



Valutazione del ruolo predittivo del polimorfismo di *IL28B* (rs12979860) ed altri parametri nella risposta alla terapia interferonica

Eliana Tadini, Lorenzo Minoli

*Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

Valutazione del polimorfismo del gene *IL28B* (rs12979860) ed altri parametri clinico-laboratoristici nella risposta alla terapia interferonica dell'epatite cronica HCV correlata

Nel corso degli anni le risorse farmacologiche con le quali trattare i pazienti affetti da epatite cronica correlata al virus HCV (Hepatitis C Virus) sono cambiate passando dalla singola somministrazione di Interferone, a quella basata sull'Interferone Peghilato e quindi ancora alla sua associazione con la Ribavirina. Tuttavia, soprattutto per i genotipi 1 e 4, i pazienti trattati sono poco responsivi alla duplice terapia di attuale impiego. Viste le modeste probabilità di risposta, gli effetti collaterali anche gravi correlati al trattamento e il costo elevato dei farmaci, da anni si sta discutendo della necessità di individuare elementi predittivi del possibile outcome terapeutico.

Nello specifico di questo studio si valuta quale sia stato nel pool di pazienti della Sezione di Epatologia della Clinica di Malattie Infettive della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia il ruolo predittivo ricoperto dal polimorfismo di *IL28B* (rs12979860).

Analysis of *IL28B* gene polymorphism (rs12979860) and other parameters in relation to Interferon therapy outcome in chronic HVC related hepatitis

Over the years, pharmacological resources able to treat HCV chronic hepatitis changed: from single interferon administration, to Pegylated Interferon and then to its association with Ribavirine. Anyway, especially genotype 1 and 4 are poorly responsive to actual dual therapy. In relation with moderate treatment response chances, serious adverse events and elevated prices, we need new predictive outcome measures.

This study is about the predictive role of *IL28B* polymorphism (rs12979860) in relation to standard interferon therapy. This polymorphism is already known in literature and we analysed its role in our HCV chronic hepatitis patients' pool.

Introduzione

L'infezione cronica da parte del virus dell'epatite C (HCV) rappresenta uno dei più importanti problemi di salute a livello globale. Le stime proposte recentemente dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) prevedono 170 milioni di individui affetti in tutto il mondo con un incremento

annuo di 4.2 milioni di nuovi pazienti [1]. Il trattamento basato sull'associazione di Interferone-peghilato α (peg-INF α) con la Ribavirina (RBV) rappresenta tuttora la terapia standard [2] cui indirizzare i pazienti HCV+ che soddisfino i criteri di eleggibilità alla terapia. Quest'approccio terapeutico è tuttavia gravato da costi elevati, effetti collaterali frequenti e talvolta gravi, unitamente ad una probabilità di outcome della terapia in termini di SVR (Sustained Virological Response) non ottimale, non essendo superiore al 50% nei pazienti infetti da HCV genotipo 1.

Nel 2009, attraverso la metodica GWAS (Genome Wide Association Studies) sono stati identificati dei polimorfismi genetici che mostrano un'associazione statisticamente significativa rispetto alla risposta alla terapia interferonica [3]. Tali SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) sono localizzati a livello del locus di *IL28B* (gene codificante per INF λ 3) sul cromosoma 19 [3]. Diversi studi sono stati condotti per valutare l'affidabilità di tali polimorfismi come potenziali markers di outcome, tra questi uno localizzato 3,176 basi di distanza in direzione 5' è stato preso in considerazione in questo studio: *IL28B* (rs12979860) [4]. Questo polimorfismo corrisponde ad una singola variazione nucleotidica in posizione 39,789,787 sul cromosoma 19. L'allele maggiore presenta una citosina (C) in questo punto, mentre quello minore una timina (T). Conseguentemente si parla di allele C e di allele T. I pazienti valutati per questo SNP possono dunque presentare tre diversi pattern allelici: omozigosi CC, eterozigosi CT oppure omozigosi TT [3-4]. È dimostrato in letteratura che l'allele C sia non solo associato ad una maggior probabilità di risposta alla terapia interferonica [9], ma anche ad una maggior probabilità di risoluzione spontanea dell'infezione da HCV [5]. La valutazione genetica dei pazienti per questo polimorfismo è oggi un passo importante nell'inquadramento pre-terapeutico.

Lo studio consta contemporaneamente di una prima analisi univariata di una popolazione di 258 pazienti, cui fa seguito una seconda analisi, questa volta multivariata. Con l'analisi univariata è stato possibile valutare quale ricaduta abbia avuto il singolo parametro preso in considerazione sull'outcome della terapia. Con l'analisi multivariata invece sono stati rintracciati i fattori di rischio indipendenti per il relapsing e per l'esito come non responder.

Scopo del lavoro

Una valutazione oculata delle strategie terapeutiche, che miri ad una presa in carico sempre più personalizzata del paziente, è una necessità impellente al fine di migliorare la casistica e per ottimizzare la distribuzione delle risorse economiche. Nel lavoro condotto si valuta se il polimorfismo di *IL28B* (rs12979860) abbia avuto un peso statisticamente significativo rispetto all'outcome registrato a termine della terapia ben condotta basata su peg-INF α e RBV. In contemporanea sono analizzati, con analogo intento, altri parametri normalmente inclusi nell'inquadramento pre-terapeutico del paziente.

Materiali e metodi

Progetto di studio

Si sono valutati alcuni parametri clinico-laboratoristici normalmente impiegati nell'inquadramento pre-terapeutico, in una popolazione di 258 pazienti afferente al bacino d'utenza degli ambulatori della Sezione di Epatologia della Clinica di Malattie Infettive della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Tra questi parametri si annovera anche il pattern allelico del polimorfismo di *IL28B* (rs12979860).

Contesto

I dati sono stati raccolti tra marzo e maggio 2013 negli ambulatori della Sezione di Epatologia della Clinica di Malattie Infettive della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. La singola valutazione di *IL28B* (rs12979860) è antecedente e risale al periodo compreso tra gennaio 2010 e marzo 2013.

Per ogni paziente con pattern allelico dello SNP *IL28B* (rs12979860) noto, sono stati valutati anche tutti i valori assunti da altri parametri clinico-laboratoristici normalmente esaminati nell'inquadramento pre-terapeutico (sesso, età, genotipo virale infettante, coinfezione HIV-HCV, HCV-RNA ed enzimi di funzionalità epatica: AST/ALT). Non tutti i pazienti sono stati trattati con terapia interferonica standard (peg-IFN α e RBV) e la popolazione è dunque stata suddivisa sin da subito in due macro-gruppi: i trattati (164 pazienti su 258) e i non trattati (94 pazienti su 258). Solo in seguito si sono operate altre suddivisioni nel gruppo dei trattati: in 129 pazienti su 164 la terapia è stata portata a termine, indipendentemente dall'outcome conseguito, 21 pazienti su 164 erano in trattamento nella fase di elaborazione dei dati mentre 14 pazienti su 164 hanno interrotto il trattamento e sono stati definiti drop-out. I pazienti drop-out, i non trattati e quelli in corso di trattamento non sono stati presi in considerazione nell'elaborazione finale dei dati, al contrario i 129 pazienti che hanno ultimato il trattamento sono stati ulteriormente suddivisi sulla base dell'outcome finale in responder, relapser e non responder.

Partecipanti

Tutti i pazienti sono stati valutati dal punto di vista clinico e laboratoristico seguendo i criteri di eleggibilità al trattamento dettati dalle linee guida dell'EASL (European Association for the Study of the Liver) [6].

Nel pool di pazienti trattati (164 su 258) si sono registrati 14 casi di interruzione del trattamento conseguentemente definiti come drop-out. In 10 casi la sospensione della terapia è stata dettata dall'insorgenza di effetti collaterali legati all'Interferone (depressione profonda dell'umore, dimagrimento eccessivo, piastrinopenia <30,000 elementi/ml, anemizzazione <10 g/dl) [8]. In 1 caso la sospensione della terapia è stata decisa dal paziente dopo la prima settimana di somministrazione, in 2 casi si è interrotto il trattamento a seguito di insorgenza di una patologia neoplastica (1 neoplasia colon-rettale e 1 carcinoma mammario), 1 drop-out è invece stato legato al riscontro di una polmonite bilaterale interstiziale.

I pazienti che hanno portato a termine il trattamento (150 in totale) sono stati definiti come segue in relazione all'outcome conseguito:

- **responder**: la carica virale è stata stabilmente negativa.
- **Relapser**: pazienti che hanno registrato una ripositivizzazione della carica virale (HCV-RNA >35 UI/l) alla fine del trattamento oppure pazienti che hanno ottenuto un'iniziale negativizzazione di HCV-RNA in corso di trattamento ma che, nello stesso periodo di tempo, hanno presentato una ripositivizzazione della carica virale [7].
- **Non responder**: i pazienti che, nonostante trattamento ben condotto, non hanno mai conseguito una negativizzazione di HCV-RNA [7].

Misure

Per la valutazione della carica virale (HCV-RNA) è stata utilizzata la metodica Abbott RealTime HCV assay (sensibilità: 35 UI/l per 0.2ml di volume campione, specificità: $\geq 99.5\%$); per le ulteriori valutazioni si sono scelte le tecniche seguenti: per il genotipo virale infettante la tecnica INNO-LiPA v2.0 (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium) [10] e per il pattern allelico di *IL28B* (rs12979860) si è proceduto attraverso sonda TaqMan real-time PCR [11].

Metodi statistici

I dati quantitativi sono stati sintetizzati con media e deviazione standard se normalmente distribuiti, oppure con mediana e range interquartile se la distribuzione non è risultata normale. Le variabili qualitative sono state invece descritte come conteggi e percentuali.

L'analisi statistica univariata per i parametri quantitativi tra i due gruppi (trattati e non trattati) è stata effettuata con il test t di Student o analogo non parametrico, mentre per le variabili qualitative si è scelto il test chi-quadrato. L'associazione multivariata tra risposta al trattamento e fattori in studio è stata analizzata utilizzando tecniche di regressione logistica multinomiale. I parametri risultati significativi all'analisi univariata sono stati successivamente analizzati con un modello multivariato per l'identificazione del loro eventuale ruolo come fattori di rischio indipendenti. Tutti i test sono a due code e il limite di significatività scelto è stato quello usuale del 5% ($p < 0.05$). Le analisi sono state effettuate con il software STATA (versione 12, Stata Corporation, College Station, 2012, Texas, USA).

Risultati

In prima battuta si sono considerati contemporaneamente i gruppi trattati e non trattati: in relazione ai parametri clinico-laboratoristici presi in considerazione non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi. Tuttavia, valutando il gruppo dei pazienti infetti da HCV di genotipo facile (comprensivo dei pazienti infetti da HCV di genotipo 2 e 3), si è constatato che in questo caso l'attitudine sia quella di intraprendere il percorso terapeutico con maggior frequenza rispetto ai pazienti con infezione cronica da HCV di genotipo difficile (comprensivo dei pazienti infetti da HCV di genotipo 1 e 4) (Tabella 1, voce «Genotipo facile»). Al tempo stesso si è visto come la carica virale basale dei trattati e la carica virale registrata in occasione dell'ultimo controllo di follow-up dei pazienti non trattati non differiscano significativamente tra loro (Tabella 1, voce «logHCV»).

Considerando la sola popolazione dei trattati (164 pazienti su 258), 21 pazienti erano in trattamento al momento della raccolta dei dati. Questi unitamente ai drop-out (14 pazienti in totale) non sono stati tenuti in considerazione nella successiva fase di ri-elaborazione dei dati. I pazienti in trattamento e i drop-out costituiscono rispettivamente il 12.8% del gruppo dei trattati e l'8.5%.

I pazienti considerati nell'analisi univariata e multivariata sono dunque quelli che rientrano nel gruppo dei trattati e che hanno concluso il trattamento. Questi sulla base della risposta alla terapia sono stati classificati in non responder (35.66%, 46 pazienti su 129), responder (40.31%, 52 pazienti su 129) e relapser (24.03%, 31 pazienti su 129).

Nella fase dell'analisi univariata i parametri sono stati valutati singolarmente al fine di risalire al peso effettivamente ricoperto da ciascuno di questi sull'outcome del trattamento, s'inserisce di seguito il ragionamento effettuato per il singolo parametro preso in considerazione. Per i dati si faccia riferimento alla tabella 2.

Età

La quantità denominata rapporto dei rischi relativi consiste in questo caso nel rischio relativo di essere non responder associato ad un incremento unitario dell'età, diviso il rischio relativo di essere responder anch'esso associato ad un incremento unitario dell'età. In questo caso il valore è circa 1: l'età non sembra quindi avere alcun peso. Lo stesso risulta anche per l'outcome terapeutico di relapsing: anche qui la stima del rapporto dei rischi relativi vale circa 1. A conferma i p-value > 0.05 (Tabella 2, voce «Età»).

Sesso

In questo caso il rapporto dei rischi relativi rappresenta il rischio relativo di essere non responder nelle

femmine rispetto ai maschi diviso il rischio relativo di essere responder delle femmine rispetto a quello dei maschi. Il significato del rapporto è analogo in caso di sostituzione dell'outcome da non responder a relapser. Entrambi i rapporti hanno valore minore di 1, il che significherebbe che il sesso femminile abbia maggior probabilità di risultare responder alla terapia rispetto al sesso maschile. Però i p-value grandi invalidano queste conclusioni (Tabella 2, voce «Sesso femminile»).

Genotipo

Il rapporto dei rischi relativi è il rischio relativo di essere non responder in caso di genotipo difficile rispetto ai soggetti con genotipo facile, diviso il rischio relativo di essere responder nel genotipo difficile rispetto ai pazienti con genotipo facile. Il secondo rapporto dei rischi relativi ha analogo significato sostituendo l'outcome da non responder a relapser. Entrambi hanno valore molto maggiore di 1, il che significa che il genotipo difficile ha maggior probabilità di esitare come non responder o come relapser rispetto al genotipo facile. I p-value entrambi significativi convalidano l'osservazione appena condotta (Tabella 2, voce «Genotipo difficile») come del resto già ampiamente noto in letteratura.

IL28B

I dati riportati in tabella 2 (voce «Polimorfismo *IL28B*») hanno tutti come base outcome (quindi come denominatore) la probabilità di essere responder per i pazienti con polimorfismo favorevole omozigote CC. Di conseguenza sono stati elaborati i rischi relativi per i pattern CT e TT di essere non responder e relapser, riportati a numeratore. Sulla base dei risultati ottenuti la predittività del polimorfismo di *IL28B* (rs12979860) si è rivelata significativa nel definire l'outcome nei non responder, mentre non si è dimostrato affidabile come marker predittivo di relapsing.

Il primo rapporto dei rischi relativi (RRR) è il rischio relativo di essere non responder in caso di pattern allelico CT rispetto ai soggetti con omozigosi CC, diviso per il rischio relativo di essere responder nel pattern CT, rispetto ai pazienti con polimorfismo CC. Il secondo RRR ha analogo significato sostituendo nell'analisi il pattern CT con quello TT. Entrambi hanno valore molto maggiore di 1, nello specifico dei CT si ha un rapporto pari a 6.63 mentre nel caso dei TT il rapporto è addirittura pari a 23. Quello che si evince è dunque che il pattern TT incida in modo più significativo di CT nel determinare outcome finale come non responder. Entrambi comunque (TT e CT) sono associati ad un rischio di essere non responder molto maggiore dei CC. Le affermazioni trovano conferma nel valore assunto dai p-value. Stesso significato anche per i successivi RRR dove all'outcome non responder si sostituisce quello di relapser. Il pattern allelico CT e l'omozigosi TT hanno maggior probabilità di esitare come relapser rispetto ai soggetti con omozigosi CC. Tuttavia i p-value non confermano l'osservazione perché sono entrambi >0.05 . In altre parole il polimorfismo di *IL28B* rs12979860 come marker di outcome si è rivelato utile solo nello scremare all'interno della popolazione di studio tra responder e non responder.

HIV

Nel caso riportato in tabella 2 alla voce «HIV+» il primo rapporto dei rischi relativi è il rischio relativo di essere non responder nei pazienti HIV-positivi rispetto ai pazienti HIV-negativi, diviso per il rischio relativo di essere responder, ancora degli HIV-positivi rispetto ai non infetti. Il secondo rapporto dei rischi relativi ha analogo significato sostituendo l'outcome non responder con relapser. Nel primo caso il valore del rapporto è >1 , il che significherebbe che la coinfezione aumenti il rischio di essere non responder. Tuttavia il p-value assume valore >0.05 , dunque l'osservazione non è statisticamente significativa. Il secondo rapporto significherebbe che i pazienti HIV-positivi abbiano minore probabilità di essere relapser degli HIV-negativi. Anche in questo caso il p-value grande invalida questa conclusione. Nello studio condotto sembra quindi che la coinfezione HCV ed HIV non abbia significato prognostico negativo.

HCV-RNA basale

Il rapporto dei rischi relativi in questo caso consiste nel rischio relativo di essere non responder associato ad un incremento unitario di HCV-RNA basale, diviso il rischio relativo di essere responder anch'esso associato ad un incremento unitario di HCV-RNA basale. Tale stima è maggiore di 1 nel caso dei pazienti non responder, sembrerebbe dunque che la carica virale basale abbia un effetto negativo sull'esito del trattamento qualora elevata. Tuttavia il p-value assume valore >0.05 , inficiando l'osservazione. Bisogna in ogni caso tenere in considerazione che il valore assunto dal p-value sia poco distante dalla soglia di significatività. Per i relapser, tenendo in considerazione il p-value molto grande, non si ha alcuna associazione tra esito e HCV-RNA basale (Tabella 3, «HCV-RNA basale»).

Transaminasi (AST/ALT)

Nella valutazione delle transaminasi si è proceduto analizzando i valori di AST e ALT separatamente, prima valutando il parametro come variabile continua, successivamente inserendo il cut-off di normalità <40 UI/l per entrambe. Dopo sono state analizzate in modo congiunto ossia si è fatta una distinzione tra transaminasi mosse (quando almeno uno dei due parametri assumeva valore ≥ 40 UI/l) e transaminasi normali (quando AST e ALT erano entrambe <40 UI/l).

I dati sono tutti riportati in tabella 2 alla voce «Transaminasi (AST/ALT)». Il primo RRR riportato in tabella consiste nel rischio relativo di essere non responder associato ad un incremento unitario del valore dell'ALT, diviso per il rischio relativo di essere responder anch'esso associato ad un incremento unitario dello stesso parametro. Tale stima è maggiore di 1, dunque il valore alto di ALT ha un effetto negativo sull'esito della patologia. Lo stesso effetto risulta se, invece della non responsività al trattamento, si considera il relapsing. Il valore di ALT dunque influisce negativamente sulla risposta alla terapia aumentando sia il rischio di essere non responder che il rischio di essere relapser, a conferma i valori dei p-value significativi in entrambi i casi.

Quanto osservato in seguito all'introduzione del cut-off di normalità è addirittura più importante della considerazione del valore delle ALT come variabile continua. Il RRR consiste nel rischio relativo di non responder associato al valore delle ALT ≥ 40 UI/l, diviso per il rischio relativo di responder anch'esso associato a pazienti con valore ≥ 40 UI/l. La stima è pari a 5.9, dunque il valore di ALT ≥ 40 UI/l ha un effetto negativo sull'esito della patologia. Lo stesso effetto risulta se, invece della non risposta al trattamento si considera il relapsing: la stima del rapporto dei rischi relativi è 3.8. Il valore di ALT ≥ 40 UI/l influisce dunque negativamente nella risposta alla terapia aumentando il rischio di essere non responder. Per i relapser il p-value è ai limiti della significatività ma comunque >0.05 .

Quanto osservato in precedenza con le ALT è sovrapponibile ai risultati ottenuti valutando le AST sia come variabile continua sia dopo l'introduzione del cut-off di normalità (anche in questo caso ≥ 40 UI/l). Nel caso delle AST addirittura accade che il titolo ≥ 40 UI/l incida ancor più significativamente delle ALT nel predire l'esito sia come non responder sia come relapser.

Per finire sono state prese in considerazione contemporaneamente AST ed ALT, dividendo la popolazione in soggetti con transaminasi normali (AST ed ALT <40 UI/l) e transaminasi mosse (AST ed ALT ≥ 40 UI/l). Anche in questo caso si sono notate associazioni statisticamente significative tra le transaminasi aumentate e gli esiti come non responder e relapser.

Sulla base dell'analisi statistica univariata finora discussa si è deciso di procedere con un'analisi statistica multivariata tenendo in considerazione i parametri che si sono mostrati statisticamente significativi (ossia tutti quei parametri per cui si è registrato un p-value <0.05). Il ragionamento sopra riportato declinato su ogni singolo parametro è applicabile anche all'analisi multivariata eseguita in seconda battuta, i cui dati sono riportati in tabella 3. Sono stati identificati come fattori di rischio indipendenti di essere non responder e relapser: il genotipo virale infettante, il polimorfismo di *IL28B* (rs12979860)

ed i valori delle transaminasi (AST e/o ALT \geq 40 UI/l). Nullo invece il valore ricoperto dall'HCV-RNA.

Discussione

In relazione ai risultati forniti dalle analisi uni- e multivariata si è approdati alla descrizione delle principali caratteristiche della popolazione di studio e si sono individuati i fattori di rischio il cui ruolo è statisticamente significativo. Si è confermato il ruolo del genotipo virale infettante e si è visto come l'*IL28B* possa effettivamente essere impiegato come marker d'outcome permettendo un'importante scrematura tra responder e non responder, minore affidabilità nel caso del relapsing. Il valore assunto dalle transaminasi (AST/ALT) è anch'esso importante nel predire la probabilità di risposta al trattamento.

Conclusioni

Puntare verso un migliore inquadramento del paziente potendone stimare le probabilità di risposta al trattamento in modo sempre più preciso è un obiettivo prioritario nella valutazione pre-terapeutica, permettendo un'ottimizzazione della casistica, una somministrazione farmacologica mirata con la riduzione di possibili effetti collaterali e un miglior utilizzo delle risorse economiche disponibili. I risultati confermano il ruolo del pattern allelico di *IL28B* (rs12979860) come marker d'outcome promuovendone l'applicazione in clinica, congiuntamente alla valutazione di altri parametri.

Tabelle e figure

Tabella 1. Analisi di alcuni parametri presi in considerazione nella popolazione di studio.

	<i>Popolazione tot.</i>	<i>Non trattati</i>	<i>Trattati</i>	<i>p-value</i>
<i>Genotipo facile (N (%))</i>	85 (32.82%)	23 (24.21%)	62 (37.8%)	0.028185
<i>logHCV (media e sd)</i>	12.89 (2.16)	12.64 (2.28)	13.04 (2.07)	0.1508517
<i>Omozigosi CC (N (%))</i>	83 (32.05%)	30 (31.58%)	53 (32.32%)	
<i>Eterozigosi CT (N (%))</i>	137 (52.9%)	51 (53.68%)	86 (52.44%)	
<i>Omozigosi TT (N (%))</i>	39 (15.06%)	14 (14.74%)	25 (15.24%)	

Tabella 2. Analisi dei singoli parametri di ipotetica rilevanza nella determinazione dell'outcome terapeutico e valutazione dei relativi RRR, errore standard e p-value.

		RRR	Errore standard	p-value	
Età (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	1.003291	0.0195575	0.866	
	<i>Relapser</i>	1.028453	0.0231017	0.212	
Sesso femminile (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	0.7071429	0.323867	0.449	
	<i>Relapser</i>	0.65625	0.3440162	0.422	
Genotipo HCV difficile (genotipo 1 e 4) (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	9.84127	5.128272	<0.0001	
	<i>Relapser</i>	3.608466	1.75463	0.008	
Polimorfismo IL28B (base outcome responder)	<i>Non responder, TT</i>	6.634615	4.009818	0.002	
	<i>Non responder, CT</i>	23	19.38212	<0.0001	
	<i>Relapser, TT</i>	1.67094	0.8385963	0.306	
	<i>Relapser, CT</i>	4.259259	3.532677	0.081	
HIV+ (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	1.592105	0.6565496	0.259	
	<i>Relapser</i>	0.9552632	0.4519553	0.923	
HCV-RNA basale (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	1.239808	0.1476163	0.071	
	<i>Relapser</i>	0.9826491	0.1102024	0.876	
Transaminasi (ALT e AST)	ALT (variabile continua) (base outcome responder)	<i>Non responder:</i>	1.085198	0.0276628	0.001
		<i>Relapser</i>	1.070548	0.0276567	0.008
	ALT ≥40 UI/l (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	5.90625	3.807927	0.006
		<i>Relapser</i>	3.818182	2.736143	0.062
	AST (variabile continua) (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	5.90625	3.807927	0.006
		<i>Relapser</i>	3.818182	2.736143	0.062
	AST ≥40 UI/l (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	1.071541	0.0185749	<0.0001
		<i>Relapser</i>	1.061045	0.0185765	0.001
ALT e/o AST ≥40 UI/l (base outcome responder)	<i>Non responder</i>	7.666667	4.226378	<0.0001	
	<i>Relapser</i>	5.777778	3.457859	0.003	

Tabella 3. Analisi multivariata.

		RRR	Errore standard	p-value
Non responder (base outcome responder)	<i>Genotipo facile</i>	0.0419276	0.0336459	<0.0001
	<i>IL28B</i>	12.76448	8.085249	<0.0001
	<i>HCV-RNA basale</i>	1.34135	0.2777974	0.156
	<i>ALT e/o AST ≥40 UI/l</i>	33.37287	0.1544732	<0.0001
Relapser (base outcome responder)	<i>Genotipo facile</i>	0.156168	0.1070106	0.007
	<i>IL28B</i>	4.022592	2.297435	0.015
	<i>HCV-RNA basale</i>	0.9591345	0.1671869	0.811
	<i>ALT e/o AST ≥40 UI/l</i>	16.0838	12.68116	<0.0001

Bibliografia

1. URL:<<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/>>.
2. National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C. 2002.
3. Tanaka Y, Nishida N, Suqiyama M et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Gen* 2009;41(10):1005-1109.
4. Halfon P, Bourliere M, Ouzan D et al. A single IL28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23(10):931-935.

5. Chin JL, Nicholas RM, Russell J et al. Spontaneous clearance of hepatitis C infection after liver transplantation from IL28B rs12979860 CC donors. *Eur J Gastroenterology Hepatol* 2012;24(9):1110-1112.
6. EASL (European Association for the Study of the Liver). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 2014;60(5):392-420.
7. Dieterich DT, Rizzetto M, Manns MP. Management of Chronic Hepatitis C Patients Who have Relapsed or Not Responded to Pegylated Interferon Alfa Plus Ribavirin. *Journal of Viral Hepatitis* 2009;16(12):833-843.
8. Dusheiko G. Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3):112-121.
9. Neukam K, Caruz A, Rivero-Juárez A et al. Variations at multiple genes improve interleukin 28B genotype predictive capacity for response to therapy against hepatitis C infection. *AIDS* 2013;27(17):2715-2724.
10. Matró E, González V, Buckton AJ et al. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *J Clin Microbiol* 2008;46(1):192-197.
11. Cook L, Diem K, Kim W et al. Allele-Specific PCR for Determination of IL28B Genotype. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;50(12):4144-4146.