

# Hepatitis C en el trasplante hepático

FISIOPATOLOGÍA *pág. 105*

HISTORIA Y EVOLUCIÓN *pág. 115*

TRATAMIENTO *pág. 119*

## Puntos clave

La reinfección por el virus de la hepatitis C (VHC) en pacientes trasplantados por cirrosis VHC+ es universal. Alrededor del 80% presenta una recurrencia aguda poco sintomática con histología de hepatitis lobulillar y elevación de transaminasas, habitualmente entre 1 y 6 meses después del trasplante. Un 20% de pacientes no presentan evidencia de elevación de transaminasas.

Entre los pacientes que recurren histológicamente, un 10% presenta una forma particularmente grave conocida como hepatitis fibrosante colestásica, que cursa con hiperbilirrubinemia, con elevada mortalidad aguda o con rápida progresión a cirrosis hepática.

En todos los pacientes con recidiva aguda, la progresión a hepatitis crónica es muy frecuente, más incluso que en pacientes inmunocompetentes.

Cuando ocurre la recidiva con elevación de transaminasas es preciso hacer diagnóstico diferencial con otras infecciones virales y especialmente con el rechazo agudo. El mejor modo de diferenciar entre ambas situaciones es con la histología hepática (biopsia hepática).

## Clínica y diagnóstico de la reinfección aguda por el virus de la hepatitis C después del trasplante hepático

VÍCTOR VARGAS<sup>a</sup> Y HELENA ALLENDE<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Medicina Interna-Hepatología. Hospital Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

Como ya se ha comentado previamente, después de un trasplante hepático a un paciente con enfermedad crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), la reinfección del injerto por el VHC es un hecho universal. No obstante, no todos los pacientes reinfectados presentan lesión hepática.

En una reunión de consenso reciente, se estandarizaron las definiciones de recurrencia por el VHC postrasplante. Se entiende como infección por el VHC recurrente la que se produce universalmente después del trasplante y se basa en la presencia de ARN-VHC en suero y/o hígado. Se habla de enfermedad por el VHC recurrente aguda la que se produce en los primeros 6 meses después del trasplante con lesiones histológicas con o sin clínica acompañante. Y, finalmente, se habla de enfermedad por el VHC recurrente crónica la que a menudo ocurre después de la enfermedad por el VHC recurrente aguda y que histológicamente se caracteriza por lesiones de hepatitis crónica<sup>1</sup>.

En este capítulo nos centraremos en la enfermedad por el VHC recurrente aguda y comentaremos sus hallazgos histológicos, las características bioquímicas y clínicas que pueden acompañar a la lesión histológica, teniendo siempre presente que frecuentemente esta lesión es poco sintomática.

## Clínica e histología de la enfermedad por el virus de la hepatitis C recurrente aguda después del trasplante hepático

Después de un trasplante hepático por cirrosis VHC, y habitualmente entre 1 y 6 meses después de éste, el 70-80% de los pacientes presenta un cuadro de hepatitis demostrable his-

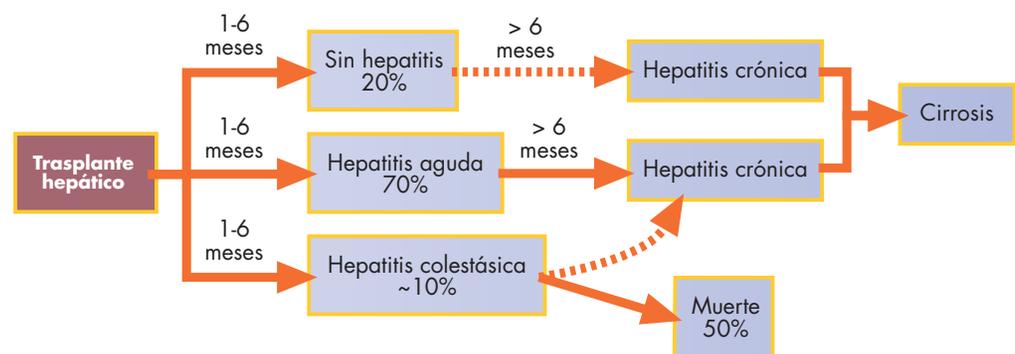
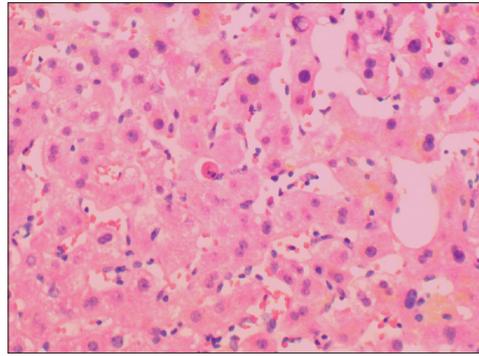


Figura 1. Patrones de recurrencia de la infección por el virus de la hepatitis C después del trasplante hepático.

tológica y bioquímicamente. Como se puede observar en la figura 1, la mayoría de estos pacientes presenta una hepatitis aguda con valores elevados de transaminasas<sup>2-5</sup>. Los pacientes suelen estar clínicamente asintomáticos y la alteración hepática se detecta en una analítica de seguimiento. Un pequeño porcentaje de estos pacientes presenta una forma peculiar de enfermedad más grave, conocida como hepatitis colestásica fibrosante, que se comenta más adelante. Finalmente, hay un grupo de aproximadamente un 20% de pacientes que tienen las transaminasas persistentemente normales y que no desarrollan hepatitis clínica o bioquímica después del trasplante hepático<sup>6,7</sup>. Seguramente, estos pacientes también pueden presentar evolución a la cronicidad, aunque probablemente la progresión histológica será más lenta.

Las alteraciones de las transaminasas que se observan en los pacientes al presentar recurrencias son variadas. En un estudio de seguimiento<sup>6</sup> se describieron 4 tipos de alteraciones bioquímicas en los pacientes que de modo constante presentaron recidiva. El más frecuente consistió en una elevación breve de las transaminasas séricas que volvían a la normalidad en 7-10 días. Este patrón se observó en un 38% de los pacientes. El tiempo medio desde el trasplante al pico de transaminasas fue de 5 meses, con un intervalo entre uno y 12 meses. Otros 2 patrones consistieron en elevaciones crónicas de transaminasas y oscilaciones de transaminasas por encima o por debajo de la normalidad, que comprendieron al 29 y al 19% de los pacientes respectivamente, y finalmente un 14% de los pacientes presentó transaminasas normales persistentemente durante los 12 meses de seguimiento postrasplante. Es de destacar que en este trabajo se observó recidiva histológica en forma de hepatitis en todos los pacientes en los que se había realizado al menos 6 meses de seguimiento.

En otros estudios el porcentaje de pacientes en los que los valores de las transaminasas se elevan puede ser más bajo. Por tanto, para poder demostrar con seguridad la recidiva aguda, debemos realizar estudio histológico; si no se realiza, muchas de estas recidivas pueden pasar desapercibidas. En un estudio longitudinal de recurrencia de la hepatitis C aguda, se realizó una biopsia de protocolo después de 1, 3, 6 y 12 meses. Se diagnosticó una hepatitis aguda en el 70% de pacientes en los primeros 6 meses después del trasplante. Hay que destacar que únicamente menos de la mitad tuvo una elevación de las transaminasas, lo que explica la baja frecuencia de detección de hepatitis C aguda en los estudios que no realizan biopsias hepáticas seriadas<sup>3,8-10</sup>.



**Figura 2.** Hepatitis lobulillar en la enfermedad por recurrencia aguda del virus de la hepatitis C después del trasplante hepático. Inflamación lobulillar y presencia de cuerpos citolíticos (hematoxilina-eosina,  $\times 10$ ).

En el estudio de Gane et al<sup>4</sup>, la mediana del pico de transaminasas fue de 160 U/l y se presentó siempre antes de que transcurrieran 6 meses del trasplante. El pico de transaminasas desaparecía entre una y 4 semanas, aunque en esta serie habitualmente persistió una elevación leve de las transaminasas que denotó la evolución a la cronicidad. Mientras que en individuos inmunocompetentes la infección aguda se resuelve en un 15-30% de los casos, esta resolución espontánea casi nunca ocurre en pacientes trasplantados<sup>3</sup>. Se discute si los pacientes que presentan la recurrencia en forma de hepatitis aguda con elevación de transaminasas tienen más facilidad de desarrollar formas crónicas graves. Rimola et al<sup>11</sup> hallaron que los pacientes que presentan un pico más elevado de transaminasas en el episodio de hepatitis aguda (ALT > 134) presentaban un mayor riesgo de tener una recurrencia del VHC grave. En cambio, en el estudio de Gane et al<sup>4</sup>, no se halló esta relación.

Cuando hay un pico de transaminasas, los valores de ARN-VHC se incrementan entre 2 y 50 veces el índice previo. Cuando el cuadro agudo mejora, la viremia desciende en conjunción con la mejoría de la función hepática<sup>4</sup>. En esta fase, los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que el 90% de los hepatocitos están infectados<sup>12,13</sup>. No hay demasiados estudios acerca de la respuesta inmune en la fase de hepatitis aguda; en un estudio se detectaron en esta fase respuestas CD4 específicas, que desaparecieron con la evolución a la cronicidad<sup>14</sup>. En la enfermedad por el VHC recurrente aguda, el hecho prácticamente constante es la lesión histológica, por lo que el diagnóstico de certeza de hepatitis C aguda en el receptor se basa en la presencia de hallazgos histológicos típicos. En la mayoría de casos, la hepatitis C aguda en trasplantados es similar a la que se observa en pacientes inmunocompetentes con

## Lectura rápida



Tras el trasplante hepático por enfermedad crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), la recurrencia virológica es universal.

Entre 1 y 6 meses después del trasplante, un 70-80% de pacientes presenta una recurrencia aguda en forma de hepatitis, demostrable bioquímica e histológicamente.

En la mayoría de los pacientes, la recurrencia aguda es clínicamente asintomática.

Alrededor del 10% de los pacientes presenta una recurrencia aguda grave en forma de hepatitis colestásica fibrosante.

El patrón de elevación de transaminasas más frecuente en la recurrencia aguda consiste en un pico con descenso posterior, aunque sin normalizar las cifras.

Una mayoría de los pacientes, independientemente de si presentan elevación de transaminasas, evolucionan a hepatitis crónica.



## Lectura rápida



Coincidiendo con la elevación de las transaminasas, hay un aumento marcado de ARN-VHC sérico.

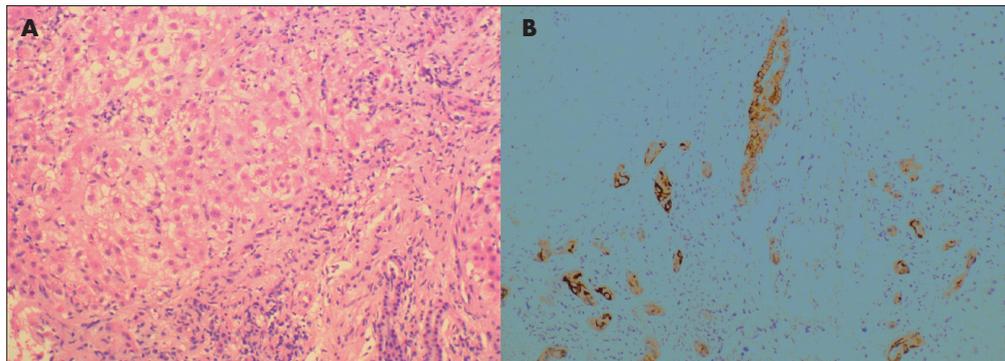
La recidiva histológica aguda más frecuente es como hepatitis lobulillar y es similar a la que se observa en pacientes inmunocompetentes.

La hepatitis fibrosante colestásica se produce por efecto citopático directo del VHC y se acompaña de una mortalidad temprana elevada (50%).

El diagnóstico diferencial de la recurrencia aguda por el VHC ha de realizarse sobre todo con el rechazo agudo.

Actualmente, la mejor forma de diferenciar la recurrencia del VHC de rechazo agudo es la biopsia hepática.

La utilidad de marcadores que diferencien con seguridad la recurrencia del VHC y rechazo agudo no ha llegado a la práctica clínica diaria.



**Figura 3.** Hepatitis colestásica por el virus de la hepatitis C después del trasplante hepático.

A. Ampliación del espacio porta con proliferación colangiolar, ducto principal conservado.

Balonización hepatocelular (hematoxilina-eosina, X10). B. Citoqueratina AE1 que demuestra la proliferación colangiolar con preservación del ducto.

necrosis hepatocitaria focal y hepatocitos tumefactos, presencia de cuerpos acidofílicos e inflamación lobulillar leve (fig. 2); también es frecuente la presencia de agregados linfocitos y esteatosis macrovesicular<sup>15</sup>. Otros hallazgos histológicos que sugieren disfunción del injerto temprano (rechazo agudo, obstrucción del flujo venoso, isquemia, problemas biliares u otras infecciones virales) también pueden estar presentes. Si realizamos biopsias de seguimientos tras el episodio agudo, se reduce la inflamación lobulillar, aunque en la mayoría de los pacientes persiste la inflamación portal.

## Hepatitis fibrosante colestásica

Hay una forma de recurrencia de la hepatitis C, que es la denominada hepatitis colestásica fibrosante. Ésta es una forma de recurrencia que ocurre tempranamente, habitualmente entre 1 y 3 meses postrasplante y que representa menos del 10% de todos los casos<sup>16,17</sup>. Esta forma grave de recurrencia cursa desde el punto de vista clínico con valores elevados de bilirrubina (> 6 mg/dl) y de la fosfatasa alcalina y gamma-glutamyltranspeptidasa. En el trabajo de Schluger et al<sup>16</sup>, los valores medios de bilirrubina fueron de 25 mg/dl, los de fosfatasa alcalinas de 350 U/l (n = 30-110 U/l) y los de ALT de 186 U/l. Entre los hallazgos patológicos de esta peculiar forma de recidiva, destaca la balonización central, escasa presencia de signos inflamatorios y proliferación colangiolar sin pérdida de conductillos biliares (fig. 3).

Aunque no siempre es así, este tipo de lesión puede ocurrir después de que el paciente presente valores elevados de inmunodepresión. El síndrome representa una respuesta alternativa (inducida por altos valores de inmunodepresión) a la hepatitis aguda antes descrita.

En esta forma de recurrencia hay una respuesta inmune reducida con ausencia de respuestas CD4. Además, hay una respuesta de citocinas intrahepáticas, interleucina (IL) 10 e IL-4. Estos episodios permiten al virus proliferar, por lo que los pacientes con esta forma de recurrencia presentan altas cargas virales en suero y tejido hepático<sup>2,18,19</sup>, superiores a las observadas en la recurrencia aguda no complicada. La ausencia de una respuesta inmune específica junto con la importante carga viral acaba produciendo una lesión del injerto mediado por un efecto citopático directo del VHC. Histológicamente, la escasez de inflamación acompañante también indica el efecto citopático directo en el hepatocito.

Esta forma de recurrencia se acompaña de una alta mortalidad (50%); la mayoría de los que sobreviven evolucionan a formas de hepatitis C crónica, con tendencia al desarrollo de cirrosis temprana<sup>2</sup>.

## Diagnóstico diferencial

Cuando se produce una elevación de transaminasas que sea sospechosa de recidiva aguda de la infección por el VHC, hay siempre que descartar la posibilidad de otras infecciones virales, como puede ser una infección activa por citomegalovirus o infecciones por virus de Epstein-Barr, herpes simple o incluso una infección de novo por virus de la hepatitis B. En estos casos, puede ser de ayuda el uso de técnicas serológicas o la presencia de antigenemia para citomegalovirus. También es importante diferenciar que la disfunción hepática detectada no se deba a lesiones isquémicas o a rechazo. Dado que la respuesta bioquímica hepática es monótona y nunca diferencia con seguridad unos procesos de otros, en muchos casos es necesario realizar biopsia hepática<sup>20</sup>.

**Tabla 1.** Hechos histológicos diferenciales entre rechazo agudo y recurrencia aguda del virus de la hepatitis C postrasplante hepático

	Rechazo agudo	Hepatitis C recurrente
Tiempo postrasplante	< 2 meses	> 1 mes
Inflamación portal		
Linfocitos	Activados	Uniformes
Agregados	Ocasionales	Frecuente
Folículos	Casi nunca	En el 50%
Eosinófilos	Casi siempre	Raro
Endotelialitis	Casi siempre	Raro
Esteatosis	No	Frecuente
Fibrosis	Mínima	Leve
Necrosis parcheada	Muy rara	Común
Desorganización lobulillo	Mínima	Frecuente, leve
Inflamación lobulillar	Mínima	Frecuente, leve

Una vez descartadas estas etiologías virales (en estos casos el establecimiento de diagnóstico etiológico puede estar ayudado por técnicas inmunohistoquímicas o de hibridación in situ), y si la biopsia muestra hallazgos de hepatitis lobulillar sin signos de isquemia o rechazo, se puede establecer que la elevación de transaminasas se debe a una hepatitis aguda en relación con la recidiva histológica del virus de la hepatitis C<sup>20</sup>. Dado que en biopsias de hepatitis C recurrente también pueden estar presentes hallazgos histológicos que sugieren disfunción del injerto temprano (rechazo agudo, obstrucción del flujo venoso, isquemia, problemas biliares u otras infecciones virales), en ocasiones es realmente difícil asegurar que estamos ante una recidiva viral, un rechazo agudo o ambos. En la tabla 1 se muestran los datos patológicos que apoyan una u otra etiología de la disfunción hepática.

Cuando hay dudas de si estamos delante de hepatitis C recurrente o rechazo, hemos de tener presente que en la hepatitis C recurrente son más prominentes la necrosis hepatocitaria parcheada, desorganización lobulillar y la hipertrofia de las células de Kupffer. De forma más tardía, en el curso de la hepatitis C recurrente puede producirse inflamación portal mononuclear con necrosis erosiva recurrente y una ligera lesión ductal; ello ocurre cuando estamos en la transición de hepatitis aguda a crónica. En general, en esta situación hay que tener presente que en la hepatitis C recurrente siempre es más pro-

minente la actividad lobulillar o la necrosis erosiva que la inflamación y la lesión de los conductillos biliares. Teniendo en cuenta estos criterios histopatológicos, los errores diagnósticos son escasos y, en general, cuando se producen, suele haber un sobrediagnóstico de rechazo agudo en el contexto de hepatitis C recurrente<sup>21</sup>.

Se han intentado utilizar marcadores para diferenciar una situación de hepatitis C aguda recurrente de un rechazo agudo. La determinación cuantitativa de anti-VHC IgM<sup>22</sup> podría ser un marcador de hepatitis recurrente; sin embargo, para que sus elevaciones tengan algún valor diferencial, se precisan determinaciones seriadas que raramente pueden realizarse. Se ha propuesto también que los valores elevados de ARN-VHC en el tejido hepático<sup>23</sup> apoyarían la hepatitis recurrente, mientras que la presencia de C4d en la biopsia hepática favorecería el rechazo agudo<sup>24</sup>. Aún hay poca experiencia para confirmar la utilidad clínica de estos hallazgos.

## Bibliografía



● Importante    ●● Muy importante

1. Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F, and the International Liver Transplantation Society Expert Panel. Report of the First International Liver Transplantation Society Expert Panel Consensus Conference on Liver Transplantation and Hepatitis C. Liver Transpl. 2003;9 Supl 3:S1-S9.

## Bibliografía recomendada

Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, et al. A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology*. 1996;110:167-77.

*Artículo excelente y ya clásico que realiza un seguimiento longitudinal de 25 pacientes trasplantados por el virus de la hepatitis C (VHC), en el que se analizan los aspectos clínicos, biológicos, virológicos e histológicos de la recurrencia del VHC.*

Samuel D, Forns X, Berenguer M, Trautwein C, Burroughs A, Rizzetto M, et al. Report of the monothematic EASL Conference on liver transplantation for viral hepatitis. *J Hepatol*. 2006;45:127-43.

*Se trata de un resumen de una reunión de expertos que tuvo lugar a inicios de 2006, en el que se revisan aspectos del trasplante hepático en enfermedades virales, básicamente el virus de la hepatitis B y C (VHC). Se incluyen capítulos acerca de la reinfección del VHC en el que se resumen aspectos clínicos e inmunológicos de ésta.*



## Bibliografía recomendada

Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F, and the International Liver Transplantation Society Expert Panel. Report of the First International Liver Transplantation Society Expert Panel Consensus Conference on Liver Transplantation and Hepatitis C. *Liver Transpl.* 2003;9 Suppl 3: S1-S9.

*En este suplemento de la revista hay los proceedings de una conferencia de consenso acerca de trasplante hepático y el virus de la hepatitis C (VHC) celebrado en 2003. En el artículo citado se resumen las conclusiones de la conferencia. En varios resúmenes de las conferencias se muestran aspectos de la enfermedad por el VHC recurrente aguda.*

Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A, Ruppert K, Nalesnik MA, Randhawa P, et al. Recurrent hepatitis C in liver allografts: prospective assesment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:658-69.

*Interesante artículo en el que se sigue a 48 pacientes trasplantados por enfermedad crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) y que presentan recurrencia. Se analizan datos clínicos, bioquímicos e histológicos para caracterizar los episodios de recurrencia aguda del VHC y los episodios de rechazo. Se analiza el valor de la biopsia hepática para diferenciar entre las 2 situaciones.*

2. McCaughan GW, Zekry A. Impact of immunosuppression on immunopathogenesis of liver damage in hepatitis C-virus infected recipients following liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003;9 Suppl 3:S21-S7.
3. Gane E. The natural history and outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected recipients. *Liver Transpl.* 2003;9 Suppl 3:S28-S34.
4. ●● Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Martens G, Portmann BC, et al. A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology.* 1996;110:167-77.
5. Zhou S, Terrault NA, Ferrell L, Hahn JA, Lau JY, Simmonds P, et al. Severity of liver disease in liver transplantation recipients with hepatitis C virus infection: relationship to genotype and level of viremia. *Hepatology.* 1996;24:1041-6.
6. ● Shiffman ML, Contos MJ, Luketic VA, Sanyal AJ, Purdum PP, Mills AS, et al. Biochemical and histologic evaluation of recurrent hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 1994;57:526-32.
7. Weinstein JS, Poterucha JJ, Zein N, Wiesner RH, Persing DH, Rakela J. Epidemiology and natural history of hepatitis C infections in liver transplant recipients. *J Hepatol.* 1995;22:154-9.
8. ● Gretsch D, Bacchi C, Corey L, De la Rosa C, Lesniewski R, Kowdley K, et al. Persistent HCV infection after liver transplantation: Clinical and virological features. *Hepatology.* 1995;22:1-9.
9. Feray C, Samuel D, Thiers V, Gigou M, Pichon F, Bismuth A, et al. Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J Clin Invest.* 1992;89:1361-5.
10. ● Wright TL, Donegan E, Hsu HH, Ferrell L, Lake J, Kim M, et al. Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology.* 1992;103:317-22.
11. Rimola A, Restrepo JC, Quintó L, Sánchez Tapias JM, Navasa M, Cirera I, et al. Incidence and predictive factors of severe HCV recurrence after liver transplantation. *J Hepatol.* 1998;28 Suppl 1:42.
12. Ballardini G, De Raffèle E, Groff P, Bioulac-Sage P, Grassi A, Ghetti S, et al. Timing of reinfection and mechanisms of hepatocellular damage in transplanted hepatitis C virus-reinfected liver. *Liver Transpl.* 2002;8:10-20.
13. ●● McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol.* 2004;40:368-74.
14. Schirren CA, Jung MC, Worzfeld T, Mamin M, Baretton G, Gerlach JT, et al. Hepatitis C virus-specific CD4+ T cell response occurs early, is multispecific, compartmentalises to the liver and does not correlated with recurrent disease. *J infect Dis.* 2001;183:1187-94.
15. ●● Ferrell LD, Wright TL, Roberts J, Ascher N, Lake J. Hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Hepatology.* 1992;16:865-76.
16. ●● Schluger LK, Sheiner PA, Tung SN, Lau JY, Min A, Wolf DC, et al. Severe recurrent cholestatic hepatitis following orthotopic liver transplantation. *Hepatology.* 1996;23:971-6.
17. Lim H, Lau G, Davis GL, Dolson DJ, Lau JY. Cholestatic hepatitis leading to hepatic failure in a patient with organ transmitted hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 1994;106:248-51.
18. Doughty AL, Spencer JD, Cossart YE, McCaughan GW. Cholestatic hepatitis after liver transplantation is associated with persistently high serum hepatitis C virus RNA levels. *Liver Transpl Surg.* 1998;4:15-21.
19. Sreekumar R, González-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J, et al. Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology.* 2000;32: 1125-30.
20. Sebagh M, Samuel D. Place of the liver biopsy in liver transplantation. *J Hepatol.* 2004;41:897-901.
21. ● Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A, Ruppert K, Nalesnik MA, Randhawa P, et al. Recurrent hepatitis C in liver allografts: prospective assesment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:658-69.
22. Ciccorossi P, Filippini F, Oliveri F, Campani D, Colombatto P, Bonino F, et al. Increasing serum levels of IgM anti-HCV are diagnostic of recurrent hepatitis C in liver transplant patients with ALT flares. *J Viral Hep.* 2003;10:168-73.
23. Gottschlich MJ, Aardema KL, Burd EM, Nakhleh RE, Brown KA, Abouljoud MS, et al. The use of hepatitis C viral RNA levels in liver tissue to distinguish rejection from recurrent hepatitis C. *Liver Transpl.* 2001;7:436-41.
24. Schmeding M, Dankof A, Krenn V, Krukemeyer MG, Koch M, Spinelli A, et al. C4d in acute rejection after liver transplantation—A valuable tool in differential diagnosis to hepatitis C recurrence. *Am J Transplant.* 2006;6:523-30.