



# CASO CLÍNICO

## FIEBRE PROLONGADA



Ana Espeleta Fox  
Residente de Pediatría  
Hospital Infantil Universitario Niño Jesús  
Tutora: Yolanda Martín Peinador

# MOTIVO DE CONSULTA

Lactante de **5 meses y 22 días** de edad que consulta por **fiebre** de **12 horas** de evolución (T° máxima de **38.8°C**) sin otra sintomatología acompañante. No ambiente epidémico (no contactos con casos de infección SARS-CoV-2)



# ANTECEDENTES

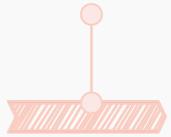
- **EMBARAZO:** gemelar, FIV con ovodonación (sano). Normal y controlado. Ecografías y serologías sin alteraciones. No HTA/DM/alteraciones tiroideas. SGB negativo.
- **PARTO:** 38+2 SEG, vaginal con fórceps (1º gemela).
- **NEONATAL:** PRN 2800g, LRN 49 cm. No REA. Periodo neonatal inmediato sin alteraciones. Cribado metabólico y auditivo sin alteraciones.
- **ALIMENTACIÓN:** lactancia materna exclusiva a demanda + 1 biberón fórmula noche. No alergias ni intolerancias.
- **VACUNAS:** según calendario + Rotavirus + Bexsero.
- **ALERGIAS:** no refiere.
- **DSM:** normal.
  
- **ANTECEDENTES FAMILIARES:** sin interés.

20/05/20

C. Telefónica  
(Urg COVID19)

Fiebre 38.8°C

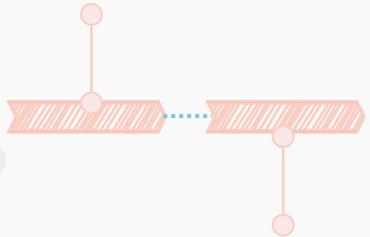
No otros  
síntomas



20/05/20

**C. Telefónica**  
(Urg COVID19)

Fiebre 38.8°C  
No otros  
síntomas



21/05/20

**C. Telefónica**

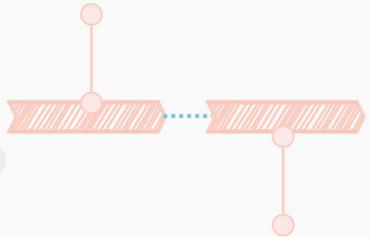
Fiebre 40.2°C  
(36 h de evolución)  
Irritabilidad  
Rechazo parcial  
ingesta



20/05/20

**C. Telefónica**  
(Urg COVID19)

Fiebre 38.8°C  
No otros  
síntomas



21/05/20

**C. Telefónica**

Fiebre 40.2°C  
(36 h de evolución)  
Irritabilidad  
Rechazo parcial  
ingesta

**Urg HNJS**

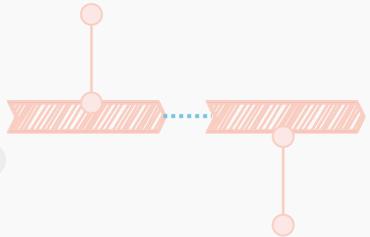
Fiebre + exantema micropapular  
BEG y ctes normales

- Orina: leucos ++
- Sedimento: 5-10 L/campo
- Urocultivo: pendiente
- PCR SARS-CoV-2 (-)
- Test streptococo (-)
- PCR 10.44 mg/dl

20/05/20

**C. Telefónica**  
(Urg COVID19)

Fiebre 38.8°C  
No otros  
síntomas



21/05/20

**C. Telefónica**

Fiebre 40.2°C  
(36 h de evolución)  
Irritabilidad  
Rechazo parcial  
ingesta

**Urg HNJS**

Fiebre + exantema micropapular  
BEG y ctes normales

- Orina: leucos ++
- Sedimento: 5-10 L/campo
- Urocultivo: pendiente
- PCR SARS-CoV-2 (-)
- Test streptococo (-)
- PCR 10.44 mg/dl

Ceftriaxona 50mg/kg IV (1 dosis)  
Cefixima 8mg/kg vo 10 días

24/05/20  
Urg HNJS

Fiebre + tos y rinorrea +  
deposiciones blandas

Faringe hiperémica  
Exantema micropapular

- Urocultivo (21/5) (-)
- PCR SARS-CoV-2 (-)
- PCR 8 mg/dl ↓
- IgM VEB (-)
- Rx tórax: normal

20/05/20

C. Telefónica  
(Urg COVID19)



21/05/20

C. Telefónica Urg HNJS

Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

24/05/20  
Urg HNJS

Fiebre + tos y rinorrea +  
deposiciones blandas

Faringe hiperémica  
Exantema micropapular

- Urocultivo (21/5) (-)
- PCR SARS-CoV-2 (-)
- PCR 8 mg/dl ↓
- IgM VEB (-)
- Rx tórax: normal

Observación 6 horas, BEG  
Impresiona de cuadro vírico  
Continuar tto ATB

20/05/20

C. Telefónica  
(Urg COVID19)



21/05/20

C. Telefónica Urg HNJS

Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

20/05/20  
C. Telefónica  
(Urg COVID19)

24/05/20  
Urg HNJS

Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales

PCR ↓

21/05/20

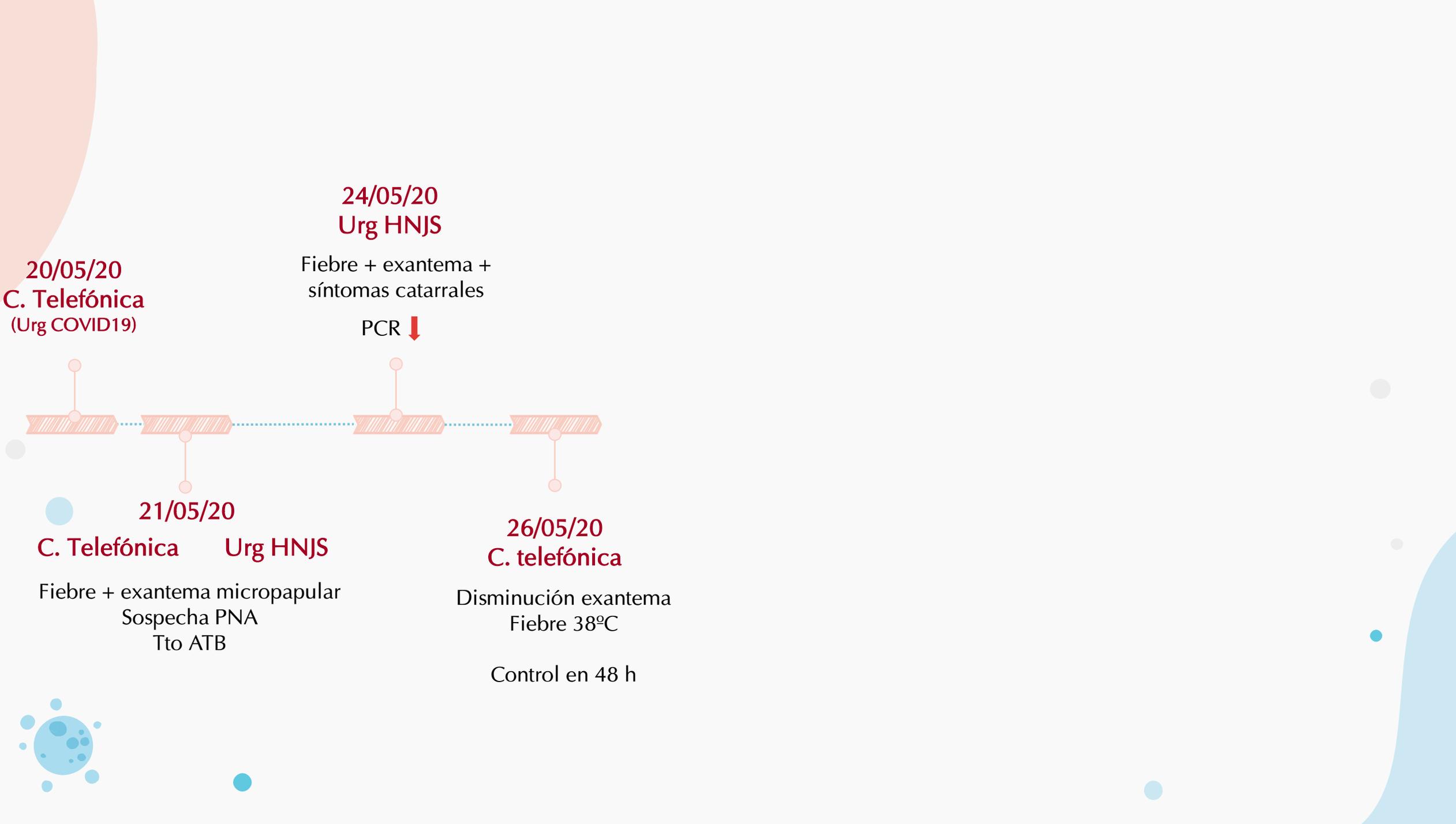
C. Telefónica Urg HNJS

Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

26/05/20  
C. telefónica

Disminución exantema  
Fiebre 38°C

Control en 48 h



20/05/20  
C. Telefónica  
(Urg COVID19)

24/05/20  
Urg HNJS

28/05/20  
Urg HNJS

Fiebre 38.5°C (más espaciados)  
+ síntomas catarrales

BEG, EF sin cambios salvo  
exantema tenue.

PCR 4.64 mg/dl ↓

Alta  
Continuar ATB

Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales

PCR ↓

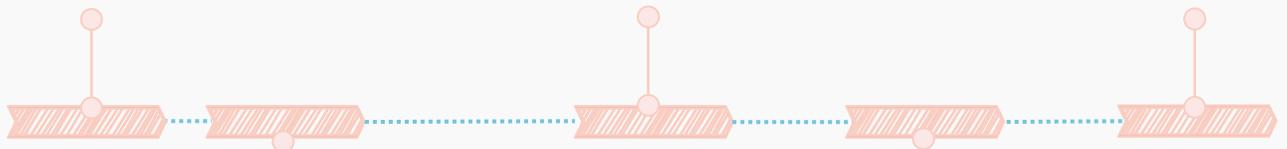
21/05/20  
C. Telefónica Urg HNJS

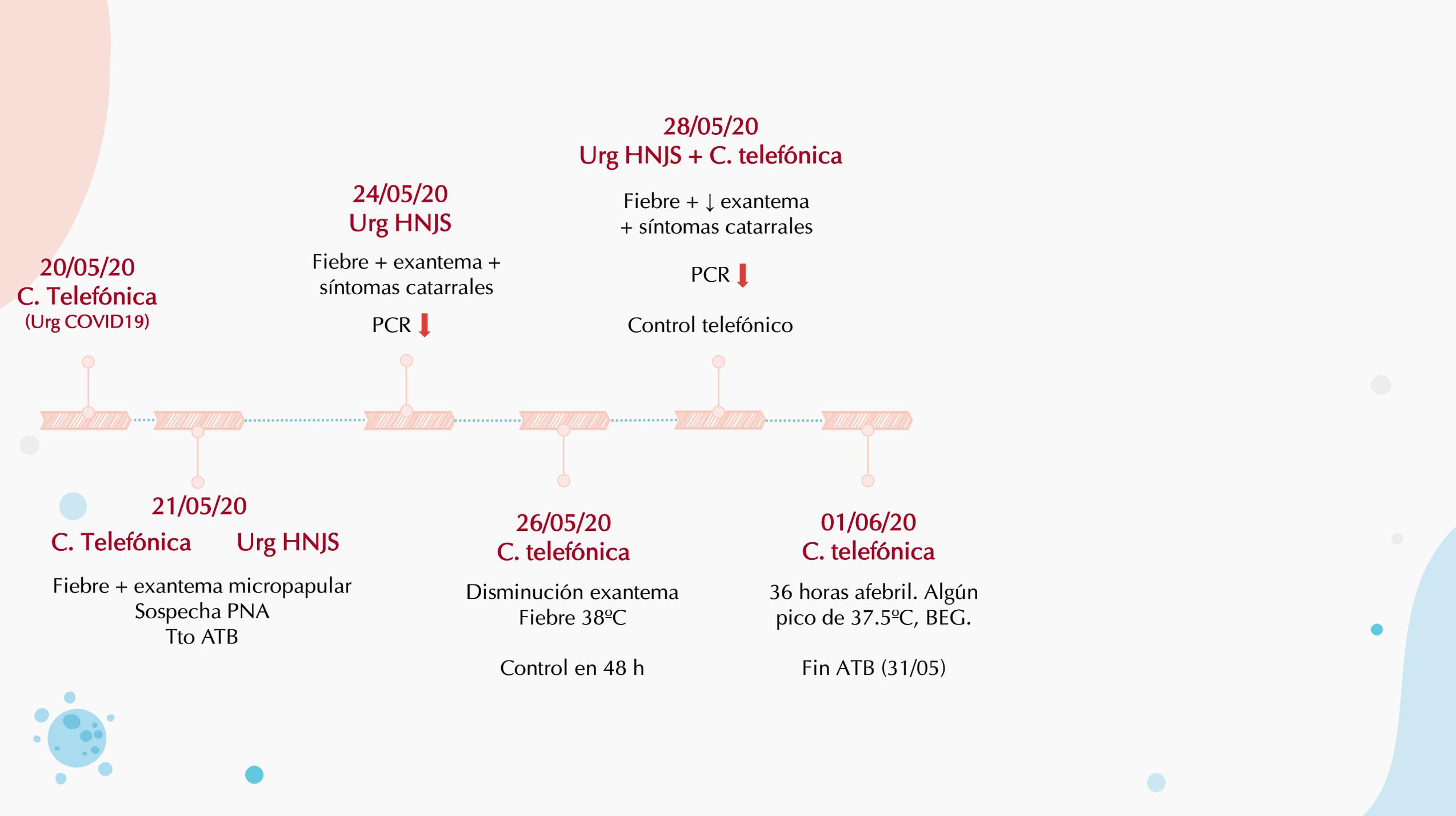
Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

26/05/20  
C. telefónica

Disminución exantema  
Fiebre 38°C

Control en 48 h





20/05/20  
C. Telefónica  
(Urg COVID19)

24/05/20  
Urg HNJS

28/05/20  
Urg HNJS + C. telefónica

Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales

Fiebre + ↓ exantema  
+ síntomas catarrales

PCR ↓

PCR ↓

Control telefónico

21/05/20

C. Telefónica Urg HNJS

Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

26/05/20  
C. telefónica

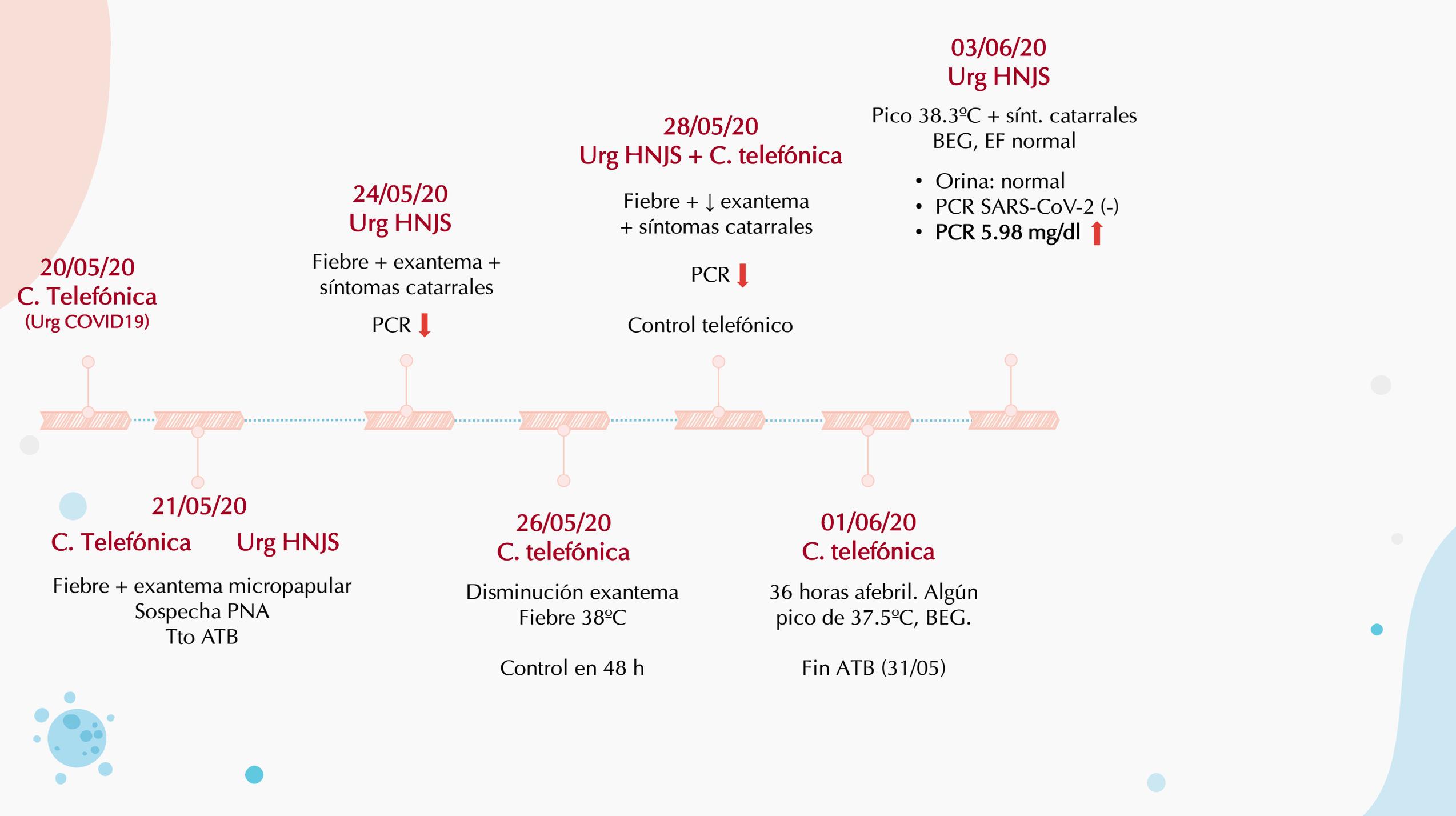
Disminución exantema  
Fiebre 38°C

Control en 48 h

01/06/20  
C. telefónica

36 horas afebril. Algún  
pico de 37.5°C, BEG.

Fin ATB (31/05)



20/05/20  
C. Telefónica  
(Urg COVID19)

21/05/20  
C. Telefónica    Urg HNJS  
Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

24/05/20  
Urg HNJS  
Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales  
PCR ↓

26/05/20  
C. telefónica  
Disminución exantema  
Fiebre 38°C  
Control en 48 h

28/05/20  
Urg HNJS + C. telefónica  
Fiebre + ↓ exantema  
+ síntomas catarrales  
PCR ↓  
Control telefónico

01/06/20  
C. telefónica  
36 horas afebril. Algún  
pico de 37.5°C, BEG.  
Fin ATB (31/05)

03/06/20  
Urg HNJS  
Pico 38.3°C + sínt. catarrales  
BEG, EF normal  
• Orina: normal  
• PCR SARS-CoV-2 (-)  
• PCR 5.98 mg/dl ↑

20/05/20  
C. Telefónica  
(Urg COVID19)

24/05/20  
Urg HNJS

28/05/20  
Urg HNJS + C. telefónica

03/06/20  
Urg HNJS

Pico 38.3°C + sínt. catarrales  
BEG, EF normal

- Orina: normal
- PCR SARS-CoV-2 (-)
- PCR 5.98 mg/dl ↑

Ingreso sin ATB

Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales

Fiebre + ↓ exantema  
+ síntomas catarrales

PCR ↓

Control telefónico

PCR ↓

21/05/20

C. Telefónica Urg HNJS

Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

26/05/20  
C. telefónica

Disminución exantema  
Fiebre 38°C

Control en 48 h

01/06/20  
C. telefónica

36 horas afebril. Algún  
pico de 37.5°C, BEG.

Fin ATB (31/05)



20/05/20  
C. Telefónica  
(Urg COVID19)

24/05/20  
Urg HNJS

28/05/20  
Urg HNJS + C. telefónica

3 al 5/06/20  
Ingreso Pediatría HNJS

- Panel virus respiratorios (-)
- VSG 55 mm ↑
- PCR 6.9 mg/dl
- GGT 215 U/L
- IgG CMV + débil / IgM CMV +
- IgG toxoplasma (-)
- Ecografía abdominal: **esplenomegalia**

Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales

Fiebre + ↓ exantema  
+ síntomas catarrales

PCR ↓

PCR ↓

Control telefónico

21/05/20

C. Telefónica Urg HNJS

Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

26/05/20  
C. telefónica

Disminución exantema  
Fiebre 38°C

Control en 48 h

01/06/20  
C. telefónica

36 horas afebril. Algún  
pico de 37.5°C, BEG.

Fin ATB (31/05)



**20/05/20**  
**C. Telefónica**  
(Urg COVID19)

**24/05/20**  
**Urg HNJS**

**28/05/20**  
**Urg HNJS + C. telefónica**

**3 al 5/06/20**  
**Ingreso Pediatría HNJS**

Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales

Fiebre + ↓ exantema  
+ síntomas catarrales

Afebril (37.4°C aislado) y BEG  
Control en consultas de pediatría con  
AS + ecografía abdominal

PCR ↓

PCR ↓

Control telefónico

**21/05/20**

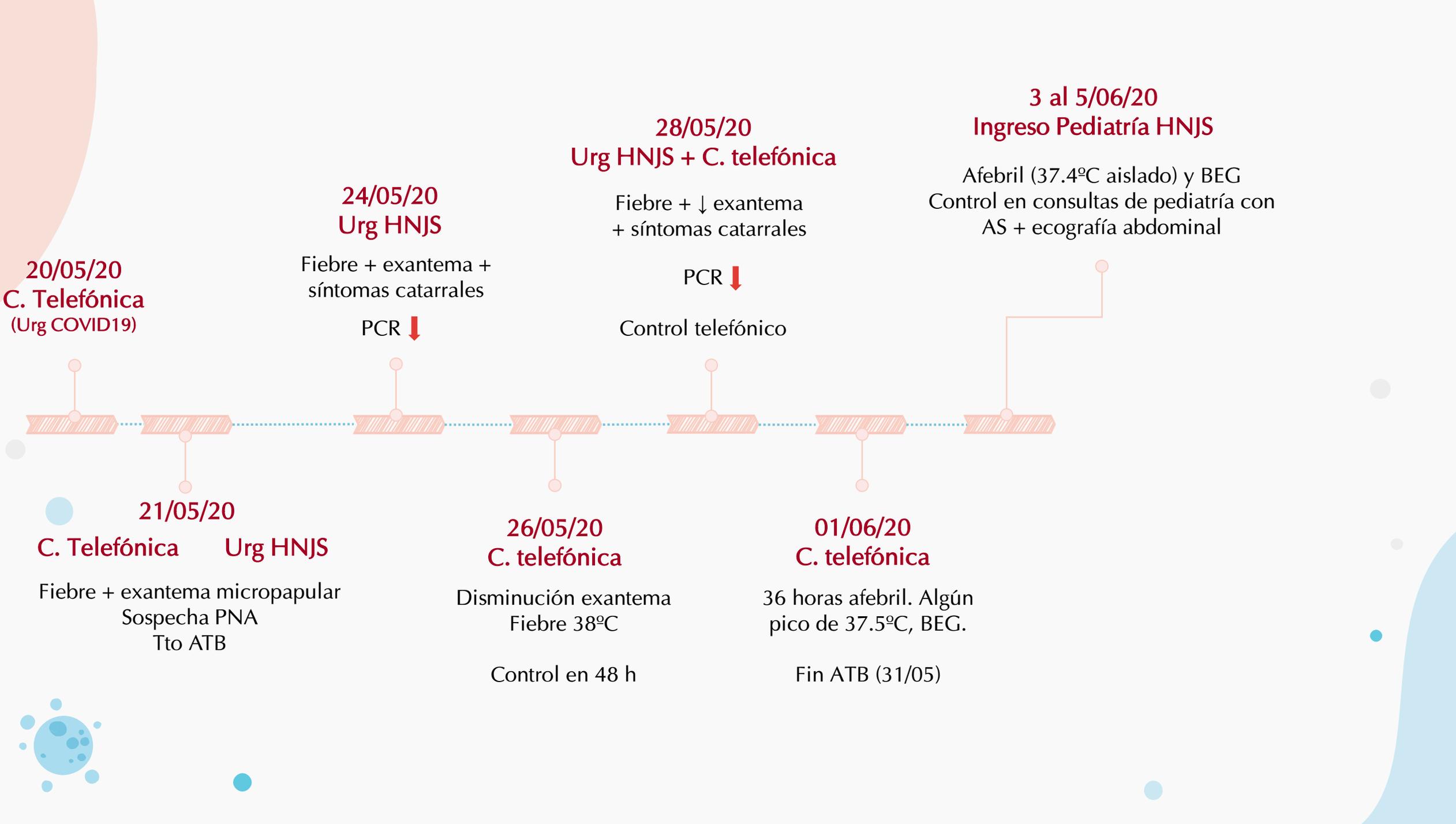
**26/05/20**  
**C. telefónica**

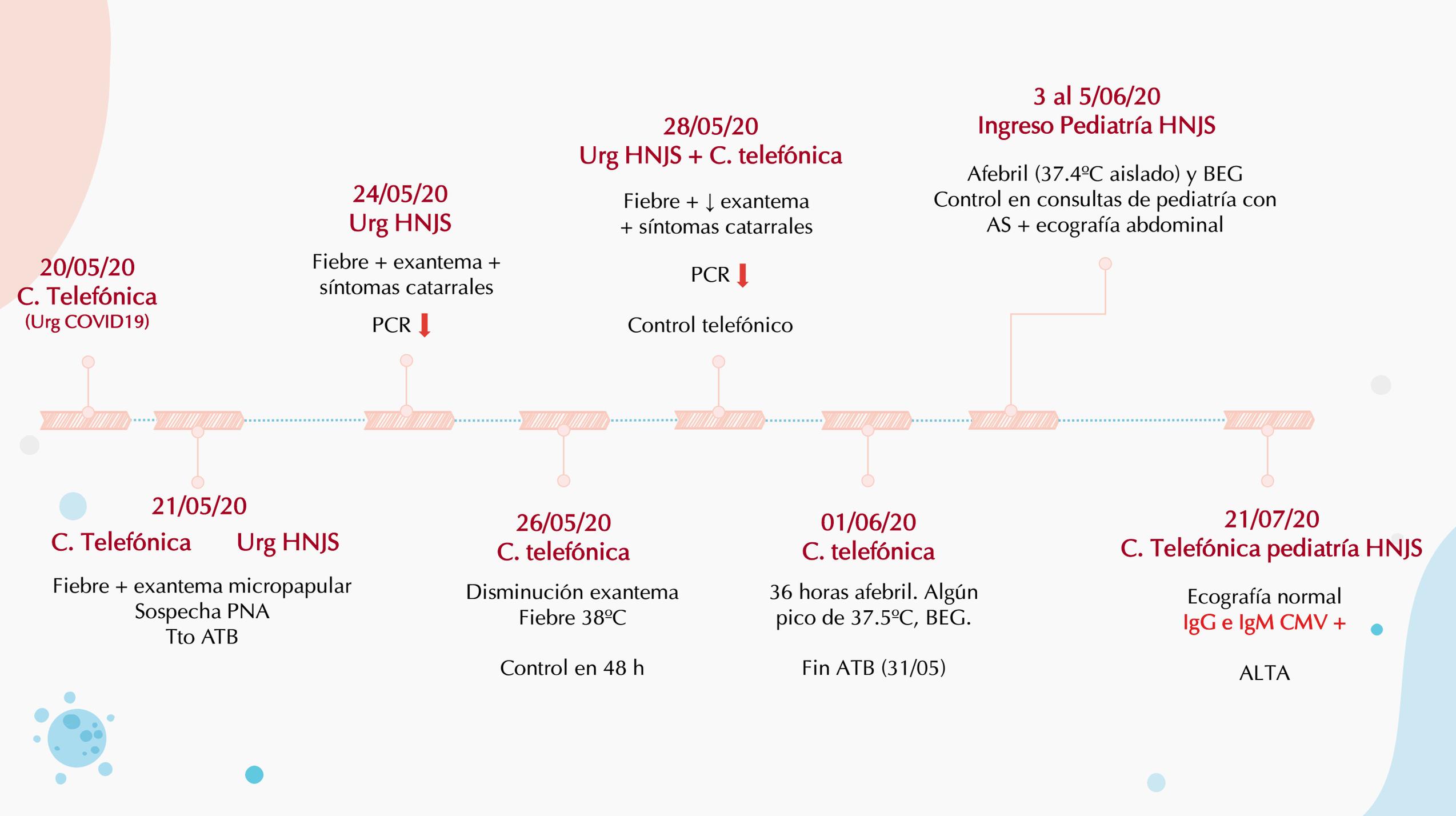
**01/06/20**  
**C. telefónica**

**C. Telefónica**    **Urg HNJS**  
Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

Disminución exantema  
Fiebre 38°C  
Control en 48 h

36 horas afebril. Algún  
pico de 37.5°C, BEG.  
Fin ATB (31/05)





**20/05/20**  
**C. Telefónica**  
(Urg COVID19)

**21/05/20**  
**C. Telefónica**    **Urg HNJS**  
Fiebre + exantema micropapular  
Sospecha PNA  
Tto ATB

**24/05/20**  
**Urg HNJS**  
Fiebre + exantema +  
síntomas catarrales  
PCR ↓

**26/05/20**  
**C. telefónica**  
Disminución exantema  
Fiebre 38°C  
Control en 48 h

**28/05/20**  
**Urg HNJS + C. telefónica**  
Fiebre + ↓ exantema  
+ síntomas catarrales  
PCR ↓  
Control telefónico

**01/06/20**  
**C. telefónica**  
36 horas afebril. Algún  
pico de 37.5°C, BEG.  
Fin ATB (31/05)

**3 al 5/06/20**  
**Ingreso Pediatría HNJS**  
Afebril (37.4°C aislado) y BEG  
Control en consultas de pediatría con  
AS + ecografía abdominal

**21/07/20**  
**C. Telefónica pediatría HNJS**  
Ecografía normal  
**IgG e IgM CMV +**  
ALTA

	21/05	24/05	28/05	3/06 – 5/06	15/7
<b>ANALÍTICA SANGRE</b>					
Hemograma	Normal	Linfocitos activados	Normal	VSG 55	Normal
Bioquímica	Normal	Normal		GGT 215	Normal
PCR (mg/dl)	10.44	8	4.64	5.98 / 6.9	Normal
PCT (ng/ml)	0.32	0.17			
Hemocultivo	(-)	(-)	(-)	(-)	
Serología		IgMVEB (-)		IgG CMV (+) débil IgM CMV (+) IgG toxoplasma (-)	IgG e IgM CMV (+)
<b>ANALÍTICA ORINA</b>					
Tira reactiva	Leucos ++			Normal	
Sedimento	5-10 leucos/campo				
Urocultivo	(-)				
<b>ASPIRADO NASOFARÍNGEO / TEST RÁPIDOS</b>					
PCR SARS-CoV-2	(-)	(-)		(-)	
Panel de virus				(-)	
Streptococo	(-)				
<b>PRUEBAS IMAGEN</b>					
Radiografía tórax		Normal			
Ecografía abdomen				Esplenomegalia	Normal

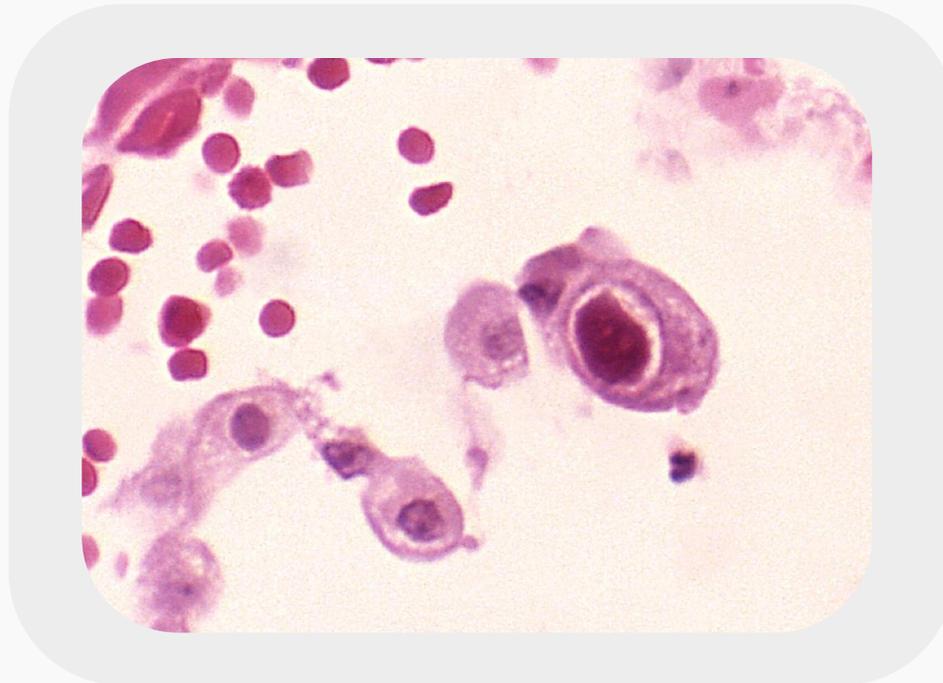
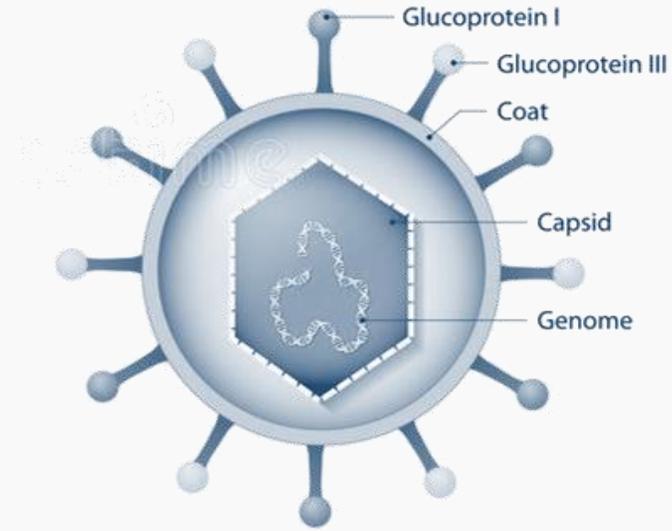
The background features a large, light blue abstract shape on the right side and a smaller, light orange shape on the bottom left. Scattered throughout are various sized dots in shades of blue, orange, and grey. A cluster of blue dots of varying sizes is located in the upper left quadrant. The text 'CITOMEGALOVIRUS' is centered in a bold, dark blue font.

# CITOMEGALOVIRUS



# INTRODUCCIÓN

- Familia Herpesviridae
- ADN de doble cadena lineal
- Replicación lenta



Causa + común de  
**infección  
congénita**  
en países  
desarrollados

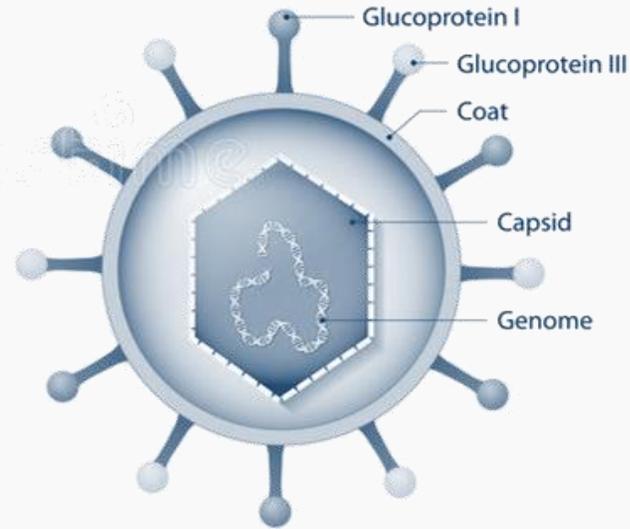


# INTRODUCCIÓN

- Familia Herpesviridae
- ADN de doble cadena lineal
- Replicación lenta

## TRANSMISIÓN

- Saliva
- Leche materna
- Orina
- Heces
- Sangre
- Semen
- Secreciones cervicales y vaginales
- Trasplantes de tejidos o de órganos



Causa **+** común de  
**infección  
congénita**  
en países  
desarrollados



Contacto **directo** entre personas  
**Indirecta** a través de fómites contaminados

Tras la infección la excreción viral  
puede durar varios años

# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

S. MONONUCLEÓSIDO

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

- < 3%
- TRANSMISIÓN

Primoinfección  
materna



Se infectan el 40%



5-15% síntomas  
(50% secuelas  
permanentes)

8 -10 % infección congénita sintomática  
enfermedad grave

Reactivación o  
reinfección viral



Se infectan el 1-2%



Mayoría asintomáticos

# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

S. MONONUCLEÓSIDO

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

- < 3%
- TRANSMISIÓN
- CLÍNICA

Intraútero → signos ecográficos

Neonato:

- Petequias
- Ictericia
- Hepatoesplenomegalia
- PEG
- Microcefalia
- Hipoacusia neurosensorial (al nacimiento o tardía)
- Hipotonía
- Coriorretinitis
- Convulsión
- Anemia hemolítica
- Neumonía



# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

S. MONONUCLEÓSIDO

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

- 10-60% en primeros 6 meses

- TRANSMISIÓN → **Leche materna**  
Secreciones vaginales  
Transfusión sanguínea



- CLÍNICA

RNT → casi siempre asintomático

Prematuros (<1500g) → sintomáticos, riesgo enfermedad grave

Anticuerpos IgG CMV  
maternos vía trasplacentaria

Madurez del sistema  
inmunitario

# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

S. MONONUCLEÓSIDO

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

- TRANSMISIÓN → Guarderías y colegios (50-80%)  
Actividad sexual (adolescentes)

Riesgo población general 1-3%

- CLÍNICA → Mayoría asintomáticos, solo 10% clínica.



# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

**S. MONONUCLEÓSIDO**

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

Forma más frecuente en inmunocompetentes.

- CLÍNICA:

- Fiebre
- Astenia
- Faringitis
- Rash (ATB Betalactámicos)
- Adenopatía cervical
- Hepatomegalia
- Dolor abdominal
- Diarrea
- Artralgias



Linfocitosis  
(>10% linfocitos atípicos)  
Trombocitopenia  
GOT/GPT  
Anemia



# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

**S. MONONUCLEÓSIDO**

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

Forma más frecuente en inmunocompetentes.

- CLÍNICA:

- Fiebre
- Astenia
- Faringitis
- Rash (ATB Betalactámicos)
- Adenopatía cervical
- Hepatomegalia
- Dolor abdominal
- Diarrea
- Artralgias



Linfocitosis  
(>10% linfocitos atípicos)  
Trombocitopenia  
GOT/GPT  
Anemia



Ac heterófilos



Faringitis exudativa

# ESPECTRO CLÍNICO

INFECCIÓN CONGÉNITA

INFECCIÓN POSTNATAL

TRAS 1º AÑO

S. MONONUCLEÓSIDO

INFECCIÓN INMUNODEPRIMIDOS

Causa importante morbilidad y mortalidad

Receptores de trasplantes / transfusiones

Infección VIH

• TRANSMISIÓN



Reactivación virus endógeno  
Trasplante órgano  
Transfusión hemoderivados

• CLÍNICA

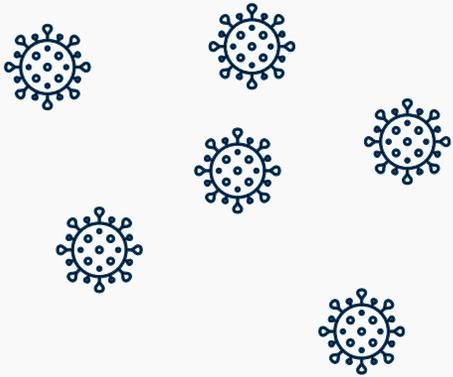


- Síndrome febril
- Neumonitis (++)
- Hepatitis
- Retinitis
- Encefalitis
- Enfermedad gastrointestinal

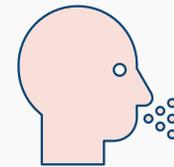


# DIAGNÓSTICO

Infección



Enfermedad



# DIAGNÓSTICO

## Serología

IgM

- Infección reciente
- Reactivación
- Falso positivo

IgG

- Infección pasada

Test avidez:

- Baja avidéz → infección 1º
- Alta avidéz → infección 2º

# DIAGNÓSTICO

## Serología

IgM

- Infección reciente
- Reactivación
- Falso positivo

IgG

- Infección pasada

Test avidez:

- Baja avidéz → infección 1º
- Alta avidéz → infección 2º

### INFECCIÓN RECIENTE O AGUDA

(probable)

IgM anti-CMV +

↑ IgG anti-CMV x4 en muestras pareadas

Baja avidéz

### INFECCIÓN PASADA

IgM anti-CMV +/-

IgG anti-CMV +

Alta avidéz

# DIAGNÓSTICO

## Serología

IgM

- Infección reciente
- Reactivación
- Falso positivo

IgG

- Infección pasada

Test avidez:

- Baja avidez → infección 1º
- Alta avidez → infección 2º

### INFECCIÓN RECIENTE O AGUDA

(probable)

IgM anti-CMV +

↑ IgG anti-CMV x4 en muestras pareadas

Baja avidez

### INFECCIÓN PASADA

IgM anti-CMV +/-

IgG anti-CMV +

Alta avidez

IgG + no valor en inmunodeprimidos  
Útil para valorar riesgo de reactivación

# DIAGNÓSTICO

Pruebas diagnósticas	Ventajas	Desventajas
Serología	IgG+: inf pasada Test avidez Ac	Ac IgM: ¿previa o actual? Ac IgG maternos Poco útil en IMD
PCR cualitativa (PCRc)	↑ S y E Mejor S que cultivo	¿Latencia vs activación? No cuantifica carga viral
PCR cuantitativa en tiempo real (PCRq)	>S que PCRc Cuantifica carga viral	
Pruebas antigenemia. pp65	Resultado en 24 horas VIH y receptores trasplante	Mayor volumen muestra Menos estable < S si leucocitos <1000
Cultivo convencional	Diferentes muestras Enf. invasora e inf. congénita	Lento (1-6 sem) < S: sangre Poco útil en IMD
Cultivo Shell vial	Más rápido (2-3 días)	< S: sangre
Estudio histológico	Detección enfermedad invasora	Biopsia

# DIAGNÓSTICO

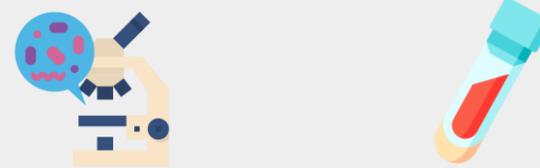
DIAGNÓSTICO PRENATAL

INFECCIÓN PERINATAL

> 1º AÑO Y ADOLESCENTES

INMUNODEPRIMIDOS

Cultivo viral o detección de DNA en  
líquido amniótico



Niveles de **IgM CMV** en sangre fetal (si  
feto sintomático)



# DIAGNÓSTICO

## DIAGNÓSTICO PRENATAL

## INFECCIÓN PERINATAL

> 1º AÑO Y ADOLESCENTES

## INMUNODEPRIMIDOS

## INFECCIÓN CONGÉNITA

Cultivo viral, cultivo shell vial y PCR  
**orina o saliva** en  
primeras tres semanas de vida

Si infección grave → PCR CMV en sangre / plasma

## CRIBADO

- Hallazgos ecográficos prenatales sugerentes
- Sospecha infección congénita sintomática
- Seroconversión o IgM + materna
- CIR
- Cribado auditivo no superado
- Microcefalia



# DIAGNÓSTICO

## DIAGNÓSTICO PRENATAL

## INFECCIÓN PERINATAL

> 1º AÑO Y ADOLESCENTES

## INMUNODEPRIMIDOS

## INFECCIÓN CONGÉNITA

Cultivo viral, cultivo shell vial y PCR  
**orina o saliva** en  
primeras tres semanas de vida

Si infección grave → PCR CMV en sangre / plasma

## INFECCIÓN POSTNATAL

Cultivo y PCR  
**orina o saliva**  
después de tres semanas de vida

Test NEGATIVOS en primeras 3 semanas

PCR CMV sangre seca (pruebas metabólicas)

Inicio síntomas pasadas las primeras semanas,  
neumonitis/enteritis, virus en LBA/biopsia intestinal,  
aumento carga viral en muestras sucesivas.



# DIAGNÓSTICO

DIAGNÓSTICO PRENATAL

INFECCIÓN PERINATAL

> 1° AÑO Y ADOLESCENTES

INMUNODEPRIMIDOS

SEROLOGÍA

IgG o IgM  
específicas



# DIAGNÓSTICO

DIAGNÓSTICO PRENATAL

INFECCIÓN PERINATAL

> 1º AÑO Y ADOLESCENTES

**INMUNODEPRIMIDOS**

Confirmar CMV en órgano



PCR positiva en sangre

Serología y detección en saliva u orina  
raramente son útiles



# TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

- **Infección congénita sintomática:** se recomienda tratamiento con infección confirmada y al menos síntomas de afectación de un órgano.
  - \* Pérdida auditiva aislada → individualizar
- **Pretérmino con infección posnatal:** ganciclovir o valganciclovir.
- **Niños inmunocompetentes:** no suele indicarse tratamiento.
- **Niños inmunodeprimidos con infección activa:** ganciclovir. También si viremia asintomática.

- ✓ Lavado de manos
- ✓ Hemoderivados seronegativos o depleción de leucocitos para pacientes en riesgo (lactantes prematuros y niños inmunodeprimidos).
- ✓ Leche materna tratada (congelación / descongelación o a pasteurización).



## CONCLUSIONES

- Aunque la mayoría de las infecciones por CMV son asintomáticas o leves, puede producir enfermedad grave en recién nacidos y pacientes inmunocomprometidos.
- Adecuada recogida de muestras para diferenciar entre infección congénita vs posnatal (menor secuelas a largo plazo).
- Sospechar ante alteración del cribado auditivo, microcefalia, CIR.
- Prevención con tratamiento de leche materna y precaución en trasplante de órganos y transfusión de hemoderivados en pacientes de riesgo.

# BIBLIOGRAFÍA



- Martín Peinador Y. Aproximación diagnóstica a la infección por citomegalovirus. Grupo de Patología Infecciosa AEPap. 2014. Disponible en: <https://aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido/documentos-del-gpi>
- Demmler-Harrison GJ. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical features and diagnosis. En: UpToDate. Abril 2021. [Consultado en mayo 2021].
- Demmler-Harrison GJ. Congenital cytomegalovirus infection: Management and outcome. En: En: UpToDate. Abril 2021. [Consultado en mayo 2021].
- Demmler-Harrison GJ. Overview of cytomegalovirus infections in children. En: UpToDate. Abril 2021. [Consultado en mayo 2021].
- Caliendo AM. Overview of diagnostic tests for cytomegalovirus infection. En: UpToDate. Abril 2021. [Consultado en mayo 2021].
- Alarcón Allen A, Baquero-Artigao F. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)*. 2011; 74 (1): 52.e.1-52-e13.
- Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr*. 2009; 71(6): 535-547.