

Seroepidemiology of Cytomegalovirus in Pregnant Women in Sari, Iran 2018- 2020

Golnar Rahimzadeh¹,
Leila Shahbaznejad¹,
Alireza Fahimzad²,
Mohammad Jafar Safar³,
Faezeh Sadat Movahedi⁴,
Shaghayegh Rezai⁵,
Mohammad Sadegh Rezai³

¹ Assistant Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Pediatric Infections Research Center, Research Institute for Children's Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ MSc Student in Biostatistics, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ PhD Student in Medical Bacteriology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received July 6, 2021 ; Accepted September 5, 2021)

Abstract

Background and purpose: Cytomegalovirus (CMV) infection is a serious problem during pregnancy as it threatens the mothers' health and also leads to fetal abnormalities and/or deaths. There is paucity of information about the incidence of CMV in pregnant mothers in Sari, Iran. Therefore, this study was carried out to investigate the frequency of CMV during pregnancy and the relationship between that and related epidemic parameters in Sari.

Materials and methods: A descriptive-observational study was conducted in pregnant women participating in Sari Birth Cohort (SBC) Center during 2018-2020. A total of 1092 samples were investigated for serological markers of CMV using ELISA. Data analysis was performed applying Chi-square and logistic regression.

Results: Prevalence of positive CMV-IgG and IgM in samples studied were 91.8% and 0.2%, respectively. Educational level ($P= 0.03$) and pregnancy stage ($P= 0.02$) were found to be significantly different between mothers with positive IgG and negative IgG.

Conclusion: In current study, pregnant women in third trimester whose educational level was bachelor's degree or less had CMV infection. Despite prenatal screening, cytomegalovirus can be reactivated during pregnancy, therefore, follow-up of the fetus for fetopathy is recommended.

Keywords: Cytomegalovirus, pregnant women, ELISA

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (202): 149-154 (Persian).

* **Corresponding Author:** Mohammad Sadegh Rezai - Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: drmsrezai@yahoo.com)

سرواپیدمیولوژی سیتومگالو ویروس در زنان باردار در ساری سال ۱۳۹۷-۱۳۹۹

گلنار رحیم زاده^۱لیلا شهبازنژاد^۱علی رضا فهیم زاد^۲محمدجعفر صفار^۳فائزه سادات موحدی^۴شقایق رضایی^۵محمدصادق رضائی^۳

چکیده

سابقه و هدف: عفونت سیتومگالو ویروس در دوران بارداری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. زیرا نه تنها سلامت مادران باردار را تهدید می‌کند، بلکه موجب ناهنجاری و یا مرگ جنین نیز می‌شود. با توجه به عدم اطلاع از میزان و نوع ابتلای مادران باردار با عفونت سیتومگالو ویروس در شهر ساری، این مطالعه به منظور بررسی فراوانی عفونت سیتومگالو ویروس و نیز ارتباط میزان شیوع این عفونت با پارامترهای اپیدمیولوژیک وابسته در شهر ساری انجام شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه به روش مشاهده‌ای- توصیفی در زنان باردار در مرکز کوهورت تولد ساری انجام شد. ۱۰۹۲ نمونه برای بررسی مارکرهای سرولوژیک سیتومگالو ویروس با استفاده از روش الایزا (ELISA) از سال ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون کای دو و رگرسیون لجستیک استفاده شد.

یافته‌ها: شیوع CMV-IgG و CMV-IgM مثبت در ۱۰۹۲ مادر باردار ساکن ساری، به ترتیب ۹۱/۸ و ۰/۲ درصد بود. فاکتورهای سطح تحصیلات ($P=0/03$) و مرحله بارداری ($P=0/02$) بین افرادی که IgG آن‌ها مثبت و افرادی که IgG آن‌ها منفی بود تفاوت معنی‌داری داشت.

استنتاج: مادران باردار ساکن شهر ساری در سه ماه سوم بارداری با سطح تحصیلات کارشناسی و پایین‌تر عفونت سیتومگالو ویروس را داشتند. علی‌رغم غربالگری قبل از تولد سیتومگالو ویروس می‌تواند در دوران بارداری مجدداً فعال شود. لذا پیگیری جنین از لحاظ فتوپاتی در دوران بارداری توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سیتومگالو ویروس، زنان باردار، الایزا

مقدمه

سیتومگالو ویروس عضو خانواده هرپس ویریده است که مانند اعضای دیگر این خانواده سبب ایجاد عفونت برای تمام طول عمر می‌شود (۱). عفونت سیتومگالو ویروس به صورت اندمیک با شیوع ۶۰-۳۰ درصد در

مؤلف مسئول: محمدصادق رضایی مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران E-mail: dmsrezaii@yahoo.com

۱. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشجوی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۴/۲۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۶/۱۴

کشورهای توسعه یافته و ۱۰۰-۶۰ درصد در کشورهای در حال توسعه گزارش شده است (۲-۴). سالانه حدود ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ نوزاد مبتلا به سیتومگالو ویروس مادرزادی به دنیا می‌آیند، که ۹۰ درصد در لحظه تولد فاقد علامت هستند اما ۵ درصد تا ۱۷ درصد علائم را بروز می‌دهند. امکان ابتلا به این عفونت قبل و بعد از زایمان و به شکل قطعی بعد از تولد با تماس ترشحات عفونی رحم، شیر مادر و ترشحات خونی وجود دارد (۳،۲). در صورت بروز فتوپاتی در نوزاد ۸۰ درصد موارد ممکن است پیامدهای وخیمی داشته باشند که شامل هپاتواسپلنومگالی (۱۰۰ درصد)، زردی (۶۵ درصد)، پتشی و پورپورا (۵۰ درصد)، میکروسفالی (۸۲ درصد)، تاخیر تکاملی (۸۰ درصد)، کوریورینیت (۳۰ درصد)، کلسیفیکاسیون مغز (۲۲ درصد) می‌باشد (۳،۲). با توجه به عواقب وخیم عفونت سیتومگالو ویروس در دوران بارداری برای جنین، غربالگری آن در این دوران می‌تواند مفید باشد، زیرا با استفاده از آن می‌توان عفونت جنین را احتمال داد و با بررسی مایع آمنیوتیک و سونوگرافی جنین میزان و شدت فتوپاتی را سنجید و بر اساس آن اقدامات لازم را برای جنین انجام داد (۳،۲). این مطالعه به منظور تعیین میزان شیوع آنتی‌بادی‌های IgM، IgG علیه سیتومگالو ویروس در جمعیت زنان باردار و بررسی ارتباط میزان شیوع این آنتی‌بادی‌ها با پارامترهای اپیدمیولوژیک وابسته در شهر ساری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش مشاهده‌ای- توصیفی در زنان باردار شهر ساری از سال ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ انجام شد. ۳۰۰۰ مادر در سه ماهه سوم بارداری به مرکز کوهورت تولد ساری مراجعه کردند. معیار ورود شامل زنان باردار ساکن شهر ساری بود که با رضایت آگاهانه در مطالعه شرکت نمودند. این افراد از ابتلا به عفونت سیتومگالو ویروس اطلاعی نداشتند.

نمونه‌های سرم تهیه شدند. تیتراژ آنتی‌بادی‌های CMV-IgG، CMV-IgM توسط کیت تجاری الایزا (Uniprot, USA) با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد با استفاده از دستگاه الایزا (Sunrise TECAN, Switzerland) بررسی شدند. جهت تایید عفونت حاد و اولیه با سیتومگالو ویروس در مادران بارداری که تیتراژ CMV-IgG و CMV-IgM بالاتر از حد نرمال بود از لحاظ تیتراژ CMV-IgG avidity نیز بررسی شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون کای دو و رگرسیون لجستیک استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

این مطالعه بر روی ۱۰۹۲ نفر از میان ۳۰۰۰ مادر باردار مراجعه کننده به مرکز کوهورت تولد ساری انجام شد (جدول شماره ۱).

در مطالعه حاضر در ۱۰۹۲ مادر باردار فراوانی افراد با تیتراژ آنتی‌بادی CMV-IgG، CMV-IgM بالاتر از حد نرمال به ترتیب ۹۱/۸ و ۰/۲ درصد بود (جدول شماره ۲).

نتایج مشابهی از شیوع CMV-IgG مثبت در زنان باردار در آمریکا (۵۷/۹ درصد)، برزیل (۸۵ درصد)، مصر (۹۶ درصد)، ترکیه (۹۴/۹ درصد) و ایران (۹۸ درصد) به دست آمد (۶،۵). شیوع عفونت سیتومگالو ویروس در کشورهای توسعه یافته نسبت به کشورهای در حال توسعه کم‌تر می‌باشد و این اختلاف به دلیل طبقه پایین اقتصادی، شرایط شلوغ زندگی، عدم آگاهی افراد از اقدامات بهداشتی لازم می‌باشد (۷).

در مطالعه حاضر سطح تحصیلات ($P=0/002$) و مرحله بارداری ($P=0/012$) بین افرادی که IgG آن‌ها مثبت و افرادی که IgG آن‌ها منفی بود تفاوت معنی‌داری داشت (جدول شماره ۱).

در مطالعه ما تفاوت معنی‌داری بین سقط جنین با عفونت سیتومگالو ویروس مشاهده نشد، به دلیل این که

جدول شماره ۱: مشخصات دموگرافیک مادران باردار ساکن در

شهر ساری	دموگرافیک	CMV IgG		کل تعداد (درصد)	سن (سال)
		مثبت تعداد (درصد)	منفی تعداد (درصد)		
					سطح معنی داری
	۱۷-۲۴	۱۵۱ (۱۵/۱)	۱۳ (۱۴/۹)	۱۶۴ (۱۵/۱)	۰/۳۶۰
	۲۵-۳۱	۴۷۱ (۴۳/۵)	۳۲ (۳۶/۸)	۵۰۳ (۴۳/۵)	۰/۴۵۰
	≥ ۳۱	۴۰۷ (۴۰/۸)	۴۲ (۴۸/۳)	۴۴۹ (۴۱/۴)	
	محل سکونت				
	شهری	۹۸۶ (۹۰/۳)	۹۰۴ (۹۰/۱)	۱۸۹۰ (۹۰/۲)	۰/۴۵۰
	روستایی	۱۰۶ (۹/۷)	۹۹ (۹/۹)	۲۰۵ (۹/۸)	
	تحصیلات				
	کارشناسی و پایین تر	۹۳۴ (۸۶/۸)	۸۶۸ (۸۷/۸)	۱۸۰۲ (۸۶/۸)	۰/۰۰۲
	بالتر از کارشناسی	۱۴۲ (۱۳/۲)	۱۲۱ (۱۲/۲)	۲۶۳ (۱۲/۲)	
	شغل				
	خانه دار	۷۹۲ (۷۳/۹)	۷۳۳ (۷۵/۲)	۱۵۲۵ (۷۴/۵)	۰/۰۰۱
	شاغل	۲۸۰ (۲۶/۱)	۲۴۵ (۲۴/۸)	۵۲۵ (۲۵/۵)	
	تعداد ازدواج				
	۱	۱۰۲۲ (۹۳/۶)	۹۴۳ (۹۴/۰)	۱۹۶۵ (۹۳/۸)	۰/۰۵۲
	۲	۷۰ (۶/۴)	۶۰ (۶/۰)	۱۳۰ (۱۱/۲)	
	تعداد حاملگی				
	۱	۴۵۹ (۴۲/۰)	۴۱۹ (۴۱/۸)	۸۷۸ (۴۱/۹)	۰/۵۶۲
	≥ ۲	۶۳۳ (۵۸/۰)	۵۸۴ (۵۸/۲)	۱۲۱۷ (۵۸/۱)	
	تعداد تولد زنده				
	≤ ۲	۱۰۸۱ (۹۹/۰)	۹۹۳ (۹۹/۰)	۲۰۷۴ (۹۹/۰)	۰/۹۰۹
	≥ ۳	۱۱ (۱/۰)	۱۰ (۱/۰)	۲۱ (۱/۱)	
	تعداد سقط های قبلی				
	۰	۸۵۲ (۷۸/۰)	۷۸۴ (۷۸/۲)	۱۶۳۶ (۷۸/۴)	۰/۹۹۲
	۱	۱۹۲ (۱۷/۶)	۱۷۵ (۱۷/۴)	۳۶۷ (۱۷/۱)	
	≥ ۲	۴۸ (۴/۴)	۴۴ (۴/۵)	۹۲ (۴/۴)	
	مرد زایی				
	۰	۱۰۴۸ (۹۶/۰)	۹۶۷ (۹۶/۴)	۲۰۱۵ (۹۶/۲)	۰/۰۱۳
	≥ ۱	۴۴ (۱/۰)	۳۶ (۳/۶)	۸۰ (۹/۰)	
	تنو				
	خیر	۸۲۰ (۷۵/۴)	۷۵۴ (۷۵/۵)	۱۵۷۴ (۷۵/۴)	۰/۷۸۲
	بلی	۲۶۸ (۲۴/۶)	۲۴۵ (۲۴/۵)	۵۱۳ (۲۴/۵)	
	پیرسینگ				
	خیر	۹۵۰ (۸۷/۳)	۸۷۸ (۸۷/۹)	۱۸۲۸ (۸۷/۶)	۰/۰۵۸
	بلی	۱۳۸ (۱۲/۸)	۱۲۱ (۱۲/۱)	۲۵۹ (۱۲/۹)	
	کلندوم				
	خیر	۸۰۶ (۷۳/۹)	۷۴۱ (۷۳/۹)	۱۵۴۷ (۷۳/۹)	۰/۹۹۸
	بلی	۲۸۵ (۲۶/۱)	۲۶۲ (۲۶/۱)	۵۴۷ (۲۶/۱)	
	انتقال خون				
	خیر	۱۰۶۳ (۹۷/۴)	۹۸۰ (۹۷/۷)	۲۰۴۳ (۹۷/۵)	۰/۰۵۴
	بلی	۲۸ (۲/۶)	۲۳ (۲/۳)	۵۱ (۲/۷)	
	سابقه عمل جراحی				
	خیر	۴۶۱ (۴۲/۵)	۴۲۱ (۴۲/۳)	۸۸۲ (۴۲/۴)	۰/۵۶۲
	بلی	۶۳۳ (۵۷/۵)	۵۷۵ (۵۷/۷)	۱۲۰۸ (۵۷/۴)	
	سابقه مراجعه به دندان پزشکی				
	خیر	۳۲ (۲/۹)	۲۸ (۲/۸)	۶۰ (۲/۸)	۰/۳۶۱
	بلی	۱۰۶۰ (۹۷/۱)	۹۷۵ (۹۷/۲)	۲۰۳۵ (۹۷/۵)	
	مصرف مشروبات الکلی				
	خیر	۱۰۵۵ (۹۶/۷)	۹۷۱ (۹۶/۸)	۲۰۲۶ (۹۶/۷)	۰/۴۵۵
	بلی	۳۶ (۳/۳)	۳۲ (۳/۲)	۶۸ (۳/۲)	
	مصرف سیگار				
	خیر	۹۸۹ (۹۰/۷)	۹۰۸ (۹۰/۵)	۱۸۹۷ (۹۰/۶)	۰/۶۳۹
	بلی	۱۰۲ (۹/۳)	۹۵ (۹/۵)	۱۹۷ (۹/۴)	
	مرحله بارداری				
	سه ماهه اول	۲۲۴ (۲۰/۷)	۲۰۹ (۲۱/۰)	۴۳۳ (۲۰/۸)	۰/۰۱۲
	سه ماهه دوم	۴۱۰ (۳۷/۹)	۳۸۷ (۳۸/۹)	۷۹۷ (۳۸/۴)	
	سه ماهه سوم	۴۴۸ (۴۱/۴)	۳۹۹ (۴۰/۱)	۸۴۷ (۴۰/۷)	

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی شیوع سرمی مثبت CMV-IgG و

CMV-IgM در مادران باردار ساکن در شهر ساری			
تعداد (درصد)			
وضعیت IgG	مثبت	۱۰۰۳ (۹۱/۸)	وضعیت IgM
	منفی	۸۹ (۸/۲)	
وضعیت IgM	مثبت	۲ (۰/۲)	وضعیت IgG
	منفی	۱۰۹۰ (۹۹/۸)	

۲/۰ درصد از مادران باردار تیترا CMV-IgM بالاتر از حد نرمال را داشتند و جمعیت این افراد به اندازه ای نبوده است که بتوان راجع به سقط جنین قضاوت کرد. همچنین در این مطالعه مادران باردار در سه ماهه سوم بارداری ارزیابی شدند و از آنجایی که سقط جنین در سه ماهه اول و نیمه اول سه ماهه دوم بیش تر اتفاق می افتد (۸)، بنابراین این مورد نیز موثر بوده است. در مطالعه Sifakis در سال ۱۹۹۸ (۹) مشابه مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین عفونت سیتومگالو ویروس در مادران باردار و سقط جنین گزارش نشد.

در مطالعه حاضر افراد با مدرک کارشناسی و پایین تر نسبت به افراد با مدرک بالاتر از کارشناسی و مرحله بارداری سه ماهه سوم شانس بیش تری برای مثبت بودن CMV-IgG را داشته اند (جدول شماره ۳). افزایش میزان آلودگی با عفونت سیتومگالو ویروس در مادران باردار با مدرک کارشناسی و پایین تر به دلیل عدم آگاهی و پیگیری کم تر در این افراد می باشد (۷). همچنین Hamdan در سال ۲۰۱۱ گزارش کرد سطح تحصیلات پایین درصد ابتلا به عفونت سیتومگالو ویروس را افزایش می دهد (۱۰).

جدول شماره ۳: مدل رگرسیون لجستیک عوامل خطر با

CMV-IgG مثبت در مادران باردار ساکن در شهر ساری				
رگرسیون لجستیک چند متغیره				
متغیر	OR	CI ۹۵ %	سطح معنی داری	
سطح تحصیلات	۱/۸۸	۱/۰۴ – ۳/۳۸	۰/۰۳۵	
مرحله بارداری	۱/۸۲	۱/۰۶ – ۳/۱۰	۰/۰۲۹	

OR = odds ratio, CI = confidence interval.

در این مطالعه ارتباط معناداری بین سروتیترویتی عفونت سیتومگالو ویروس و سطح درآمد و سن مادر مشاهده نشد که با مطالعه عرب زاده و

با غربالگری عفونت سیتومگالو ویروس در مادران باردار می‌توان عفونت جنین را احتمال داد، لذا با بررسی‌های جامع‌تر در دوران بارداری میزان و شدت فتوپاتی سنجیده شود و بر اساس آن اقدامات لازم برای جنین انجام شود.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز عفونی اطفال بیمارستان بوعلی سینا ساری که این امکان را فراهم کردند تا از تجهیزات و امکانات مورد نیاز جهت انجام این طرح بهره‌مند شویم، قدردانی می‌شود. این مطالعه با کد اخلاقی IR.MAZUMS.REC.1397.2705 انجام شد.

همکاران ۱۳۸۶ در این زمینه همخوانی دارد (۱۱). اما در مطالعات قبلی گزارش شده است که شرایط اقتصادی-اجتماعی پایین، سن بالای مادر، تعداد فرزند و رفتار جنسی بر میزان عفونت سیتومگالو ویروس تاثیر مستقیم دارد (۱۲).

در مطالعه حاضر با سنجش همزمان تیترا CMV-IgG و CMV-IgM و CMV-IgG avidity مشخص شد مادران باردار با سطح تحصیلات کارشناسی و پایین‌تر و در سه ماهه سوم بارداری در شهر ساری بیش‌تر به عفونت سیتومگالو ویروس مبتلا می‌باشند. همچنین مشخص شد کدام نوزادان در معرض خطر ابتلا به عفونت سیتومگالو ویروس می‌باشند.

References

1. Sever JL. Pediatric Cytomegalovirus infections. Clin Applied Immunol Rev 2002; 3(1-2): 47-49.
2. Stagno S. Cytomegalovirus. In: Behrman RE, kliegman R, Jenson HB. Nelson textbook of pediatrics. 16th ed. New york: W.B Saunders; 2000. p. 1981-1983.
3. Demmler G. Cytomegalovirus infection. In: Feigin RD, Cherry J, Demmler G, Kaplan S. Feigin and Cherry's Textbook of pediatric infectious disease. 4th ed. Newyork: WB Saunders; 1998: p. 1732-1751.
4. Yamamoto AY, Castellucci AC, Aragon DC, Mussi-Pinhata MM. Early high CMV seroprevalence in pregnant women from a population with a high rate of congenital infection. Epidemiol Infect 2013; 141(10): 2187-2191.
5. Dollard SC, Staras SA, Amin MM, Schmid DS, Cannon MJ. National prevalence estimates for cytomegalovirus IgM and IgG avidity and association between high IgM antibody titer and low IgG avidity. Clin Vaccine Immunol 2011; 18(11): 1895-1899.
6. Michael J. Cannon, D. Scott Schmid, Terri B. Hyde. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol 2010; 20(4): 202-213.
7. Vochem M. CMV infections of the neonate: Prevalence, diagnosis, therapy. Z Geburtshilfe Neonatol 2003; 207(3): 114-118.
8. Asadi M H, Esmailzadeh A. Frequency of Cytomegalovirus Antibodies (IgG and IgM) in Blood Donors in Zanjan Province during 2004. J Adv Med Biomed Res 2005; 13(52): 43-48.
9. Sifakis S, Ergazaki M, Sourvinos G, Koffa M, Koumantakis E, Spandidos DA. Evaluation of Parvo B19, CMV and HPV viruses in human aborted material using the polymerase chain reaction technique. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1998; 76(2): 169-173.
10. Hamdan ZH, Abdelbagi IE, Adam NE. Seroprevalence of cytomegalovirus and rubella among pregnant women in western Sudan. Virol J 2011; 217(8): 1-4.

11. Arabzadeh A.M, Mosavat SA, Eftekhari N. Seroepidemiology of Human Cytomegalovirus in Pregnant Women and their Neonates in Kerman City during 2005. KUMS Journal 2007; 14(4): 279-288.
12. Fowler KB, Stango S, Pass RF. Maternal age and congenital cytomegalovirus infection: screening of two diverse newborn populations 1980-1990. J Infec Dis 1993; 168(3): 552-556.