

Determinazione e utilizzo clinico di autoanticorpi e/o di profili autoanticorpali nelle malattie epatiche autoimmuni – aggiornamento 2021

Chiara Bonaguri¹, Alessandra Melegari², Annalisa Russo¹, Alessandra Picanza¹, Roberta Minerba¹, Elena De Santis², Tommaso Trenti³ – per il Gruppo di Studio SIBioC Autoimmunità

¹SSUO Diagnostica delle Malattie Autoimmuni - UOC Diagnostica Ematochimica; Azienda Ospedaliero Universitaria, Parma

²SSUO Diagnostica delle Patologie Autoimmuni - Dipartimento Integrato Aziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda USL di Modena, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

³Dipartimento Integrato Aziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda USL di Modena, Nuovo Ospedale S. Agostino Estense

ABSTRACT

Description and clinical use of autoantibody determination in autoimmune liver diseases – update 2021, on behalf of the Study Group “Autoimmune Diseases” of the Italian Society of Clinical Biochemistry.

The autoantibody assessment in the field of autoimmune liver disease is crucial both for diagnosis and prognosis. Although these autoantibodies are sometime present even in the normal healthy individuals, their presence is a prerequisite to diagnose autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cholangitis (PBC); some of these autoantibodies are included in the diagnostic scoring system for these diseases. The laboratory diagnostics of autoimmune liver diseases, traditionally carried out using indirect immunofluorescence testing (IFT) on rodent tissue slices, has achieved substantial improvements due to innovative analytical opportunities, such as ELISA-based diagnostic assay and Multiple Immunodot Liver profile test based on recombinant or purified antigens. The aim of this document is to highlight the crucial role of the new antigen specific tests for a better diagnostic strategy in the field of the three major autoimmune liver diseases AIH, PBC and Primary sclerosing cholangitis (PSC).

Parole chiave: epatite autoimmune, colangite biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva

INTRODUZIONE

La ricerca e determinazione di autoanticorpi nel siero è un parametro di fondamentale importanza per la diagnosi e il trattamento di pazienti affetti da malattie autoimmuni (1).

A tutt'oggi sempre più numerose sono le malattie per le quali si sia accertata o anche solamente ipotizzata una patogenesi legata ad anomalie del sistema immuno-competente e che risultano caratterizzate spesso dalla presenza in circolo di autoanticorpi, cioè di immunoglobuline dirette contro sostanze “self” rappresentate da costituenti dell'organismo stesso.

La disponibilità di accertamenti diagnostici sierologici

consistenti nella determinazione di un pannello di autoanticorpi sempre più specifici e sensibili ha permesso al laboratorio clinico di giocare un ruolo centrale e insostituibile nella diagnosi e prognosi delle malattie autoimmuni, in quanto la Medicina di Laboratorio è l'unica disciplina che considera l'autoimmunità nella sua interezza e globalità, mentre, nei diversi ambiti clinici, essa appare frammentata per organo o specialità (2,3,4).

Le malattie epatiche autoimmuni, ben rappresentano la ineludibile complessità diagnostica e le nuove promettenti prospettive che, nell'ambito della Medicina di Laboratorio, interessano la disciplina dell'autoimmunità. In altri termini questo ambito diagnostico è emblematico

Corrispondenza a: Alessandra Melegari, SSUO Diagnostica delle Patologie Autoimmuni – Dipartimento Integrato Aziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda USL di Modena Nuovo Ospedale S. Agostino Estense, E-mail a.melegari@ausl.mo.it

Ricevuto: 27.09.2021

Revisionato: 13.10.2021

Accettato: 10.11.2021

Publicato on-line: 01.12.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.071

di quanta discussione, attività di comparazione, e di governo sia stata e sia ancora necessaria e di come il laboratorio ne costituisca lo specchio riflettente. Ne sono prova i moltissimi cambiamenti e l'affinamento nei recenti anni della propria capacità di diagnosi in stretta collaborazione con la ricerca scientifica e la innovazione tecnologica.

In questi anni, infatti, esami molecolari basati sull'utilizzo di antigeni purificati o ricombinanti e nuove strategie/soluzioni diagnostiche in parte automatizzate si sono affiancati alle tradizionali metodiche in immunofluorescenza e sono al momento oggetto di diversi protocolli di studio (5).

MALATTIE EPATICHE AUTOIMMUNI E PROFILI AUTOANTICORPALI CORRELATI

Le malattie autoimmuni del fegato sono un gruppo eterogeneo di patologie immunomediate caratterizzate da un'aggressione autoimmune nei confronti degli epatociti o dei colangiociti e si possono classificare in tre grandi entità: Epatite Autoimmune (EAI), Colangite Biliare Primitiva (CBP) e Colangite Sclerosante Primitiva (CSP). Queste patologie riconoscono al loro interno alcune varianti come le sindromi da sovrapposizione o "overlap" dove è presente in vario grado sia una componente colestatica che una componente infiammatoria. Fondamentale ai fini della diagnosi differenziale e delle conseguenti scelte terapeutiche è la distinzione fra danno epatocellulare e danno colestatico e la diagnostica anticorpale è, a questo livello, uno strumento essenziale per una corretta classificazione delle differenti entità nosologiche (5).

Benché la maggior parte di questi autoanticorpi non siano patologia-specifici, la loro determinazione è un prerequisito per la diagnosi di EAI e di CBP essendo parte integrante del sistema di score diagnostico delle medesime (5-8). Nella CSP, invece, gli autoanticorpi sono frequentemente presenti, ma rivestono un ruolo minore ai fini diagnostici.

Relativamente ai metodi di determinazione dei differenti autoanticorpi correlati alle epatopatie autoimmuni, in generale si può affermare che in Europa lo screening per questi marcatori viene tradizionalmente condotto utilizzando metodi in immunofluorescenza indiretta (IIF) su sezioni di tessuti murini e i titoli anticorpali sono inseriti negli score diagnostici. Invece, in altri Paesi (ad esempio negli Stati Uniti) i sistemi diagnostici in fase solida, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Immunoblotting prevalentemente, sono diffusamente utilizzati, anche se non è ancora chiaro come traslare i relativi risultati negli score diagnostici (5).

Epatite Autoimmune

L'EAI è un'infiammazione cronica del fegato ad eziologia sconosciuta, nella quale viene persa la tolleranza verso l'epatocita. I meccanismi alla base del danno epatico sono rappresentati da citotossicità cellulo-mediata e da citotossicità diretta (7).

La malattia colpisce soprattutto le donne, sia in età pediatrica che in età adulta, e si può associare ad altri quadri autoimmuni (colite ulcerosa, tiroiditi autoimmuni, colangite biliare primitiva e colangite sclerosante primitiva) (9).

La diagnosi di EAI è basata sul rilievo di elementi caratteristici che non sono, però, malattia-specifici e sull'esclusione di altre malattie epatiche, quali l'epatite virale. Il riscontro di autoanticorpi malattia-associati supporta la diagnosi di EAI (7,9,10).

Inoltre, si è soliti classificare le EAI in tipo 1 e tipo 2 sulla base del riscontro di specifici autoanticorpi (10).

Le EAI di tipo 1 esprimono tipicamente anticorpi anti-nucleo (ANA) e anti-muscolo liscio (ASMA). Circa il 50-75% di pazienti affetti da EAI sono ANA positivi e i pattern ANA più frequentemente osservati sono il pattern omogeneo e quello "speckled". Gli ASMA non sono patologia-specifici, in quanto possono essere osservati in differenti epatopatie non autoimmuni, e sono presenti in circa il 50% di pazienti con EAI di tipo I. A livello molecolare gli ASMA sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi che mostrano reattività per actina, tubulina e filamenti intermedi.

Le EAI di tipo 2 (circa il 5%-10% di tutte le EAI) si manifestano di preferenza in età giovanile/pediatrica e presentano abitualmente gli anticorpi anti-LKM1 (liver-kidney microsomal antibodies) e più raramente anticorpi anti-LKM3. L'autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti-LKM1 è il citocromo P450 (CYP). Gli anti-LKM3 non sono specifici per EAI e possono essere rilevati anche in pazienti affetti da epatite virale cronica C (HCV). È opportuno che la positività per anti-LKM1 sia sempre confermata da un esame in fase solida (ELISA o Immunoblotting).

Altri anticorpi riscontrati nelle EAI sono gli anticorpi anti-SLA (soluble liver antigens), anti-LP (liver-pancreas), anti-ASGPR (asiolo-glicoproteina) e anti-LC1 (citosol epatico di tipo 1) (7).

La positività per ANA, ASMA, LKM1 e SLA rientra nei criteri diagnostici delle EAI (7).

Colangite Biliare Primitiva

La CBP è un'epatopatia colestatica cronica, relativamente rara, ad evoluzione lenta e ad eziologia autoimmune caratterizzata da un'aggressione dei linfociti T nei confronti delle cellule dei dotti biliari intraepatici; il conseguente danneggiamento rende difficoltoso il drenaggio della bile dal fegato all'intestino, causandone, quindi, un ristagno nel fegato ed esitando in un tempo variabile in una insufficienza epatica (11).

I pazienti affetti da CBP sono principalmente femmine (90%), solitamente diagnosticate nella quinta o sesta decade di vita. È stato suggerito che la suscettibilità genetica costituisca un fattore di predisposizione alla CBP, mentre fattori ambientali quali infezioni, sostanze chimiche e fumo possono avere un ruolo causale.

Il decorso della malattia è variabile e una diagnosi accurata nei primi stadi è un elemento cruciale in quanto

un trattamento farmacologico precoce può rallentare l'evoluzione verso l'insufficienza epatica e migliorare la sopravvivenza (11,12).

La diagnosi si basa sulla combinazione di caratteristiche cliniche/istologiche, anomalie del profilo biochimico epatico in un quadro di colestasi persistente per più di sei mesi e presenza nel siero di anticorpi anti-mitocondrio (AMA) e/o di specifici ANA (8,13,14).

Gli AMA vengono rilevati circa nel 90% dei pazienti affetti da CBP e la elevata sensibilità e specificità che li caratterizza fa sì che la loro presenza rappresenti uno dei tre criteri diagnostici della CBP. Gli AMA, in realtà, sono un gruppo eterogeneo di anticorpi e sono diretti con diverse percentuali di frequenza contro diversi autoantigeni che fanno parte del complesso strutturale dell'enzima 2-ossiacido deidrogenasi, precisamente le sub unità E2 dell'enzima piruvato deidrogenasi (PDC-E2 - frequenza 90%), del complesso ossiglutarico deidrogenasi (OGDC-E2 - frequenza 50%) e del "branched-chain" chetoacido deidrogenasi (BCOAD-E2 - frequenza 50%) (15).

Gli AMA possono essere riscontrati nel siero di pazienti asintomatici con normale assetto enzimatico epatico; studi di monitoraggio hanno dimostrato che nel tempo la maggior parte di questi soggetti sviluppa CBP.

Per molto tempo l'esame in IIF su sezioni criostatate di fegato, rene e stomaco di ratto è stato considerato il gold standard per lo screening routinario degli AMA. Negli ultimi anni, da un lato le limitazioni presentate da questo esame (complesso come esecuzione, difficilmente standardizzabile, non completamente automatizzabile, operatore-dipendente nella interpretazione), dall'altro l'identificazione dei target molecolari degli AMA hanno portato allo sviluppo, alla validazione e alla introduzione nella diagnostica di laboratorio di esami molecolari antigeni-specifici che utilizzano la tecnica degli immunodosaggi ELISA o degli Immunoblotting (16,17).

I promettenti risultati ottenuti con test ELISA di ultima generazione che utilizzano l'antigene MIT3 (PDC-E2, OGDC-E2 e BCOAD-E2), capaci di rilevare positività in circa la metà dei pazienti AMA IIF negativi, suggeriscono di usare, al posto o in affiancamento dell'IIF, questi esami per la ricerca degli AMA, in particolare quando il laboratorio di area non abbia familiarità con l'uso e l'interpretazione in IIF (18).

Anche le determinazioni in Immunoblotting rappresentano una interessante alternativa diagnostica al test AMA in IIF in quanto questo test multiplex consente il simultaneo rilievo di differenti autoanticorpi specifici per la CBP utilizzando antigeni ricombinanti (16).

In aggiunta agli AMA, anche gli ANA, solitamente associati a malattie reumatiche autoimmuni, sono di frequente riscontrati nei pazienti affetti da CBP. Al momento, il metodo ritenuto il gold standard per la determinazione degli ANA è la IIF utilizzando come substrato le Human Epithelial Cells-2 (HEp-2) (19).

ANA specifici per la CBP sono stati rilevati da vari

Autori nel 30%-50% dei pazienti; sono stati descritti per questi autoanticorpi due diversi pattern di fluorescenza: rime-like/membranous (specificità per le proteine gp210 e Nucleoporina p62) e Multiple Nuclear Dots (specificità per le proteine sp100, promyelocytic leukaemia (PML) e small ubiquitin-like modifier) (19). Il riscontro di questi anticorpi, caratterizzati per altro da una bassa sensibilità, consente di confermare la diagnosi di CBP nei pazienti AMA negativi, frequentemente passibili di classificazione scorretta. Esistono, inoltre, alcune evidenze che la presenza di ANA CBP specifici, particolarmente anti-gp210, sia associata ad una peggior prognosi e ad una malattia più aggressiva (20,21). Infine, come per gli AMA, anche per gli ANA CBP specifici i nuovi test in fase solida (ELISA e Immunoblotting), specialmente quelli che utilizzano antigeni ricombinanti, quali il MIT3, appaiono più sensibili ed obiettivi della IIF.

A tale proposito, i risultati di un recente studio multicentrico condotto in Emilia-Romagna dal Gruppo di Studio SIBioC di Autoimmunità e che ha valutato, su 165 pazienti affetti da CBP, l'utilizzo combinato di nuovi test antigene-specifici e di test convenzionali in IIF (16,17), indicano come l'adozione di un profilo che comprenda sia i nuovi test in fase solida che i test in IIF possa effettivamente migliorare la sensibilità diagnostica per la CBP migliorando l'efficacia del percorso clinico, come recentemente riportato anche per le malattie reumatiche autoimmuni (22).

Altri ANA non specifici per la CBP, principalmente anticorpi anti-centromero e anti-SSA/Ro – 52 kDa, sono spesso rilevati (10%-30%) nei pazienti affetti da CBP, conferendo, secondo alcuni Autori, caratteristiche prognostiche sfavorevoli al decorso della malattia, quali un'accresciuta ipertensione portale. Questo dato correla con l'osservazione della associazione della CBP con altre malattie autoimmuni, come la sclerodermia, la sindrome di Sjogren e la Sindrome di CREST (calcinosis, Raynaud phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia) (19).

Infine, è interessante segnalare nuovi marcatori al momento allo studio per la diagnostica di laboratorio della CBP, precisamente due nuovi auto-antigeni (Kelch-like 12 e Hexokinase 1), marcatori genetici, particolari profili metabolici, micro RNA e fattori epigenetici (23).

Relativamente alla CBP, ci sembra di interesse notare come la accresciuta conoscenza delle associazioni sierologiche della malattia, unitamente al diffuso utilizzo di esami non invasivi come quelli di laboratorio, abbia significativamente modificato negli ultimi anni le potenzialità diagnostiche, consentendo di giungere spesso ad una diagnosi precoce rispetto al rilievo di una malattia epatica avanzata.

Colangite Sclerosante Primitiva

La CSP è una sindrome colestatica cronica caratterizzata da una fibrosi infiammatoria dei dotti biliari intra ed extra epatici.

La CSP interessa in genere maschi di giovane età ed è comunemente associata alle malattie infiammatorie

dell'intestino, specialmente la colite ulcerosa (CU).

Dal punto di vista della diagnostica di laboratorio, la maggior parte dei pazienti presenta un'elevazione della fosfatasi alcalina sierica e della γ GT che può essere accompagnata da un modesto aumento delle transaminasi; diversamente dalla CBP, nella CSP la ricerca degli anticorpi anti-mitocondrio è negativa. Utile alla diagnosi si è rilevata la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilii (ANCA) con un quadro pANCA in etanolo, marcatore autoanticorpale presente anche in una percentuale elevata di pazienti affetti da CU (circa 80%). Per la loro scarsa specificità, il rilievo di p-ANCA può supportare la diagnosi di CSP solo in pazienti selezionati (24).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

In sintesi, la diagnostica di laboratorio delle malattie autoimmuni epatiche, sia in termini di diagnosi differenziale che di diagnosi precoce, ha registrato negli ultimi anni importanti progressi e, senza dubbio, la prospettiva è aperta verso nuovi sviluppi. In questo ambito, una tematica che potrebbe essere di grande interesse nel prossimo futuro è il miglioramento nella standardizzazione dei metodi e la definizione di nuovi algoritmi diagnostici (23).

Al momento, il rilievo di specifici profili autoanticorpali è essenziale, tra le epatopatie autoimmuni, per la diagnosi di EAI e di CBP, mentre la diagnosi di CSP si basa essenzialmente sul quadro fornito dalla colangiopancreatografia retrograda endoscopica (5,6). Il valore cruciale degli autoanticorpi per la diagnostica differenziale di EAI e di CBP si esplica nelle conseguenti scelte terapeutiche.

Tuttavia, va comunque considerato che il mancato rilievo di autoanticorpi non esclude la presenza di una epatopatia autoimmune, per esempio una CBP AMA negativa.

In questo ambito diagnostico, in prospettiva la percentuale di pazienti negativi per gli AMA, che

rappresentano ancora il marcatore immunologico chiave per CBP, verrà significativamente ridotta dall'uso di nuovi esami di laboratorio antigenici specifici (esami in ELISA e in Immunoblotting) basati sull'utilizzo di antigeni ricombinanti (16,17).

Inoltre, la maggior diffusione di sistemi diagnostici automatizzati comprendenti un pannello completo degli auto-antigeni CBP correlati, inclusi i target antigenici nucleari gp210 e sp100, contribuirà alla ottimizzazione di nuovi algoritmi diagnostici.

La realizzazione di ulteriori studi multicentrici che valutino pazienti affetti da CBP di nuova diagnosi potrà effettivamente consentire di valutare questi nuovi strumenti analitici nella diagnostica di screening e differenziale della CBP. I risultati di questi studi potranno contribuire a ridisegnare l'intero processo diagnostico partendo dalla formulazione di un ragionevole sospetto clinico al momento della richiesta degli esami di laboratorio, con la possibilità di ricercare gli autoanticorpi più appropriati e assicurando, attraverso l'implementazione condivisa di algoritmi comuni, un'armonizzazione fra i diversi laboratori.

La scelta del miglior esame o profilo di esami da utilizzare dipende, a nostro avviso, da molti fattori che includono: la competenza dei professionisti, le tecnologie disponibili in laboratorio, la prevalenza nell'area esaminata di autoanticorpi associati alla epatopatia autoimmune e la disponibilità economica (16,22).

In questo nuovo scenario, come per altre patologie autoimmuni, il governo clinico e la standardizzazione dei metodi, risulteranno per le malattie epatiche autoimmuni due elementi imprescindibili per valorizzare le potenzialità dei marcatori autoanticorpali sia in ambito diagnostico che prognostico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

Tabella Sinottica delle principali indicazioni

	Epatopatie autoimmuni e autoanticorpi correlati									
	ASMA	Anti-LKM1	Anti-LKM3	Anti-SLA	Anti-LC1	AMA	ANA	Anti-sp100	Anti-gp210	P-ANCA
EAI Tipo 1	● ●			●						
EAI Tipo 2		● ●	●	●	●					
CBP						● ●	●	●	●	
CSP										●

EAI Tipo 1, Epatite Autoimmune Tipo 1; EAI Tipo 2, Epatite Autoimmune Tipo 2; CBP, Colangite Biliare Primitiva; CSP, Colangite Sclerosante Primitiva; ASMA, anti-muscolo liscio; Anti-LKM1, liver-kidney microsomal antibodies; Anti-LKM3, liver-kidney microsomal antibodies; Anti-SLA, soluble liver antigens; Anti-LC1, citosol epatico di tipo 1; AMA, anticorpi anti-mitocondrio; ANA, anticorpi anti-nucleo; anti-sp-100, anticorpi anti proteina granulare nucleare (specificità per sp100); anti gp210, anticorpi anti glicoproteina della membrana nucleare (specificità per 210) P-ANCA, anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilii;

- ● Riscontro frequente ($\geq 50\%$ dei casi)
- Riscontro meno frequente ($< 50\%$ dei casi)

BIBLIOGRAFIA

1. Bonaguri C, Melegari A, Ballabio A, et al. Italian multicentre study for application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing for autoimmune rheumatic disease: conclusive results. *Autoimmun Rev* 2011;11:1-5.
2. Melegari A, Bonaguri C, Russo A, et al. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimm Rev* 2012;11:713-6.
3. Tozzoli R, Bonaguri C, Melegari A, et al. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:129-38.
4. Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Autoimmune diagnostics: the technology, the strategy and the clinical governance. *Immunol Res* 2015;61:126-34.
5. Sebode M, Weiler-Normann C, Liwinski T, et al. Autoantibodies in autoimmune liver disease – Clinical and diagnostic relevance. *Front Immunol* 2018;9:609.
6. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. The clinical usage and definition of autoantibodies in immune-mediated liver disease: a comprehensive overview. *J Autoimmun* 2018;95:144-58.
7. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2015;63:971-1004.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 2017;67:145-72.
9. Strassburg LP. Autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;5:667-82.
10. Manns MP, Lohse AW, Vergani D, et al. Autoimmune hepatitis – update 2015. *J Hepatol* 2015; Suppl 1:100-11. 62.
11. Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:291-308.
12. Floreani A, Caroli D, Variola A, et al. A 35 year follow-up of a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis seen at a single centre. *Liver Int* 2011;31:361-8.
13. Hirschfield GM, Dyson JK, Alexander GJM, et al. The British Society of Gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines. *Gut* 2018;67:65-74.
14. Tanaka A, Leung PSC, Gershwin ME. Evolution of our understanding of PBC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2018;34-35:3-9.
15. Gershwin ME, Makay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1987;138:3525-31.
16. Villalta D, Sorrentino C, Girolami E, et al. Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplex line-blot assay. *Clin Chim Acta* 2015;438:135-8.
17. Gatselis NK, Dalekos GN. Molecular diagnostic testing for primary biliary cholangitis. *Expert Rev Mol Diagn* 2016;9:1001-10.
18. Gabeta S, Norman GL, Liaskos C, et al. Diagnostic relevance and clinical significance of the new enhanced performance M2 (MIT3) ELISA for the detection of IgA and IgG antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 2007;27:378-87.
19. Granito A, Muratori P, Quarneti C, et al. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12:65-74.
20. Nakamura M, Komori A, Ito M, et al. Predictive role of anti-gp210 and anticentromere antibodies in long-term outcome in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2007;37:5412-9.
21. Huang C, Han W, Wang C, et al. Early prognostic utility of gp210 antibody-positive rate in primary biliary cholangitis: a meta-analysis. *Dis Markers* 2019; 2019:9121207.
22. Bonaguri C, Melegari A, Picanza A, et al. Association of solid-phase assays to the indirect immunofluorescence in primary biliary cholangitis diagnosis: Results of an Italian multicenter study. *Autoimm Rev* 2019;18:102389.
23. Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, et al. Primary biliary cholangitis: 2018 practice guidance from the American Association for the study of liver disease. *Hepatology* 2019;114:48-63.
24. Chapman MH, Thorburn D, Hirschfield GM, et al. British Society of Gastroenterology and UK-PSC guidelines for the diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2019;68:1356-78.