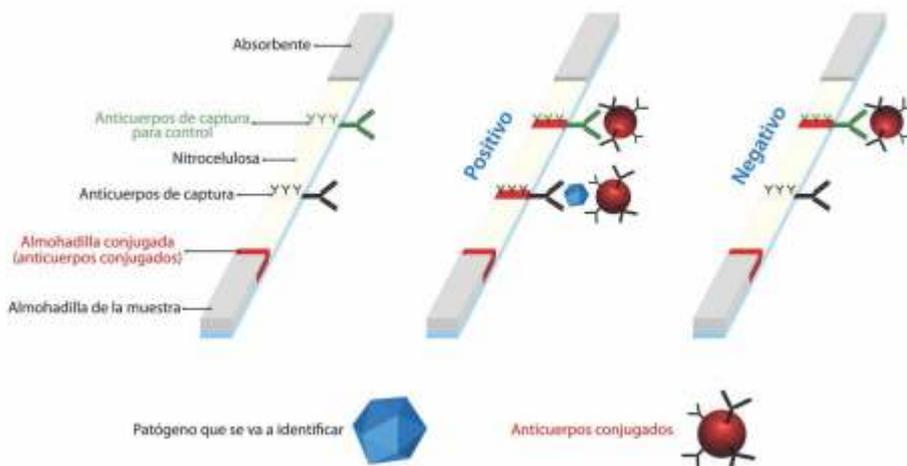
larvas musculares de *T. patagoniensis* de la misma concentración larval ( $1.000 \pm 200$  larvas/mL)

*Larvas musculares (LM) de T. spiralis y de T. patagoniensis*

*T. spiralis* fue donada por el Laboratorio de Zoonosis, Laboratorio Central de la Red Provincial de Laboratorios, Dirección de Bioquímica y Farmacia (Santa Fe, Argentina) y *T. patagoniensis* por el Departamento de Parasitología, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán" (Buenos Aires, Argentina), lugar, este último, donde ambas especies fueron tipificadas por análisis moleculares.

Las larvas infectivas L1 utilizadas se obtuvieron por digestión artificial con pepsina y

## DetECCIÓN DE BACTERIAS, VIRUS Y PARÁSITOS Inmunocromatografía en 10-15 minutos



**Clostridium Difficile**  
**Helicobacter Pylori**  
**Legionella Pneumophila**  
**Streptococcus Grupo A**

**Adenovirus**  
**Adenovirus 40/41**  
**Rotavirus**  
**Syncytial Respiratorio**  
**Influenza A&B**

**Cryptosporidium Parvum**  
**Giardia Lamblia**  
**Crypto/Giardia**  
**Tripanosoma Brucei**

ácido clorhídrico de la masa muscular de ratones infectados de la colonia CBI-IGE del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

Las larvas se recogieron en formol al 10%, se lavaron 3 veces en solución fisiológica y se contaron microscópicamente por duplicado a los fines de preparar concentrados larvales con un volumen de 100 mL y una cantidad aproximada de  $1.000 \pm 200$  larvas/mL (20).

*Glóbulos rojos en medio salino (GR)*. Se trabajó con suspensiones de eritrocitos humanos frescos, provenientes de dadores sanos voluntarios, obtenidos de muestras con anticoagulante y lavados tres veces en solución salina.

## >>> MÉTODOS

### *Tratamiento de los eritrocitos*

Se trabajó con tres tubos incubados a 37 °C en baño termostatizado.

- Tubo 1: 100 µL GR + 100 µL concentrado de LM de *T. spiralis* (GR tratados 1)
- Tubo 2: 100 µL GR + 100 µL concentrado de LM de *T. patagoniensis* (GR tratados 2)
- Tubo 3: 100 µL GR + 100 µL solución fisiológica (GR control)

Volumen final de cada tubo: 200 µL

A los 30, 60 y 90 minutos de incubación se sustrajo de cada uno de los tubos una alícuota de 65 µL, previa homogeneización, que fue recolectada en solución salina.

Se lavó por centrifugación 5 minutos, y se preparó con el sedimento globular una suspensión

eritrocitaria al 20%.

### *Método de titulación de la agregación por Polibrene (21)*

El método se aplicó simultáneamente en los GR control y en los mismos eritrocitos incubados con LM de las dos especies de *Trichinella*. Se hicieron diluciones seriadas progresivas de Polibrene en solución salina (Puro, 1/2; 1/4; 1/8; 1/128) y a continuación se colocaron en una placa de vidrio, una gota de la suspensión eritrocitaria al 20% y una gota de cada una de las diluciones de Polibrene. Se mezcló con varilla de vidrio y se homogeneizó por movimientos circulares de la placa durante 1 minuto, hasta que se produjo la agregación entre los eritrocitos con carga negativa y el polielectrolito Polibrene.

Se evaluó la carga aniónica del control y de los GR incubados con las LM, determinando el título como la última dilución del polielectrolito que presentó agregación. Se consideró significativa una diferencia de título  $\geq 2$  diluciones (22).

A los fines de comparar la agregación de los glóbulos incubados con LM, en relación a la del respectivo control, se la semicuantificó con cruces (4+, 3+, 2+, 1+, +/-; -) y se asignó un score a cada una según Goudemand y Marsalet (23), de acuerdo con la siguiente escala:

- 4+ 10
- 3+ 8
- 2+ 5
- 1+ 2
- +/- 1 (agregación apenas visible)

Se determinó el coeficiente experimental de score total usando el método de Polibrene (**CexpST**) como el cociente entre el score total de la agregación (ST) de los eritrocitos incubados con las LM y el score de la agregación de los eritrocitos

# ELITE InGenius

## PCR Real Time

### Totalmente Automatizado

#### ♥ Patógenos de trasplante

CMV  
EBV  
BKV  
VZV  
HSV1  
HSV2  
Parvovirus B19  
Adenovirus  
Enterovirus  
JCV  
HHV6  
HHV7  
HHV8  
Toxoplasma gondii  
Hepatitis E (RUO)  
WNV  
Aspergillus

#### 💧 Onco-Hematológicas

Coagulation factors panel  
Factor V  
Factor II  
MTHFR

#### 🏠 Infecciones Resistencia a Antibióticos

MRSA/SA  
S. aureus  
mecA/mecC

C. difficile  
Toxin A  
Toxin B

CRE 21  
KPC  
IMP, VIM, NDM  
OXA

ESBL  
CTX-M-1,15  
CTX-M-9,14

Colistin Resistance  
mcr1  
mcr2

#### 🗨 Meningitis

Viral panel 1  
HSV1  
HSV2  
VZV

Viral panel 2  
Enterovirus  
Parechovirus  
Adenovirus

Bacterial panel  
N. meningitidis  
S. pneumoniae  
H. influenzae

#### 👤 Enfermedades de transmisión sexual

MG + Resistance  
M. genitalium  
Macrolide resistance

STI PLUS Panel  
C. trachomatis  
N. gonorrhoeae  
M. genitalium  
T. vaginalis

C. trachomatis

#### 🌬 Infecciones Respiratorias

Viral panel  
Flu A  
Flu B  
RSV

Bacterial panel  
C. pneumoniae  
M. pneumoniae  
Legionella pn.

MTB + Resistance  
MTB complex  
Rifampicin resistance  
Isoniazid resistance

#### 🌀 Gastro-Intestinal Infection

Norovirus  
Genotypes I & II

Viral Panel  
Rotavirus  
Adenovirus  
Astrovirus

Bacterial panel  
Campylobacter spp.  
Salmonella spp.  
Y. enterocolitica

Parasitic panel  
G. lamblia  
C. parvum  
E. histolytica

control(22).

ST de los eritrocitos incubados con LM CexpST =

ST de los eritrocitos control

Donde score total =  $\sum Si$

Si: score individual

Este coeficiente es igual a 1 cuando no hay modificación de ácido siálico por acción del parásito y es igual a 0 cuando el tratamiento ocasiona la pérdida total del ácido siálico del eritrocito, o sea que la captación del mismo es máxima.

### Análisis estadístico

Se compararon los valores del CexpST para las dos especies de *Trichinella* y los diferentes tiempos de incubación, aplicando la técnica de análisis de la variancia y el test de comparaciones múltiples según Tukey, considerando los factores "especie" de *Trichinella* a dos niveles, tiempo de incubación a tres niveles y GR como factor aleatorio(24).

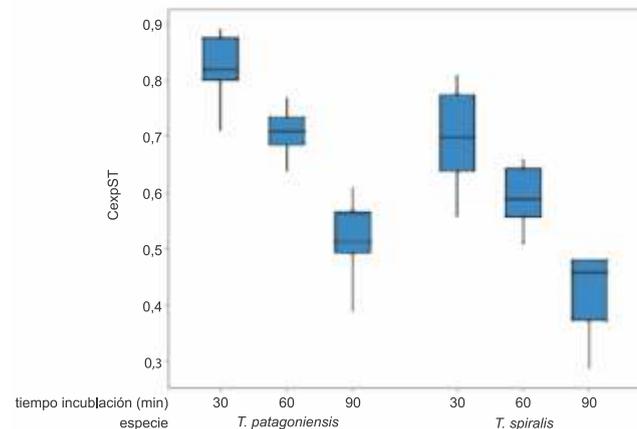
## >>> RESULTADOS

El valor medio del CexpST en los GR tratados 1 fue significativamente menor que en los GR tratados 2 ( $p < 0,001$ ) para todos los tiempos estudiados, indicando que *T. spiralis* provocó una mayor desialización eritrocitaria que *T. patagoniensis*.

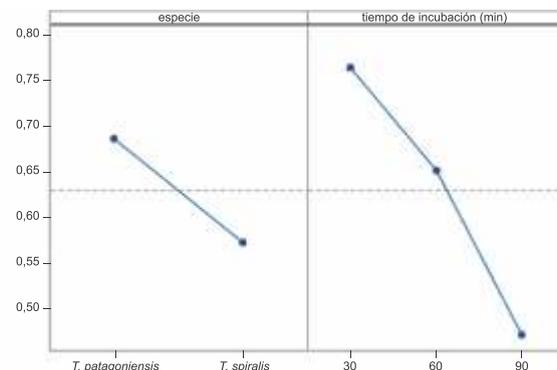
La disminución del título en 2 o más diluciones en relación al control se observó en 9/10 suspensiones de GR tratados con *T. spiralis*, (2 a los 30 minutos, 2 a los 60 y 5 a los 90 minutos), mientras que solamente se visualizó en 2/10 suspensiones de GR Tratados con *T. patagoniensis* (1 a los 30 y 1 a los 90 minutos de incubación).

El aumento del tiempo de tratamiento también disminuyó el valor medio del CexpST ( $p < 0,000$ ), el cual fue significativamente menor a los 90 minutos de incubación que a los 60 minutos y estos a su vez menores que a los 30 minutos, para las dos especies estudiadas.

Los resultados se muestran en la Tabla I y Figuras 1 y 2.



>> Figura 1. Valores del CexpST para las combinaciones especie y tiempo de incubación.



>> Figura 2. Valores de la media de la variable CexpST para cada combinación de niveles de los factores especie y tiempo de incubación.

>> Tabla I. Valores de la media y desviación estándar del CexpST para eritrocitos tratados con *T. spiralis* y *T. patagoniensis* en los diferentes tiempos de incubación

Combinación	n	Media	Desviación estándar
T. spiralis -30 minutos	10	0,697	0,083
T. spiralis -60 minutos	10	0,593	0,052
T. spiralis -90 minutos	10	0,433	0,066
T. patagoniensis -30 minutos	10	0,823	0,054
T. patagoniensis -60 minutos	10	0,710	0,038
T. patagoniensis -90 minutos	10	0,519	0,061

### >>> Discusión y Conclusiones

Los ácidos siálicos participan en la respuesta inmune, ya que inhiben la vía alternativa del complemento y tienen importantes funciones de estabilización de moléculas y membranas, así como también influencia en las interacciones de modulación con el medio ambiente. Muchas de sus funciones provienen de la fuerte carga electro-negativa que poseen, como por ejemplo la unión y

transporte de iones, la estabilización de la conformación de las proteínas, incluso enzimas y el mejoramiento de la viscosidad de las mucinas. Sin embargo, también pueden proteger a células y moléculas del ataque de proteasas o glucosidasas, extendiendo su tiempo de vida y sus funciones. Los ácidos siálicos además pueden regular la afinidad de receptores y modular los procesos involucrados en la señalización transmembrana, fertilización, crecimiento y diferenciación. Se ha comunicado que su efecto antioxidante es eliminador de radicales libres, lo que sería significativo en los endotelios de los vasos sanguíneos. Otro papel prominente que poseen es su dualismo, actuando como enmascaradores o como sitios de reconocimiento (25).

Debido a las variadas funciones del ácido

## DIREX BCC-3600

Contador Hematológico.

- **MÁS PARÁMETROS EN MENOS ESPACIO: 21 PARÁMETROS REPORTABLES.**
- **PANTALLA TÁCTIL COLOR.**
- **POSIBILIDAD DE IMPRESORA EXTERNA.**
- **REACTIVOS CON EL MAYOR RENDIMIENTO DEL MERCADO EN SU SEGMENTO.**
- **CAMBIA MENOS DILUYENTE QUE CUALQUIER OTRO EQUIPO DEL MERCADO.**



## PROMO DIRECTA DE FÁBRICA.

~~USD 9.900 +IVA~~  
**USD 7.240 +IVA**

**AHORRA: USD 2.660 +IVA**

VALOR ORIENTATIVO SUJETO A LA COTIZACIÓN DEL DÓLAR BNA AL DÍA DE REALIZARSE LA OPERACIÓN.

**EL PRECIO MÁS BAJO EN SU SEGMENTO**

PRECIO PROMOCIONAL DE CONTADO STOCK DISPONIBLE PARA ESTA PROMOCIÓN 30 UNIDADES.

**+INFORMACIÓN**



**+54 9 291 575 8350**

**ventas@bernardolew.com.ar**



IMPORTA Y DISTRIBUYE

**Bernardo Lew**  
Importador de Soluciones para Laboratorios



[www.bernardolew.com.ar](http://www.bernardolew.com.ar)



siálico, posiblemente *T. spiralis* lo utilice como una manera de evadir la respuesta inmune, como se ha sido descrito en especies de *Trypanosoma* (5-11) o bien en alguna etapa de su metabolismo, tal como se ha comunicado en *Entamoeba histolytica* (26).

La experiencia realizada mostró que las larvas infectantes de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis* n. sp provocan la desialización eritrocitaria, por lo que se podría especular que lo obtendrían a partir de otros glucoconjugados que posean residuos sializados.

Las dos especies provocaron mayor desialización con el aumento del tiempo de contacto con los glóbulos, tal como indicó el valor medio del **CexpST** de ambas, el cual fue disminuyendo a medida que el tiempo de tratamiento aumentaba.

Para cada uno de los 3 tiempos de incubación estudiados el valor medio del coeficiente fue significativamente menor para *T. spiralis* que para *T. patagoniensis*, lo que demostró que la desialización era mayor en los eritrocitos cuando estuvieron en contacto con *T. spiralis*, en relación a cuando los mismos glóbulos se incubaron con *T. patagoniensis*.

Los resultados mostraron que *T. spiralis* capturó más ácido siálico de los eritrocitos humanos que *T. patagoniensis* en las condiciones experimentales estudiadas, lo que sugeriría que la relación hospedador-parásito que se establece es distinta para ambas especies y posiblemente *T. spiralis* tenga mayor adaptación al hombre que *T. patagoniensis*.

### >>> AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. María Delia Vasconi y a la Bioq. Paula Indelman el suministro de larvas musculares de ambas especies de *Trichinella*. ■

### >>> REFERENCIAS

1. Cabezas JA. Acides sialiques: leur signification bio-chimique. Le Pharm Biol 1961;
2. Morell AG, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. J Biol Chem 1971; 246: 1461-7.
3. Colli W, Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ. Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 1982; 297: 64-6.
4. Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2009; 106: 5348-52.
5. Hemphill A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. Parasitol Res 1995; 81: 412-20.
6. Anosa VO, Kaneko JJ. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. Am J Vet Res 1983; 44: 645-51.
7. Esiebo KAN, Saror DI, Illemobade AA, Hallaway MH. Variation in erythrocyte surface and free serum sialic acid concentrations during infection in Cattle. Res Vet Sci 1982
8. Nok AJ, Humprey C, Zelibe N, Yako SK. Sialidase: surface localization, properties and hydrolysis of ghost red blood cells and brain cells-identification in tripanosomiasis. Zentrabl Natur 2003; 58: 504-601.
9. Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FASEB J 1993; 7: 1257-64.
10. Colli W, Hemphill A, Ross CA. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. Parasitol Res 1995; 81: 412-20.
11. Buscaglia C. Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*: un blanco potencial para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá 2002; 21: 24-7.
12. Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, Gonzalez Prous CL, Ribicich MM, Marucci G et al. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivore mammals in South America. Int J Parasitol 2012; 42: 903-10.
13. Ribicich M, Krivokapich S, Pasqualetti M, Gonzalez Prous CL, Gatti GM, Falzoni E, et al. Experimental infection with *Trichinella T12* in domestic cats. Vet Parasitol 2013
14. Pasqualetti M, Fariña F, Falzoni E, Cardillo N, Arono-wicz T, Krivokapich S, et al. Susceptibility of chickens (*Gallus gallus domesticus*) to *Trichinella patagoniensis*. Vet Parasitol 2014; 205: 397-400.
15. Ponce de León P, López Murúa G, Bertorini G, Vasco-ni MD, Riquelme B. Efecto biorreológico de *Trichinella spiralis* sobre la agregación eritrocitaria mediante el análisis digital de imágenes. Ciencia y Tecnología. Rosario: UNR Editora; 2013. p. 452-4.
16. López Murúa G, Racca L, Ponce de León P. Efecto de *Trichinella spiralis* sobre la cinética de agregación eritrocitaria. Ciencia y Tecnología. Rosario: UNR Editora; 2014.
17. López Murúa G, Racca L, Ponce de León P. Estudio de la cinética de captación de ácido siálico por larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Acta Bioquím Clín Latinoam 2015; 49: 267-72.
18. Ponce de León P, López Murúa G, Racca L. Estudio del efecto de *Trichinella spiralis* sobre la desialización aplicando el Método de Polibrene. Acta Bioquím Clín Latinoam 2015; 49: 347-52.
19. Ponce de León P, López Murúa G. Captación de ácido siálico por larvas musculares de *Trichinella spiralis* durante incubación *in vitro*. Acta Bioquím Clín Latinoam 2016
20. Luebke RW. Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. Methods 2007; 41: 38-47.
21. Lin M. A safe, simple and efficient cross matching using the slide polybrene method. Transfusion Today 2006; 66: 28.
22. Ponce de León P, Racca L, Menendez M, Biondi C, Val-verde J. Acción de *Ascaris lumbricoides* sobre la carga aniónica de eritrocitos y eritrocitos desializados. Acta Bioquím Clín Latinoam 2012; 46: 247-56.
23. Goudemand M, Marsalet ID. Elements d'immuno-hématologie. 3ª ed. Paris: Flammarion; 1974.
24. Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. Estadística matemática con aplicaciones. 7ª ed México: Thomson Learning; 2010.
25. Varki A, Schauer R. Sialic Acids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2ª ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1920/> (Fecha de acceso: 13 de agosto de 2018).
26. Chayen A, Avron B, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Appearance of sialoglycoproteins in encysting cells of *Entamoeba histolytica*. Infect Immunol 1988; 56: 673-81.