

RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

Linee guida SIPMeL per la determinazione degli autoanticorpi nella diagnosi delle malattie autoimmuni del fegato

Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine guidelines on the use of autoantibody tests in the diagnosis of liver autoimmune diseases

Maria C. SORRENTINO ¹, Teresa CARBONE ², Luigi CINQUANTA ³, Maria G. ALESSIO ⁴, Maria INFANTINO ⁵, Gaia DELEONARDI ⁶, Maria T. TREVISAN ⁷, Brunetta PORCELLI ⁸, Lucia TERZUOLI ^{8,9}, Stefan PLATZGUMMER ¹⁰, Ignazio BRUSCA ¹¹, Antonio ANTICO ¹², Marilina TAMPOIA ¹³, Giampaola PESCE ^{14,15}, Danilo VILLALTA ¹⁶, Nicola BIZZARO ¹⁷ * a nome del GdS-AI SIPMeL

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Biotecnologie Avanzate, Laboratorio di Patologia Clinica, Microbiologia e Virologia, ISMETT, Palermo, Italia; ²Laboratorio di Immunopatologia, Azienda Ospedaliera Regionale San Carlo, Potenza, Italia; ³IRCCS SYNLAB SDN, Pagani, Salerno, Italia; ⁴Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italia; ⁵Laboratorio Immunologia Allergologia, Ospedale San Giovanni di Dio, Firenze, Italia; ⁶Laboratorio Unico Metropolitano, Ospedale Maggiore, AUSL Bologna, Bologna, Italia; ⁷Laboratorio, Ospedale G. Fracastoro, Verona, Italia; ⁸Dipartimento Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia; ⁹Laboratorio Patologia Clinica, Policlinico S. Maria alle Scotte, AOU Senese, Siena, Italia; ¹⁰Laboratorio Centrale, Ospedale Civile, Merano, Italia; ¹¹Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale Buccheri La Ferla, Palermo, Italia; ¹²Laboratorio Analisi, Ospedale Ca' Foncello, Treviso, Italia; ¹³Dipartimento di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero SS. Annunziata, Taranto, Italia; ¹⁴Laboratorio Diagnostico di Autoimmunologia, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italia; ¹⁵Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche (DIMI), Università di Genova, Genova, Italia; ¹⁶Immunologia e Allergologia, Presidio Ospedaliero S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italia; ¹⁷Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Udine, Italia

*Autore di contatto: Nicola Bizzaro, Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Udine, Italia.
E-mail: nic.bizzaro@gmail.com

RIASSUNTO

Le malattie autoimmuni del fegato sono considerate malattie rare, anche se la loro frequenza risulta in aumento grazie all'introduzione di nuovi test diagnostici e al miglioramento delle tecnologie analitiche. Nella pratica clinica, i pazienti affetti da epatopatia ad eziologia non nota, dopo diagnosi differenziale utile ad escludere altre possibili cause di danno epatico, devono essere indagati per la possibile natura autoimmune dell'epatopatia con un pannello di autoanticorpi specifici. In questo contesto, il laboratorio riveste un ruolo fondamentale in quanto il riscontro di ben definite positività autoanticorpali è essenziale per la diagnosi e la classificazione delle patologie autoimmuni del fegato. Già nel 2009 il Gruppo di Studio in Autoimmunologia (GdS-AI) della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) aveva elaborato delle raccomandazioni per fornire un approccio

razionale a questa diagnostica. A distanza di 14 anni, il GdS-AI ha ritenuto opportuno rivedere e integrare le raccomandazioni per l'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni del fegato. Questa revisione fornisce non solo una sintesi sullo stato dell'arte dei test e sulle metodologie analitiche disponibili per la diagnosi e il monitoraggio delle epatopatie autoimmuni, ma anche raccomandazioni che riguardano l'appropriatezza della richiesta dei test e l'interpretazione dei risultati. Le linee guida sono state elaborate dopo revisione sistematica della più recente letteratura scientifica e constano di 20 raccomandazioni suddivise per l'epatite autoimmune, la colangite biliare primitiva e la colangite sclerosante primitiva. La forza delle raccomandazioni e il livello della qualità delle evidenze sono valutate secondo il metodo GRADE, allo scopo di applicare un metodo rigoroso e trasparente per la produzione di raccomandazioni diagnostiche efficaci ed efficienti.

(Per citare questo articolo: Sorrentino MC, Carbone T, Cinquanta L, Alessio MG, Infantino M, Deleonardi G, *et al.*; GdS-AI SIPMeL. Linee guida SIPMeL per la determinazione degli autoanticorpi nella diagnosi delle malattie autoimmuni del fegato. Riv Ital Med Lab 2024;20:000-000. Riv Ital Med Lab 2024;20:31-55. DOI: 10.23736/S1825-859X.24.00226-3)

ABSTRACT

Autoimmune diseases of the liver are classified as rare diseases, but increasing frequency is becoming apparent due to advance in technologies for autoantibody detection. In clinical practice, the diagnosis of autoimmune liver disorders requires exclusion of other causes of chronic liver disease. In this context, laboratory contribution relies on the detection of disease-specific autoantibodies, playing a pivotal role in diagnosis and classification of autoimmune liver diseases. The present guidelines, promoted by the Study Group on Autoimmunology (GdS-AI) of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL), aim to revise and update the 2009 GdS-AI guidelines in order to provide recommendations taking into account new developments in autoantibody tests as well as the appropriateness in test request and the accurate interpretation of laboratory findings. The guidelines are based on consensus of experts in the field and are hierarchically organized in 20 recommendations for AIH, PBC and PSC laboratory diagnosis. To evaluate the strength of recommendations together with the quality of evidence, rigorous methodology based on the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) approach was applied, leading to an improving efficacy and efficiency of diagnostic recommendations.

Key words: Autoantibodies; Hepatitis, autoimmune; Liver cirrhosis, biliary; Cholangitis, sclerosing; Guideline.

Introduzione

Le epatopatie autoimmuni sono rappresentate dalla epatite autoimmune (*autoimmune hepatitis*, AIH), dalla colangite biliare primitiva (*primary biliary cholangitis*, PBC, precedentemente denominata cirrosi biliare primitiva), dalla colangite sclerosante primitiva (*primary sclerosing cholangitis*, PSC) e dalle forme di sovrapposizione o sindromi *overlap* (SO), nelle quali i pazienti presentano caratteristiche di associazione tra patologie che possono manifestarsi sia contemporaneamente che in tempi diversi. Le epatopatie autoimmuni sono caratterizzate da infiammazione acuta o più frequentemente cronica degli epatociti o delle vie biliari, non determinata da processi infettivi. Se non identificate e non trattate precocemente, queste patologie progrediscono verso la fibrosi e la cirrosi epatica e possono condurre il paziente a insufficienza d'organo fino a necessità di trapianto o, in alcuni casi, a tumori. Il laboratorio riveste un ruolo fondamentale nella diagnosi dell'AIH e della PBC, mentre il suo ruolo è decisamente più limitato nella PSC, in quanto l'unico anticorpo attualmente ritenuto associato (P-ANCA atipico) non è specifico della patologia. Numerosi sono gli autoanticorpi

implicati nella AIH e nella PBC e varie le piattaforme analitiche oggi disponibili per la loro ricerca. Al fine di fornire un valido supporto per la diagnosi e la prognosi di queste patologie, è necessaria un'attenta valutazione dei metodi disponibili per la ricerca degli autoanticorpi, con particolare attenzione alla standardizzazione dei metodi analitici. Per questi motivi è utile poter disporre di raccomandazioni aggiornate per l'uso appropriato dei vari test che tengano conto delle evidenze scientifiche, della loro qualità e della loro forza, ossia la capacità di produrre con la loro applicazione effetti sull'esito clinico del paziente. Risulta altresì fondamentale considerare i vari aspetti che, all'interno del governo clinico del paziente, riguardano il percorso del campione biologico in laboratorio, fino all'elaborazione di un referto che dia chiare informazioni al clinico e al paziente. Il Gruppo di Studio in Autoimmunologia (GdS-AI) della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) nella *consensus conference* sulla diagnostica delle epatopatie autoimmuni tenutasi nel febbraio del 2009, aveva già prodotto evidenze e raccomandazioni, sintetizzate graficamente in un algoritmo diagnostico che descriveva la sequenza razionale di richiesta dei test autoanticorpali implicati in queste patologie.¹ Le

raccomandazioni così prodotte coincidevano con quanto indicato dalle linee guida di pratica clinica proposte dall'*American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD).² Il continuo sviluppo tecnologico, la scoperta di nuovi biomarcatori, la necessità di appropriatezza e di standardizzazione in fase di diagnosi e di refertazione, nonché la frequente discrepanza tra le raccomandazioni delle linee guida e la pratica di laboratorio, hanno indotto il GdS-AI a procedere ad una revisione sistematica delle ultime evidenze presenti in letteratura sull'argomento, utilizzando l'approccio metodologico delle linee guida e tenendo conto delle opinioni di esperti. Obiettivo del GdS-AI è fornire un documento che contenga le indicazioni per una aggiornata e appropriata strategia nella ricerca degli autoanticorpi per la diagnosi e il monitoraggio delle epatopatie autoimmuni.

Approccio metodologico per l'elaborazione delle raccomandazioni

In generale, le linee guida (LG) per la pratica clinica sono definite come "documenti che comprendono raccomandazioni di comportamento tese ad ottimizzare la cura dei pazienti, basate sulla revisione sistematica della letteratura e delle prove di efficacia disponibili, con lo scopo di migliorare la qualità dell'assistenza e gli esiti della cura"³. Più nel dettaglio, l'*Institute of Medicine* (IOM) suggerisce che le linee guida debbano essere sviluppate da un autorevole gruppo multidisciplinare di esperti e basarsi su un processo trasparente che assicuri il massimo grado di appropriatezza degli interventi, riducendo al minimo nella definizione della strategia diagnostica e assistenziale quella parte di variabilità nelle decisioni cliniche legata alla soggettività.³

In Medicina, i diversi livelli di raccomandazioni devono avere come obiettivo fondamentale il miglioramento dell'esito clinico per il paziente, da raggiungere attraverso prove di validità, sicurezza e appropriatezza della strategia diagnostica e/o terapeutica scelta. In Medicina di Laboratorio l'applicazione del principio esposto non è semplice perché da un lato c'è la difficoltà nello stabilire una correlazione assoluta tra i risultati dei test di laboratorio con gli esiti clinici del paziente, dall'altro bisogna tenere conto degli aspetti tecnologici e organizzativi che, se non correttamente indirizzati, possono condizionare negativamente l'interfaccia laboratorio-clinica e interferire nel percorso diagnostico e terapeutico del paziente. Tenendo conto di questi aspetti, la SIPMeL ha identificato un documento, recentemente aggiornato, che esplicita la metodologia da seguire nei processi di adozione, produzione e revisione di Linee Guida di Medicina di Laboratorio (LGML)^{4, 5} e

che fa riferimento al documento della *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB) pubblicato nel 2014.⁶

A differenza della formulazione di linee guida di pratica clinica, per le quali gli studi controllati randomizzati (RCT) risultano essere la migliore opzione metodologica, per la elaborazione di LG di tipo non terapeutico, come ad esempio nella valutazione dell'accuratezza di un test diagnostico, il disegno RCT non solo non è utile ma la sua applicazione risulta inappropriata.⁷

Il GdS-AI, pur consapevole che in letteratura a livello nazionale e internazionale sono già presenti LG di pratica clinica sulla diagnosi e *management* delle epatopatie autoimmuni, ritiene che in queste raccomandazioni non siano affrontati correttamente e sufficientemente aggiornati gli aspetti diagnostici di laboratorio. Per fornire raccomandazioni utili ai professionisti della Medicina di Laboratorio è fondamentale che nelle LG vi siano chiare indicazioni sull'appropriatezza della richiesta dei test, sulle metodologie analitiche utilizzate per la determinazione degli autoanticorpi, sul loro ruolo nel percorso diagnostico e sulle modalità di refertazione dei risultati.⁸

Per la stesura del documento di consenso, la ricerca della letteratura è stata fatta interrogando il *database* PubMed utilizzando i seguenti termini MeSH (*Medical Subject Headings*): *autoimmune hepatitis, hepatitis/diagnosis, autoimmune/prevention and control, autoimmune/immunology, antibodies/analysis, antibodies/blood, liver cirrhosis, primary biliary cholangitis e primary sclerosing cholangitis*. La ricerca è stata integrata con l'esame della bibliografia presente negli articoli più significativi, tenendo conto soprattutto dei riferimenti riportati nelle linee guida internazionali più recenti su AIH, PBC e PSC. L'arco temporale considerato va dal 2009, data dell'ultima *consensus* del GdS-AI sull'argomento, fino ad oggi.

Si è tenuto conto solo degli articoli che riportavano valutazioni sui risultati dei test di laboratorio oggetto di studio e dei riferimenti riportati nelle linee guida internazionali più recenti.

Nel percorso di formulazione delle raccomandazioni è stato utilizzato il metodo GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation*).⁷ Un aspetto peculiare di questo metodo, importante ai fini della stesura di LGML, è l'integrazione della valutazione della qualità metodologica delle prove disponibili con altri aspetti, quali: a) fattibilità e trasferibilità dell'intervento proposto; b) benefici e rischi attesi e loro rilevanza; c) implicazioni organizzative, economiche, sociali e finanziarie (anche rispetto al contesto lavorativo). Lo schema classificativo della qualità delle prove e il significato dei criteri

TABELLA I.—Valutazione della qualità delle evidenze e definizione della forza e delle implicazioni della raccomandazione (adattato dal sistema GRADE).⁷

Criteri di valutazione	
Grado di evidenza	
Alto (4+)	Ulteriori ricerche non dovrebbero modificare la stima dell'efficacia dell'effetto osservato
Moderato (3+)	Ulteriori ricerche potrebbero modificare la stima dell'efficacia dell'effetto osservato
Basso (2+)	Ulteriori ricerche sono necessarie e potrebbero modificare la stima dell'efficacia dell'effetto osservato
Molto basso (1+)	Qualsiasi stima dell'efficacia dell'effetto osservato è incerta
Grado di raccomandazione	
1	Forte raccomandazione: i benefici ottenuti sono chiaramente maggiori dei rischi
2	Debole raccomandazione: i benefici ottenuti e i rischi si bilanciano e/o sono incerti

di valutazione secondo il metodo GRADE sono descritti in Tabella I.⁷

Il documento è declinato in 20 raccomandazioni, suddivise in tre sezioni dedicate a AIH, PBC e PSC. Ciascuna raccomandazione si conclude con una valutazione formale del *work up* elaborato. La qualità delle evidenze viene espressa come alta (ulteriori ricerche difficilmente possono cambiare i risultati sulla stima dell'effetto), moderata (ulteriori ricerche potrebbero modificare i risultati sulla stima dell'effetto), bassa (ulteriori ricerche sono necessarie e potrebbero modificare sostanzialmente i risultati sulla stima dell'effetto) o molto bassa (la stima dell'effetto è molto incerta). La definizione della forza delle raccomandazioni viene espressa come “forte”, cioè i benefici sono chiaramente maggiori dei rischi (raccomandazione positiva) o viceversa (raccomandazione negativa), oppure “debole”, cioè i benefici e i rischi si bilanciano o sono incerti. La valutazione è stata assegnata per consenso dai componenti del GdS-AI SIPMeL in base all'evidenza delle prove scientifiche presenti in letteratura. Ogni evidenza e raccomandazione è stata formulata in risposta a domande chiave. Tutte le raccomandazioni contenute in queste LG sono state concordate all'unanimità (100%) in una *consensus conference* tenutasi nel mese di giugno 2023.

Sezione 1. Epatite autoimmune

L'AIH è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata sierologicamente da ipertransaminasemia, elevati livelli di immunoglobuline G (IgG) e presenza di autoanticorpi circolanti, mentre dal punto di vista istologico è caratterizzata da una tipica epatite da interfaccia con infiltrato infiammatorio prevalentemente periportale che invade il parenchima epatico fino a determinarne la necrosi. L'AIH colpisce tutte le età e interessa maggiormente il sesso femminile (*ratio* F/M 3,6:1).⁹ Il tasso di incidenza per anno risulta essere di 1,37 per 100.000 soggetti senza variazioni significative tra le popolazioni europee, asiati-

che e americane. Vi sono, di contro, differenze tra le varie popolazioni per quanto riguarda la prevalenza che è risultata essere rispettivamente 19,4, 13 e 20,9 per 100.000 soggetti negli europei, negli asiatici e negli americani.⁹ Nella maggior parte dei casi l'AIH non è clinicamente distinguibile da altre epatopatie e spesso viene diagnosticata dopo il riscontro occasionale di elevati livelli sierici di transaminasi senza particolari segni e/o sintomi a livello epatico. L'AIH dovrebbe essere sempre sospettata in tutti i pazienti per i quali non è stata raggiunta una chiara diagnosi. Infatti, se non diagnosticata e di conseguenza non trattata, l'AIH ha una prognosi infausta con un tasso di mortalità del 56% nell'arco di 30-72 mesi, mentre si ottiene una buona risposta al trattamento immunosoppressivo nel 90% dei pazienti.^{10, 11} La ricerca degli autoanticorpi è un criterio diagnostico essenziale (Tabella II).¹² Il 95% dei pazienti con AIH è positivo per almeno uno degli autoanticorpi tipici della malattia¹³ in accordo con le raccomandazioni pubblicate nel 2004 dallo *International Autoimmune Hepatitis Group* (IAHG)¹⁴ e con le più recenti linee guida dello *European Association for the Study of the Liver* (EASL) del 2015.¹⁵

In base al *pattern* autoanticorpale l'AIH è classicamente suddivisa in due distinti sottotipi: AIH di tipo 1 e AIH di tipo 2. Quella di tipo 1 è la forma più comune e colpisce sia bambini che adulti, mentre l'AIH di tipo 2 è una malattia principalmente pediatrica/giovanile.¹⁵ L'AIH di tipo 1 è caratterizzata dalla presenza nel siero di autoanticorpi anti-nucleo (ANA) e/o autoanticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), mentre la presenza di autoanticorpi anti-mitosomi del fegato e del rene (anti-LKM1) e/o anti-citosol epatico di tipo 1 (anti-LC1) definiscono l'AIH di tipo 2. Le due forme descritte sono, di regola, mutuamente esclusive.

Altre specificità autoanticorpali sono state identificate e correlate con la AIH, quali gli autoanticorpi anti-antigene epatico solubile (anti-SLA)¹⁶ e gli autoanticorpi anti F-actina.¹⁷ Oltre a questi, possono essere presenti anche autoanticorpi di minore importanza, quali gli autoanticorpi

TABELLA II.—*Criteri semplificati per la diagnosi di epatite autoimmune secondo le indicazioni dell'IAHG.¹²*

Categoria	Parametro	Cutoff	Punteggio
Autoanticorpi	ANA* o ASMA	≥1:40 in IFI	+1
	ANA** o ASMA	≥ 1:80 in IFI	+2***
	Anti-LKM1 (in alternativa a ANA e ASMA)	≥ 1:40	+2***
	Anti-SLA (in alternativa a ANA, ASMA e LKM1)	Positivo	+2***
Immunoglobuline	IgG	> LSR	+1
		> 1,1 volte LSR	+2
Istologia epatica	Caratteristiche da epatite da interfaccia	Compatibili	+1
		Tipiche	+2
Marcatori virali	IgM anti-HAV, HBsAg, HBV DNA, HCV RNA	Assenti	+2
		Diagnosi probabile	≥6
		Diagnosi definitiva	≥7

ANA: anticorpi antinucleo; ASMA: anticorpi anti-muscolo liscio; anti-LKM-1: anticorpi anti-microsomi epatici e renali tipo 1; SLA: antigene solubile epatico; IFI: immunofluorescenza indiretta; LSR: limite superiore dell'intervallo di riferimento; IgG: immunoglobulina G; IgM: immunoglobulina M; HAV: virus epatite A; HbsAg: antigene di superficie epatite B; HBV DNA: DNA virus epatite B; HCV RNA: RNA virus epatite C.
*Se ANA eseguito in IFI su HEP-2 il valore è ≥1:80; ** se ANA è eseguito in IFI su HEP-2 il valore è ≥ 1:160; *** la somma massima di punteggio attribuibile a positività autoanticorpali è di 2.

anti-recettore della asialoglicoproteina (anti-ASGPR) e gli anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) a morfologia perinucleare atipica (P-ANCA atipico).

Gli autoanticorpi anti-ASGPR sono rivolti contro la subunità H1 del recettore di una proteina transmembrana degli epatociti.¹⁸ Sono stati riscontrati in varie forme di epatopatie croniche ma per la loro aspecificità non hanno mai avuto rilevanza nella diagnostica dell'AIH. Recentemente il miglioramento delle tecniche di purificazione e stabilizzazione dell'antigene e di conseguenza lo sviluppo di saggi diagnostici più specifici, hanno dato un nuovo impulso all'uso diagnostico del test, dal momento che il livello anticorpale nel siero sembra correlare con l'attività di malattia.¹⁹

Gli ANCA riscontrati nei pazienti affetti da AIH sono definiti più propriamente P-ANCA atipici, in quanto riconoscono *target* diversi dai classici enzimi mieloperossidasi e proteinasi 3 presenti nelle vasculiti autoimmuni. L'autoantigene coinvolto sembra essere una proteina presente nella membrana nucleare, identificata come isotipo 5 della β -tubulina (TBB5)²⁰ e la reattività in immunofluorescenza indiretta (IFI) mostra un *pattern* fluoroscopico perinucleare atipico. Tuttavia, i P-ANCA atipici non sono specifici per AIH in quanto riscontrati anche in altre epatopatie autoimmuni e nelle malattie infiammatorie dell'intestino (IBD).²¹ La frequenza degli anticorpi P-ANCA è estremamente variabile (tra il 40 e il 96%)²² e solo in un piccolo sottogruppo di pazienti affetti da AIH tipo 1 sono l'unico marcatore sierologico presente.

La Tabella III riassume gli autoanticorpi da ricercare per la diagnosi della AIH, gli antigeni da essi riconosciuti, la loro rilevanza clinica e la possibilità della loro determinazione analitica con i vari metodi disponibili in commercio.

1.1 Nei pazienti con sospetto di epatopatia autoimmune è preferibile eseguire il test ANA in immunofluorescenza indiretta (IFI) o con metodi immunometrici? Se si utilizza l'IFI, come substrato vanno utilizzate sezioni di tessuto di roditore (fegato, rene e stomaco) o cellule HEp-2?

Gli ANA sono marcatori sierologici delle malattie autoimmuni del connettivo e, pur se a bassa specificità, rappresentano uno dei criteri per la diagnosi di AIH di tipo I¹⁴ essendo presenti nel 60-80% dei pazienti affetti dalla patologia.

Nelle diagnosi delle AIH, l'IFI è il metodo analitico raccomandato per la ricerca degli autoanticorpi anti-nucleo;¹⁴ infatti, poiché nella AIH gli antigeni bersaglio sono sconosciuti in almeno un terzo dei pazienti, effettuare la loro ricerca (per lo *screening*) con metodi più specifici in fase solida (ELISA, CLIA, FEIA, ALBIA), determinerebbe un aumento di risultati falsi negativi.

La dichiarazione di consenso dell'IAHG¹⁴ e le linee guida del 2015 dell'EASL¹⁵ sconsigliano però come substrato per il test di *screening* in IFI, l'utilizzo di cellule HEp-2, ribadendo che nessun *pattern* fluoroscopico e/o combinazione di *pattern* è caratteristico di AIH e che comunque la definizione del *pattern* non risulta avere rilevanti implicazioni cliniche. Viene, invece, raccomandata la ricerca degli ANA, in combinazione con la ricerca degli altri autoanticorpi associati, su sezioni di tessuto di roditore (fegato, rene e stomaco). Questa raccomandazione, già suggerita nel 2010 dalle linee guida di pratica clinica proposte dall'AASLD,² non è stata modificata nella più recente revisione delle stesse.²³

Di contro, in un recente studio multicentrico è stata dimostrata la validità dell'utilizzo sia del test in IFI su cel-

lule HEp-2 sia del test in ELISA con estratti nucleari di HEp-2, come alternativa potenzialmente affidabile ai test raccomandati su sezioni di triplo tessuto murino e da applicare nel *work-up* diagnostico di pazienti con sospetta AIH.²⁴ Le associazioni di vari metodi e i *cutoff* suggeriti dai risultati di questo studio, se confermati da ulteriori ricerche, determineranno la necessità di revisione dello *score* diagnostico in uso.

Ad oggi, tuttavia, i metodi immunometrici mostrano nello *screening* delle malattie reumatiche autoimmuni e nella diagnostica delle AIH, una sensibilità inferiore a fronte di una elevata specificità rispetto al metodo IFI su cellule HEp-2.²⁵⁻²⁸ La minore sensibilità dei metodi in fase solida (ELISA, ma anche dei nuovi metodi FEIA e CLIA), risiede nel fatto che il pannello di antigeni disponibile è ancora parziale rispetto al repertorio antigenico presente in una cellula HEp-2.^{29, 30} L'utilizzo di nuovi sistemi multiparametrici, caratterizzati dalla presenza di un maggior numero di antigeni, ha mostrato superiore efficienza diagnostica, con sensibilità paragonabile a quella dell'IFI HEp-2 ed elevata specificità. Sarà necessario attendere la loro validazione per poter disporre di una reale alternativa all'IFI HEp-2 e, pertanto, al momento la soluzione più auspicabile è che ciascun laboratorio possa disporre di almeno un'altra metodica alternativa all'IFI.³¹

Alla luce di queste premesse, la posizione del GdS-AI conferma quanto già espresso nella precedente *consensus conference* del 2009:¹ nel contesto delle epatopatie autoimmuni il substrato da preferire per la valutazione degli ANA in IFI è rappresentato dalle cellule HEp-2 perché, grazie alla maggiore sensibilità, consentono di valutare alcune positività autoanticorpali altrimenti non visibili sul triplo tessuto di roditore,³² come le positività *rim-like* (AC-12) e *multiple nuclear dots* (AC-6).

Inoltre, i *pattern* fluoroscopici caratteristici valutati su cellule HEp-2 sono utili per guidare ulteriori test di conferma volti a identificare le innumerevoli specificità ANA presenti anche nei pazienti con AIH di tipo I.³³

Raccomandazione. Nel sospetto di epatopatia autoimmune, la ricerca degli ANA deve essere effettuata con il metodo IFI su cellule HEp-2 per la sua elevata sensibilità e perché permette la corretta rilevazione e interpretazione di quadri fluoroscopici altrimenti non identificabili su tessuti di roditore, come *rim-like* (AC-12) e *multiple nuclear dots* (AC-6). Questi *pattern* sono correlati alla presenza di anticorpi rivolti rispettivamente contro gli epitopi antigenici nucleari gp210 e sp100 e sono associati a PBC, patologia epatica autoimmune che entra in diagnosi differenziale o in over-

lap con AIH. Ad oggi, i metodi immunometrici nella diagnostica delle AIH sono meno sensibili dell'IFI su HEp-2 e pertanto non è indicato utilizzarli in fase di screening della AIH.

Qualità globale delle evidenze: alta.

Forza della raccomandazione: forte.

1.2 Nei pazienti con sospetta epatopatia autoimmune, quale diluizione di screening è consigliata per il test ANA in IFI su cellule HEp-2?

Per la ricerca degli ANA in IFI su triplo tessuto di roditore, la diluizione di partenza del siero raccomandata dall'*International Autoimmune Hepatitis Group* (IAHG) è di 1:40 negli adulti e di 1:20 nei bambini e negli adolescenti.¹⁴ Sulla linea cellulare HEp-2, substrato ampiamente usato nei laboratori clinici anche nel contesto diagnostico delle malattie epatiche autoimmuni, queste basse diluizioni (1:20-1:40) non possono essere applicate nei laboratori clinici in quanto aumenterebbero enormemente la possibilità di risultati falsamente positivi in individui sani e in pazienti affetti da patologie non autoimmuni.³⁴ Inoltre, dati disponibili in letteratura concordano sull'inutilità di utilizzare per i bambini e gli adolescenti una diluizione di *screening* inferiore rispetto a quella usata per la popolazione adulta.³⁵ Studi recenti suggeriscono di usare le cellule HEp-2 in IFI come substrato per la ricerca degli ANA nello *screening* nelle AIH, con un *cutoff* pari a 1:160 ai fini di una sensibilità e specificità paragonabile alla diluizione di 1:40 su triplo tessuto di ratto;²⁴ questo approccio diagnostico che si avvicina alla *real life* di laboratorio in cui lo *screening* degli ANA per la ricerca delle malattie autoimmuni sistemiche viene eseguito a una diluizione di 1:80 o 1:160, necessita comunque di ulteriori studi di validazione.

Gli esperti del GdS-AI suggeriscono per la ricerca degli ANA su HEp-2 nel sospetto di AIH, una diluizione di partenza del siero di 1:80 sia per soggetti adulti che per bambini e adolescenti. Inoltre, dal momento che l'utilizzo del substrato HEp-2 aumenta la sensibilità analitica del test, si concorda con IAHG per l'attribuzione di un punteggio dimezzato nello *score* dei criteri diagnostici per AIH: 1 punto per valori ANA di 1:80 e 2 punti per valori $\geq 1:160$ ¹² (Tabella II), anche se questo possibile suggerimento del fattore di correzione non è mai stato convalidato da studi comparativi.³⁶

Va sottolineato, infine, che la titolazione del campione andrebbe effettuata almeno fino a 1:320, non solo perché fondamentale per ottenere uno *score* corretto per la diagnosi, ma anche per ridurre il rischio di un fenomeno di inibizione in presenza di concentrazione molto elevata di

autoanticorpi (effetto prozona) ed evitare così risultati falsamente negativi.

Raccomandazione. Nel sospetto di epatopatia autoimmune, nella determinazione degli ANA in IFI su cellule HEp-2 si raccomanda di utilizzare la diluizione iniziale di 1:80. In caso di riscontro di negatività ma di forte sospetto diagnostico, va comunque eseguita una titolazione almeno fino a 1:320 per ridurre il rischio di falsi negativi dovuti ad un possibile effetto prozona. Un titolo <1:80 va considerato negativo; un titolo di 1:80 va considerato basso positivo; un titolo \geq 1/160 va considerato positivo. Per la popolazione pediatrica, in attesa di ulteriori studi su casistiche più ampie, si raccomanda l'utilizzo della stessa diluizione di screening proposta per la popolazione adulta e l'applicazione dei medesimi criteri di valutazione.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: forte.

1.3 Nei soggetti con sospetta epatopatia autoimmune, in caso di risultato positivo del test ANA in IFI su HEp-2, è utile riportare nel referto anche il pattern di fluorescenza?

Numerosi sono gli antigeni verso cui sono rivolti gli ANA nella AIH e i relativi *pattern* fluoroscopici (Tabella III), anche se è prevalente (~70% dei casi) il *pattern* omogeneo. Tuttavia, né il titolo né il *pattern* sembrano correlare con il decorso, la prognosi e la progressione della malattia³⁷ o con un particolare fenotipo di malattia.³⁸

Ad oggi, sempre più laboratori clinici aderiscono alla nomenclatura *International Consensus on ANA patterns* (ICAP) per la refertazione dei *pattern* ANA in IFI su cellule HEp-2.³⁹ Per la classificazione dei *pattern* ANA nelle AIH i *pattern* nucleari omogeneo (AC-1) e quello *speckled* sia *fine* (AC-4) che *coarse* (AC-5) mostrano un potenziale di rilevanza diagnostica. Il riscontro di un *pattern* citoplasmatico verso microfilamenti citoscheletrici definito fibrillare lineare *actin-like* (AC-15) (Figura 1), suggestivo di una positività anti F-actina è uno dei criteri

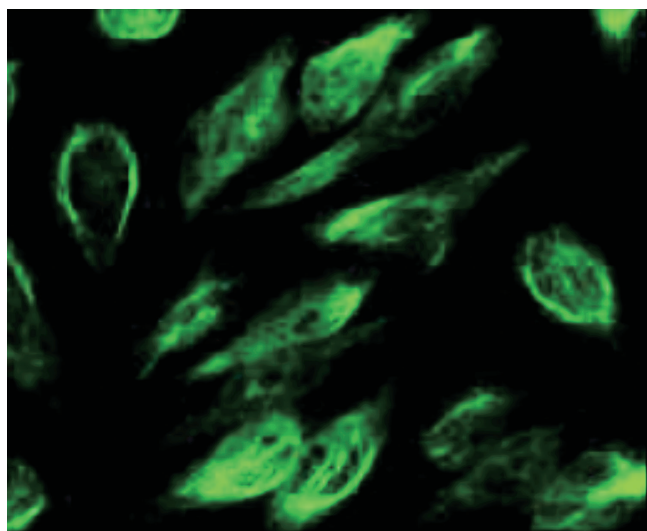


Figura 1.—*Pattern actin-like* su cellule HEp-2 (IFI, 400x).

TABELLA III.—*Autoanticorpi da ricercare nella diagnosi differenziale di epatite autoimmune.*

Autoanticorpo	Autoantigene	Valore in AIH	Metodi di rilevamento
ANA	Molteplici target (DNA a singola e a doppia elica, cromatina, ribonucleoproteine, istoni)	Definisce AIH-1; frequente associazione con ASMA; se la specificità degli ANA è contro la glicoproteina 210 o contro autoantigene nucleare Sp100, la diagnosi è probabilmente PBC, non AIH	IFI, ELISA, IB, LIA, FEIA, CLIA
ASMA	Microfilamenti (F-actina) Filamenti intermedi (vimentina, desmina)	Suggerisce la diagnosi di AIH-1 soprattutto se combinato con ANA e a titoli elevati	IFI, ELISA
Anti-LKM1	Citocromo P4502D6 (CYP2D6)	Diagnostico per AIH-2 dopo esclusione di epatite C	IFI, ELISA, IB, LIA, FEIA, CLIA
Anti-LC1	Formiminotransferasi ciclodeaminasi	Diagnostico per AIH-2	IFI, ELISA, IB, LIA
Anti-SLA	O-fosfoseril-tRNA(Sec) selenio transferasi	Diagnostico per AIH, prognostico di severità di malattia	ELISA, IB
pANCA (atipico)	β -Tubulina isotipo 5	Diagnostico per AIH; potrebbe essere l'unico autoanticorpo nell'AIH-1 dopo diagnosi differenziale per PSC e malattie infiammatorie intestinali	IFI
Anti-ASGPR	Recettore della asialoglicoproteina	Diagnostico per AIH, utile nel classificare le AIH sieronegative per anticorpi standard	ELISA, IB
AMA	Subunità E2 del complesso ossiacido-deidrogenasi (PDC-E2, OGDC-E2, BCOADC-E2)	Diagnostico per probabile PBC contro AIH; raramente osservato nell'AIH-1 dove potrebbe essere indicativo di sindrome da sovrapposizione con PBC	IFI, ELISA, IB, FEIA, CLIA

ANA: anticorpi antinucleo; ASMA: anticorpi anti-muscolo liscio; anti-LKM1: anticorpi anti-mitosomi epatici e renali tipo 1; anti-LC1: anti-citosol epatico di tipo 1; anti-SLA: anticorpi anti-antigene solubile epatico; p-ANCA atipico: anti-citoplasma dei neutrofili a morfologia perinucleare atipica; anti-ASGPR: anti-recettore della asialoglicoproteina; AMA: anticorpi anti mitocondrio; IFI: immunofluorescenza indiretta; ELISA: immunoenzymatic assay; IB: immunoblot; LIA: line-immunoassay; FEIA: fluoroenzymatic immunoassay; CLIA: chemiluminescence immunoassay.

diagnostici delle AIH di tipo 1 e, se non correttamente refertato, potrebbe condurre a errate interpretazioni di positività citoplasmatiche e richieste di test di conferma inappropriate. Inoltre, la segnalazione di un *pattern* citoplasmatico refertato soltanto come ANA positivo può portare a un punteggio errato all'interno dei sistemi diagnostici IAHG. Il GdS-AI ritiene che una terminologia univoca per definire i *pattern* fluoroscopici ANA costituisca un prerequisito indispensabile per garantire l'armonizzazione dei risultati e che all'acronimo ANA venga associata la dicitura "anticorpi anti-antigeni intracellulari" in modo da esplicitare chiaramente che la ricerca comprende gli autoanticorpi diretti verso tutti i costituenti cellulari e non solo quelli a sede nucleare.⁴⁰

Raccomandazione. Nel sospetto di epatopatia autoimmune, la refertazione del test ANA eseguito con metodo IFI su cellule HEp-2, deve riportare il risultato qualitativo (positivo o negativo), il titolo e il *pattern* di fluorescenza (omogeneo, granulare, ecc.) secondo la nomenclatura ICAP.

Qualità globale delle evidenze: alta.

Forza della raccomandazione: forte.

1.4 Nei pazienti con sospetto di epatite autoimmune è preferibile eseguire inizialmente la ricerca degli ASMA in IFI su triplo tessuto (fegato, rene e stomaco) di roditore e, in caso di positività, eseguire test di conferma con metodi immunometrici in fase solida? In caso di positività per ASMA in IFI è utile riportare nel referto il *pattern* fluoroscopico?

Gli ASMA rappresentano una categoria eterogenea di autoanticorpi rivolti contro diversi autoantigeni e si riscontrano nel 70-85% dei pazienti con AIH di tipo 1 e in circa il 70% dei casi in associazione con gli ANA⁴¹ ma, analogamente a quest'ultimi, non sono specifici per AIH.⁴² In IFI su sezioni di tessuto di roditore (fegato, rene e stomaco) si evidenziano per la positività dei vasi (ASMA-V) e/o positività glomerulare (ASMA-G) e/o positività peritubulare (ASMA-T). Gli ASMA con *pattern* G o T rivolti verso la forma filamentosa dell'actina (F-actina) sono più specifici per AIH di tipo 1 rispetto a quelli con *pattern* di tipo V.^{17, 43, 44}

La conferma della positività per F-actina con metodi in IFI, su cellule embrionali di aorta di ratto (VSM47) (Figura 2) e/o su cellule epiteliali di intestino di ratto, aumenta il valore predittivo positivo per AIH-1.⁴⁵ La ricerca della specificità per F-actina con metodi ELISA, invece, ha mostrato risultati negativi nel 20% dei sieri già positivi in IFI con *pattern* T, indicando la possibilità che questa reattività sia rivolta contro autoantigeni anco-

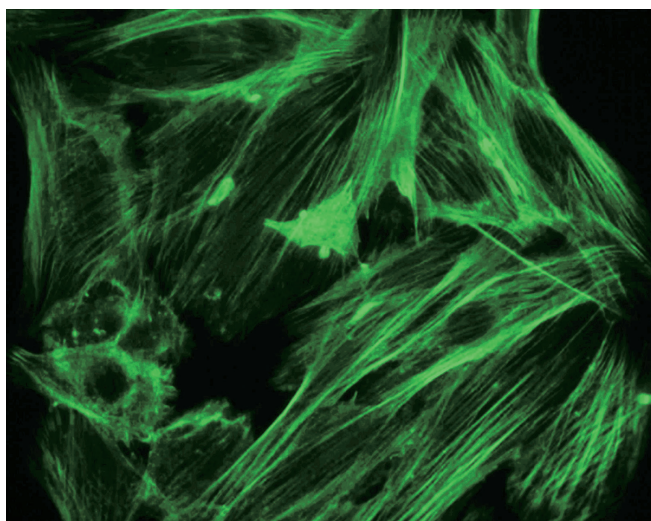


Figura 2.—*Pattern* actina su cellule VSM-47 (IFI, 400x).

ra sconosciuti e/o che l'epitopo antigenico abbia subito modificazioni durante la purificazione della proteina o il *coating* al supporto della fase solida.⁴⁴ Pertanto, il metodo in IFI, rimane a tutt'oggi il metodo di elezione sia per lo *screening* di questi autoanticorpi¹⁴ che per la conferma diagnostica.⁴⁵⁻⁴⁷

In caso di positività per ASMA, non c'è unanimità sull'utilità di descrivere il *pattern* fluoroscopico nel referto. Di recente, è stato evidenziato che il riscontro di positività ASMA-T, supportato da positività suggestiva per microfilamenti su cellule HEp-2, sia espressione di anticorpi ad alto titolo con specificità per F-actina, mentre i *pattern* ASMA-G e ASMA-V siano correlati ad anticorpi a basso titolo sia per F-actina che per altri epitopi del citoscheletro.²⁴ Tuttavia ulteriori studi sono necessari per confermare questi dati preliminari.

Raccomandazione. Nel sospetto di epatite autoimmune si raccomanda di eseguire la ricerca degli ASMA in IFI su sezioni di triplo tessuto di roditore (fegato, rene e stomaco) per evidenziare una eventuale positività a livello dei vasi (V), dei glomeruli (G) e/o peritubulare (T). Il riscontro di positività G e/o T in genere è correlato alla presenza di anticorpi anti-F-actina che sono più specifici per epatite autoimmune tipo 1. I test immunometrici e di immunoblot per F-actina sono sconsigliati in fase di *screening* perché non ancora dotati di sufficiente sensibilità analitica. È sufficiente refertare la positività per ASMA senza descrivere il *pattern* riscontrato.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: forte.

1.5 Nei soggetti con sospetto di epatite autoimmune, quale diluizione di screening è consigliata per la ricerca degli ASMA in IFI su sezioni di triplo tessuto murino?

Per la ricerca degli ASMA in IFI, il documento di consenso dell'IAHG suggerisce una diluizione di partenza di 1:40 per gli adulti e 1:20 per i bambini/adolescenti.¹⁴ Villalta et al, nel corso di una valutazione con diversi metodi del profilo autoanticorpale in una coorte di pazienti adulti e pediatrici affetti da AIH, per l'analisi in IFI hanno applicato una diluizione di partenza del siero di 1:40 su vari substrati (cellule HEP-2, sezioni di triplo tessuto di ratto e anche due linee cellulari proposte per la rilevazione degli anticorpi anti-F-actina) riscontrando che gli ASMA, determinati su triplo tessuto, presentavano a tale diluizione una sensibilità maggiore sia negli adulti che nei bambini rispetto agli altri test.⁴⁸ Recentemente Galaski *et al.* sempre utilizzando una diluizione iniziale di 1:40, hanno dimostrato anche una elevata specificità degli ASMA con *pattern* VGT (93.1%), anche se con una bassa sensibilità (52.5%).²⁴ Gli stessi autori, però, hanno riportato che se si considerano tutti i *pattern* ASMA (V e/o G e/o T) e non solo il triplo *pattern* VGT, alla diluizione di 1:40 la sensibilità è di 86.9%, ma la specificità scende al 37.5%. Ciò comporta che se il test viene eseguito in un soggetto con una bassa probabilità pre-test di AIH, come spesso è il caso delle richieste che arrivano nei laboratori generali, il valore predittivo positivo (VPP) del test è bassissimo. Ad un titolo di 1:80, invece, cala di poco la sensibilità (80.3%), mentre la specificità sale a 69.4% e di conseguenza anche il VPP. Anche se nel documento di consenso dell'IAHG viene consigliata la diluizione di partenza a 1:40, per quanto sopra riportato, soprattutto a livello dei laboratori generali, la diluizione di partenza più idonea sembra essere 1:80.

È importante inoltre considerare che i microscopi attuali a LED che hanno sostituito quelli a lampada di mercurio, sono dotati di elevata sensibilità (maggiore luminosità dei preparati) e aumentata nitidezza delle immagini, anche grazie all'impiego di nuovi coniugati, e che esiste un elevato *background* dovuto alla fissazione dei tessuti. Per questi motivi, gli esperti del GdS-AI ritengono che per la ricerca degli ASMA su sezione di tessuto murino nei soggetti adulti sia ancora valida la raccomandazione della diluizione di *screening* di 1:40 se è presente un'alta probabilità pre-test di AIH (laboratori specialistici associati a cliniche epatologiche), mentre suggeriscono che venga adottata una diluizione di 1:80 quando vi è bassa probabilità pre-test (laboratori generali).

Abbiamo già accennato al dibattito su quale diluizione di *screening* possa essere ottimale per la popolazione pe-

diatrica. Anche per gli ASMA, tenendo conto che la positività autoanticorpale è estremamente rara nei bambini sani, alcuni autori hanno proposto di utilizzare *cut-off* differenti per i pazienti adulti e pediatrici.^{49, 50} Nei pazienti pediatrici, come già detto l'IAHG considera già clinicamente rilevanti titoli di 1:20 (suggerendo di adottare la stessa diluizione anche per anti-LKM e anti-LC1) mentre altri autori propongono diluizioni ancora inferiori (1:10).⁵¹ In considerazione della difficoltà pratica ad utilizzare due differenti diluizioni di *screening* a seconda dell'età e della bassa specificità degli ASMA quando ricercati alla diluizione di 1:20, dove può diventare ancor più evidente un effetto prozona, il GdS-AI non ritiene opportuno che questa diluizione venga adottata dai laboratori clinici nei quali, peraltro, la prevalenza di soggetti pediatrici affetti da AIH di tipo 1 è trascurabile. Per la popolazione pediatrica si raccomanda pertanto l'utilizzo della stessa diluizione di *screening* proposta per la popolazione adulta.

Raccomandazione. Nel sospetto di epatite autoimmune, per la ricerca degli ASMA in IFI su sezioni di triplo tessuto murino è suggerita la diluizione di *screening* di 1:40 nei laboratori a cui afferiscono soggetti con alta probabilità pre-test di AIH e di 1:80 nei laboratori dove la probabilità pre-test è molto inferiore. Per la popolazione pediatrica si raccomanda l'utilizzo della stessa diluizione di *screening* proposta per la popolazione adulta.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: debole.

1.6 Nel sospetto di epatite autoimmune, i metodi immunometrici in fase solida, per le loro caratteristiche di sensibilità e specificità possono essere usati per la ricerca degli anticorpi anti-LKM al posto del metodo IFI che utilizza come substrato il triplo tessuto di roditore?

Con il termine autoanticorpi anti-LKM si identifica una famiglia eterogenea di anticorpi rivolti contro antigeni microsomiali epatici e renali che, in base all'antigene bersaglio, vengono classificati in tre tipi dominanti noti come anti-LKM tipo 1, tipo 2 e tipo 3. L'autoantigene degli anti-LKM-1 è il citocromo P4502D6 (CYP2D6).^{52, 53} I bersagli antigenici degli anti-LKM-2 e anti-LKM-3 sono stati identificati rispettivamente nel citocromo P4502C9 (CYP2C9)^{54, 55} e nell'UDP-glucuroniltransferasi (UGT-1).⁵⁶ Gli anti-LKM-1 rappresentano il marcatore caratteristico dell'AIH tipo 2, che si distingue così dall'AIH tipo 1 sia dal punto di vista del profilo autoanticorpale sia per le caratteristiche cliniche. Tuttavia, questi anticorpi non sono specifici per AIH in quanto possono essere presenti anche

nel 5-10% dei pazienti con epatite cronica da HCV a causa di parziale *overlap* tra gli epitopi *target* del CYP2D6 e del virus HCV.^{57, 58} I pazienti affetti da AIH tipo 2 sono più giovani e presentano una forma più aggressiva di epatite, spesso associata ad altre patologie autoimmuni.⁵⁹ Dal punto di vista epidemiologico, l'AIH tipo 2 è più frequente in Europa dove rappresenta il 20% delle AIH e il 3-40% della AIH pediatriche.^{42, 45}

Gli anti-LKM-2 sono stati identificati nel siero di pazienti con epatite farmaco indotta,⁵⁵ mentre gli anti-LKM-3, correlati inizialmente all'epatite D (delta), sono presenti nel 10-20% dei soggetti con AIH tipo 2 e, nella maggior parte dei casi, in associazione con LKM-1.⁶⁰

Viste le diverse specificità antigeniche coinvolte, i quadri fluoroscopici visibili su sezioni di tessuti murini di fegato, rene e stomaco e prodotti dai rispettivi autoanticorpi appaiono differenti all'osservazione microscopica: a) gli anti LKM-1 producono una fluorescenza diffusa nel tessuto epatico che appare invece disomogenea sul tessuto renale, in quanto viene colorato soltanto il terzo distale dei tubuli prossimali dove l'antigene è maggiormente rappresentato;³⁸ b) gli anti-LKM-2 producono una fluorescenza del tessuto epatico non omogenea, concentrandosi maggiormente a livello degli epatociti centrolobulari, mentre nel tessuto renale colorano principalmente la prima e la seconda porzione dei tubuli prossimali;⁶¹ c) gli anti-LKM-3 possono determinare una fluorescenza su tessuti non murini, quali substrati umani o di primate, dove colorano il citoplasma degli epatociti e i tubuli contorti prossimali; possono inoltre determinare fluorescenza in altri tessuti quali quello pancreatico, surrenale, tiroideo e gastrico e, pertanto, per la loro rilevazione non è consigliato il triplo tessuto murino.^{56, 62}

Il riconoscimento in IFI di anticorpi anti-LKM necessita di operatori esperti per non essere confusa per positività anti-mitocondrio, viste le sottili differenze tra i due *pattern* su substrati epatici e renali. Nel dubbio può essere d'aiuto l'osservazione dello stomaco murino: in questo tessuto, infatti, gli anti-LKM non producono alcuna fluorescenza, mentre gli AMA colorano le cellule parietali gastriche, anch'esse ricche di mitocondri.⁶³

Positività anti-LKM, non distinguibili fluoroscopicamente dagli anti-LKM-1, possono essere dovute a reattività verso l'isoforma 1A2 del citocromo P450, diverse da 2D6, e riscontrato in quasi il 20% dei pazienti affetti da APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*), raro disordine autoimmune associato a mutazione del gene regolatore autoimmune AIRE.⁶⁴⁻⁶⁶

La diluizione del campione di siero, per la ricerca degli anti-LKM sui substrati precedentemente descritti, è di 1:80, come già indicato nella raccomandazione 1.5.

Solo dopo aver effettuato lo *screening* in IFI, in caso di dubbio e/o per conferma, si può procedere con un metodo ELISA, CLIA o *immunoblot*, dotati di maggiore specificità per la ricerca degli anticorpi anti-LKM.

Tuttavia, dal punto di vista del contesto clinico in cui opera il laboratorio, un aspetto da non sottovalutare è se sia preferibile utilizzare metodi più sensibili o più specifici. Per definizione nella valutazione delle caratteristiche analitiche di un test di *screening* è sempre privilegiata la sensibilità diagnostica, ma va comunque considerato che, in situazioni di bassa probabilità pre-test, i metodi immunometrici mostrano performance analitiche migliori dell'IFI.

Il laboratorio ha, quindi, la possibilità di scegliere se eseguire, già in fase di *screening*, un test più specifico in fase solida per consentire il più precocemente possibile una diagnosi differenziale, come nel caso di alcune forme fulminanti di epatopatia.⁶⁷

Raccomandazione. Nel sospetto di epatite autoimmune, per la ricerca degli anticorpi anti-LKM in IFI su sezioni di triplo tessuto murino è suggerita la diluizione di *screening* di 1:40 nei laboratori a cui afferiscono soggetti con alta probabilità pre-test di AIH e di 1:80 nei laboratori generali. In presenza di un quadro di fluorescenza suggestivo per anticorpi anti-LKM è raccomandata la conferma della specificità anticorpale con metodi immunometrici in fase solida o di *immunoblot*.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: forte.

1.7 Nei pazienti con forte sospetto di epatite autoimmune, oltre ai test per ANA, ASMA, anti-LKM è utile il ricorso a ulteriori test autoanticorpali per aumentare l'accuratezza del percorso diagnostico?

Abbiamo già accennato, nella parte introduttiva di questo documento agli autoanticorpi anti-antigene epatico solubile (anti-SLA) correlati con AIH. Per una diagnosi di laboratorio delle epatopatie autoimmuni completa, efficace e appropriata, in caso di negatività dei test già discussi è consigliabile procedere anche con la ricerca di questi autoanticorpi.

Gli anticorpi anti-SLA, inizialmente distinti dagli autoanticorpi anti-fegato e pancreas (anti-LP), sono oggi definiti come anti-SLA/LP in quanto riconoscono lo stesso bersaglio antigenico,⁶⁸ cioè un enzima intracellulare recentemente rinominato con l'acronimo SEPSECS (*Sep[O-phosphoserin]-tRNA synthase*) *Selenocysteine Synthase*.⁶⁹

Questi autoanticorpi non sono rilevabili in IFI,³⁸ ma solo con metodo ELISA o *immunoblot*. L'importanza della ricerca degli anti-SLA/LP nella diagnostica delle AIH deriva dal fatto che rappresentano marcatori specifici di AIH tipo 1 negli adulti, con una prevalenza variabile tra il 7 e il 22% dei casi, in base al gruppo etnico e al metodo usato per la loro determinazione.⁷⁰ Il riscontro di questi autoanticorpi in entrambe le forme di AIH unitamente al fatto che gli anti-SLA/LP sono associati ad una forma più grave di malattia e a una maggiore frequenza di recidive,^{71, 72} suggerisce un loro ruolo patogenetico. Non vi è tuttavia pieno accordo sulla specificità di questi autoanticorpi e sul loro ruolo prognostico, sia nel loro riscontro isolato che in associazione con gli anti-Ro52.⁷³⁻⁷⁷ Considerando che la maggior parte dei pazienti positivi agli anti-SLA/LP è contemporaneamente positiva agli anti-Ro52, non è escluso che possano essere questi ultimi i veri responsabili delle implicazioni prognostiche.^{73, 78}

Raccomandazione. Nel sospetto di epatite autoimmune si raccomanda di ricercare con metodica immunometrica in fase solida o in immunoblot anche gli autoanticorpi anti-SLA/LP, in quanto marcatori specifici di epatite autoimmune.

Qualità globale delle evidenze: alta.

Forza della raccomandazione: forte.

1.8 Nei soggetti con forte sospetto di epatite autoimmune, soprattutto in presenza di negatività per ANA, ASMA, anti-LKM e anti-SLA, è consigliato proseguire la diagnostica di laboratorio con la ricerca degli autoanticorpi anti-citosol epatico (anti-LC1) con metodiche immunometriche in fase solida?

Risale alla fine degli anni '80 la scoperta degli autoanticorpi anti-LC1 come unico marcatore presente in un terzo dei soggetti adolescenti affetti da AIH tipo 2.⁷⁹ Il *target* antigenico degli anti-LC1 è stato identificato nell'enzima intracellulare formiminotransferasi-ciclodeaminasi.⁸⁰ Le caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da AIH tipo 2 positivi per anti-LC1 non differiscono da quelle dei pazienti anti-LC1 negativi.⁷⁹ Sono identificabili con metodo IFI su substrato di tessuto murino in quanto colorano principalmente il citoplasma degli epatociti risparmiando la zona adiacente la vena centro lobulare (Figura 3); tuttavia, la loro presenza può essere mascherata dalla contemporanea positività per anti-LKM.⁸¹ Per questo motivo, per la loro corretta identificazione è preferibile usare un metodo ELISA o *immunoblot*.⁴⁸ Gli anti-LC1 si riscontrano in circa il 50% dei pazienti affetti da AIH tipo 2 e in circa il 35% dei casi pediatrici. Possono rappresentare il solo marcatore sierologico nel 10% delle AIH tipo 2.⁴¹ Raramente gli anti-

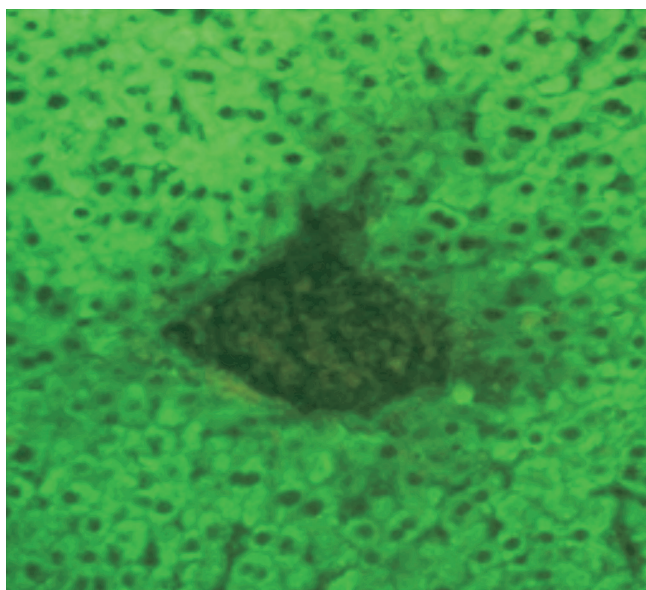


Figura 3.—*Pattern* Lc1 su tessuto epatico murino (IFI, 200x).

LC1 si trovano in associazione con ANA e/o ASMA nei pazienti con AIH tipo 1 o ancora, in associazione con gli anti-LKM-1, in pazienti affetti da epatite cronica da HCV.⁸²

Raccomandazione. Nei soggetti con forte sospetto di epatite autoimmune, in caso di negatività dei test ANA, ASMA, anti-LKM e anti-SLA, si raccomanda la ricerca degli anticorpi anti-LC1 con metodiche immunometriche in fase solida o di immunoblot che assicurano una maggiore accuratezza diagnostica rispetto all'IFI.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: forte.

1.9 I campioni con pattern AMA-like (AC-21) e F-actina (AC-16) in IFI su HEP-2 vanno refertati come ANA positivi o ANA negativi?

Le LG del GdS-AI sulla diagnosi delle malattie reumatiche autoimmuni indicano chiaramente che i *pattern* citoplasmatici debbano essere definiti ANA positivi⁴⁰ secondo la nomenclatura ICAP.⁸³ Ne consegue che i *pattern* citoplasmatico granulare AMA-like (AC-21) e citoplasmatico fibrillare filamentoso actina-like (AC-16) inclusi nella classificazione ICAP tra i *pattern* ANA debbano essere refertati come ANA positivi. Tuttavia, la positività ANA AMA-like va segnalata nel referto indicando se è stata eseguita la ricerca della specificità M2 con metodi in fase solida e se questa è risultata negativa o positiva. Il motivo principale di questo atteggiamento è che nei criteri diagnostici IAHG la positività degli ANA prevede un punteggio positivo che, a seconda del titolo, arriva fino a 3 punti, a prescindere

dall'individuazione della specificità anticorpale, mentre la positività degli AMA prevede uno *score* negativo di 4 punti.⁸⁴ Ovviamente il sistema di attribuzione del punteggio IAHG può funzionare solo se il *pattern* AMA-like confermato da metodi specifici per M2, viene considerato come ANA negativo ai soli fini della classificazione IAHG.⁸⁵

Raccomandazione. Il *pattern* AMA-like (AC-21) riscontrato in IFI su HEp-2 va segnalato nel referto come ANA positivo, indicando contestualmente se è stata eseguita la ricerca della specificità M2 con metodi immunometrici in fase solida e se questa è risultata negativa o positiva.

Qualità globale delle evidenze: bassa.

Forza della raccomandazione: debole.

1.10 Nel caso di epatite acuta e/o fulminante, nel corso del percorso diagnostico differenziale per la definizione di una possibile eziologia autoimmune, sono applicabili le stesse strategie diagnostiche già raccomandate?

È ormai noto come l'epatite autoimmune possa avere diversi fenotipi clinici definiti "non classici" nella loro presentazione che ne rendono la diagnosi e la gestione più complessa. Alcuni pazienti possono avere sintomi acuti anche con esordio fulminante, in assenza dei marcatori sierologici convenzionali.⁸⁶ Per il corretto e rapido inquadramento diagnostico nelle forme acute, potrebbe essere necessario sovvertire alcuni algoritmi già indicati nelle precedenti raccomandazioni e applicare strategie diagnostiche diverse.

Una presentazione acuta si può verificare nel 25%-75% dei pazienti con epatite autoimmune, mentre nel 3-6% si può avere una epatite a esordio fulminante, caratterizzata dallo sviluppo di encefalopatia epatica.⁸⁷ In queste forme, i criteri diagnostici per AIH non sono sempre presenti: gli ANA non vengono rilevati o risultano debolmente positivi, così come possono risultare normali i livelli di IgG. Nei casi in cui è possibile effettuare una biopsia epatica, è stato dimostrato che l'istologia supporta la natura autoimmune dell'epatite, mostrando la tipica epatite da interfaccia.⁷⁰ In questi casi è necessario effettuare velocemente la diagnosi differenziale per confermare o escludere la natura autoimmune, eseguendo contemporaneamente la ricerca degli ANA in IFI su cellule HEp-2, la ricerca degli autoanticorpi coinvolti in IFI su triplo tessuto di ratto e i test per la ricerca degli anticorpi anti-LC1 e anti-SLA con metodi immunometrici in fase solida.

Raccomandazione. Nel caso di epatite acuta e/o fulminante, per confermare o escludere la natura autoimmune è raccomandato eseguire la ricerca degli autoanticorpi più frequentemente associati a AIH in IFI su cellule HEp-2 e su triplo tessuto murino e con-

testualmente procedere alla ricerca degli autoanticorpi anti-LC1 e anti-SLA con metodiche immunometriche in fase solida.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: forte.

1.11 Nel caso di disfunzione del graft dopo trapianto di fegato, è raccomandato considerare sempre la possibilità di recidiva della epatopatia autoimmune o di epatite de novo? Sono applicabili le stesse strategie diagnostiche già raccomandate per l'identificazione di AIH?

Benché il trapianto di fegato sia un'efficace strategia terapeutica, in alcuni pazienti è possibile una ripresa della malattia epatica che si manifesta spesso quando si riduce la terapia immunosoppressiva. Molto ampia è la frequenza di recidiva (8% - 68%) che può presentarsi con un *range* temporale che va da due mesi fino a 12 anni dopo il trapianto.⁷⁰ La disfunzione tardiva del *graft* si può presentare, più spesso in soggetti pediatrici e in pazienti trapiantati per patologie diverse da AIH, che possono sviluppare una forma di epatite autoimmune definita *de novo*.⁸⁸ Non esistono criteri diagnostici specifici per l'epatite autoimmune ricorrente o *de novo*: la diagnosi viene posta in presenza di aumento delle transaminasi, ipergammaglobulinemia, autoanticorpi convenzionali e riscontro istologico di un'epatite da interfaccia. Va sottolineato che i soggetti che sviluppano epatite *de novo* risultano positivi, oltre che per i classici autoanticorpi marcatori di AIH (ANA, ASMA, LKM), per un anticorpo definito LKM-1 atipico (LKMA) che al test IFI, su triplo tessuto, mostra una fluorescenza più marcata attorno alla vena centrolobulare nel tessuto epatico e una fluorescenza sfumata dei tubuli in quello renale. Il bersaglio antigenico degli anti-LKMA è stato identificato nell'enzima *drug metabolizing glutathione-S-transferase* T1 (GSTT1), espresso in abbondanza proprio a livello degli epatociti e delle cellule dei tubuli renali.⁸⁹

Raccomandazione. Nel sospetto di epatite autoimmune in pazienti trapiantati di fegato con disfunzione del graft, sia nel caso di recidiva della malattia epatica sia nel caso di epatite autoimmune *de novo*, vanno indagati i marcatori specifici di AIH e restano valide le raccomandazioni già formulate per il *work-up* diagnostico dell'epatite autoimmune.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: forte.

1.12 Nei pazienti con diagnosi di AIH è utile il monitoraggio periodico dei livelli degli autoanticorpi?

Nelle epatiti autoimmuni, la determinazione seriale del titolo autoanticorpale di ANA e ASMA non è utile. Anche

quando presenti ad alto titolo questi anticorpi non hanno sicuramente significato patogenetico, dal momento che il titolo anticorpale non correla con la severità della malattia e il riscontro di una loro riduzione e/o assenza durante il trattamento non correla con l'efficacia del trattamento e con l'esito clinico del paziente.

Raccomandazione. Nei pazienti con diagnosi di epatite autoimmune non è indicato il monitoraggio degli autoanticorpi nel follow-up. La ripetizione può trovare indicazione solo in caso di variazioni del quadro clinico.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: debole.

Sezione 2. Colangite biliare primitiva

La colangite biliare primitiva (PBC), in precedenza nota come cirrosi biliare primitiva, è una malattia colestatica cronica del fegato nella quale i colangiociti, cioè le cellule epiteliali che rivestono i dotti biliari intraepatici, sono danneggiati con meccanismo immunomediato. Il decorso della malattia è spesso progressivo e potrebbe estendersi nel tempo anche per decenni, conducendo a fibrosi, cirrosi epatica e, in alcuni casi, a necessità di trapianto del fegato. Poiché con diagnosi e trattamento precoci molti pazienti non progrediscono verso la cirrosi, negli ultimi anni l'EASL (*European Association for the Study of the Liver*) e l'AGA (*American College of Gastroenterology*) hanno deciso di sostituire il termine "cirrosi" con il termine di "colangite", che meglio descrive il segno istologico dell'infiammazione densa che si infiltra intorno ai dotti biliari intralobulari danneggiati, pur mantenendo l'acronimo "PBC" per indicare la malattia.⁹⁰ Dal punto di vista epidemiologico, la PBC ha una prevalenza di 400 casi per milione⁹¹ e interessa prevalentemente le donne (*ratio* F/M 9:1), con età media di insorgenza tra i 40 e i 50 anni, ma può manifestarsi dai 20 fino ai 90 anni.⁹² La PBC ha una patogenesi multifattoriale: l'interazione tra fattori genetici e ambientali ne caratterizza certamente l'insorgenza e il decorso, causando la rottura della tolleranza e una risposta immunologica diretta verso la subunità E2 del complesso della piruvato-deidrogenasi (PDC-E2) presente sui mitocondri dei colangiociti.⁹³⁻⁹⁵ Dopo diagnosi differenziale per escludere eventuali cause diverse da quella autoimmune, la PBC dovrebbe essere sospettata nei pazienti con persistenti anomalie degli indici di colestasi nel siero e/o con prurito *sine causa*.⁹⁶ Un livello sierico anormale di fosfatasi alcalina (ALP), con livelli superiori a 1,5 volte il limite superiore dell'intervallo di riferimento, supportato talora dall'aumento simultaneo della gamma-glutamiltan-

TABELLA IV.—Criteri diagnostici per la colangite biliare primitiva.

La diagnosi di PBC può essere stabilita quando siano soddisfatti due dei tre criteri seguenti:

1. ALP > 2 x LSN o γ GT > 5 x LSN

2. AMA \geq 1:40

3. Biopsia epatica compatibile con lesioni duttali biliari floride

ALP: fosfatasi alcalina; LSN: limite superiore di normalità; γ GT: gamma-glutamiltanspettidasi; AMA: anticorpi anti-mitocondrio.

spectidasi (γ GT) e/o della bilirubina coniugata, è tipico nei pazienti con PBC ed è associato a duttopenia e progressione di malattia.⁹⁷

Tra i criteri diagnostici per PBC, oltre all'aumento persistente (>6 mesi) della ALP e a una biopsia epatica con istologia suggestiva di colangite cronica dei dotti biliari interlobulari, il riscontro di AMA a titolo >1:40 è considerato criterio altamente predittivo di malattia. La presenza di tutti e tre i criteri pone diagnosi di PBC definitiva, mentre, se presenti solo due criteri, la diagnosi di PBC resta probabile (Tabella IV).⁹⁷ Le più recenti raccomandazioni dell'EASL,⁹⁸ comunque, prevedono che possa essere posta diagnosi di PBC in presenza di persistenti livelli elevati di ALP e/o γ GT con positività AMA o anti-sp100 e/o anti-gp210, senza necessità della biopsia epatica. Nonostante diversi studi abbiano dimostrato che gli AMA possono comparire durante la fase asintomatica di malattia anche anni prima di segni biochimici di danno epatico,^{99, 100} è ormai chiaro che la concentrazione degli AMA non si associa alla gravità e al decorso della malattia,¹⁰¹ rendendo quindi non utile il loro monitoraggio.¹⁰²

È importante sottolineare che circa il 5-10% dei soggetti con PBC è AMA negativo, il che può portare a una diagnosi ritardata o mancata.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Nel tentativo di colmare questo *gap* diagnostico e aumentare così la sensibilità dei test sierologici, altre specificità autoanticorpali sono state identificate e correlate con la PBC: ANA rivolti contro le proteine gp210 e nucleoporina p62 (anti-gp210), la proteina sp100 (anti-sp100), la *promyelocytic leukemia protein* (anti-PML),¹⁰⁶ e altri marcatori di più recente scoperta quali anti-*kelch-like 12* and anti-*hexokinase 1*.¹⁰⁷ Inoltre, in un sottogruppo di pazienti, possono essere riscontrati altri ANA non specifici per PBC, in particolare autoanticorpi anti-centromero (anti-CENP) che determinano su cellule HEp-2 un *pattern* fluoroscopico puntiforme, uniformemente distribuito nelle cellule in interfase e allineato a livello della cromatina nelle cellule mitotiche (AC-3). Il riscontro di anticorpi anti-CENP può suggerire la presenza di una concomitante sclerosi sistemica.¹⁰⁸

La Tabella V descrive i vari autoanticorpi, i rispettivi autoantigeni e la loro localizzazione.

TABELLA V.—Anticorpi nella diagnosi di PBC.

Anticorpo	Antigene	Note
AMA	Subunità E2 del complesso della piruvato-deidrogenasi (PDC-E2)	Presente nei criteri diagnostici per PBC
ANA/anti-gp210	Proteine gp210 e nucleoporina p62	Pattern in IFI specifico puntiforme della membrana nucleare (HEp-2)
ANA/anti-sp100	Proteine sp100	Pattern in IFI specifico per multipli dot nucleari (HEp-2)
ANA/anti-centromero	Proteina CENP-B del centromero	Pattern in IFI specifico per fluorescenza puntiforme (40-80/cellula) allineata a livello della cromatina nelle cellule mitotiche (HEp-2)

AMA: anticorpi anti-mitocondrio; ANA: anticorpi anti-nucleo.

I criteri richiesti per stabilire la diagnosi di PBC riescono a identificare la maggior parte dei pazienti con PBC, ma non tutti.¹⁰⁹ La diversità della loro presentazione clinica e sierologica può, infatti, suscitare alcune ambiguità e condurre ad un ritardo nella diagnosi. Sono possibili diversi scenari che, se adeguatamente osservati e monitorati, possono essere di supporto per un precoce inquadramento della malattia già in fase di diagnostica di laboratorio.¹¹⁰ La PBC può essere diagnosticata se:

- scenario 1:
 - aumento persistente (>6 mesi) di ALP con AMA positivi (titolo IFI >1:40 o superiore al *cutoff* per i metodi immunometrici) in assenza di altre malattie epatiche e sistemiche;
- scenario 2:
 - aumento persistente (>6 mesi) di ALP con AMA negativi e test specifici ANA negativi e biopsia epatica che mostra colangite cronica non suppurativa dei dotti biliari di piccolo e medio calibro;
- scenario 3:
 - aumento persistente (>6 mesi) di ALP con AMA negativi ma positivi per ANA con specificità per sp100 (AC-6) o gp210 (AC-11).

Inoltre, tenendo conto dei tre possibili scenari descritti e, quindi, dei tre sottogruppi sierologici di pazienti (a) AMA positivi, ALP elevata; b) AMA negativi, ALP elevata; c) AMA negativi, anti-gp210 e/o anti-sp100 positivi e ALP elevata) è necessario considerare che, in realtà, possono presentarsi un numero di scenari più sfumati e anche clinicamente rilevanti, come ad esempio pazienti AMA negativi con ALP normale ma con γ GT elevata o, ancora, pazienti AMA positivi con enzimi di colestasi e funzionalità epatica normali. Ci sono dati molto limitati su questi pazienti, ma dagli studi pubblicati sembra che la positività per AMA in pazienti con o senza alterazioni degli enzimi epatici possa essere indicativa di PBC latente.^{99, 111} Per questi pazienti è raccomandato il monitoraggio della funzionalità epatica (ogni 6-12 mesi) per essere certi che non manifestino altri segni clinici e sierologici di PBC.

Considerata la variabilità nel profilo immunologico, si dimostra ancora una volta fondamentale la consulenza del professionista di Laboratorio per la scelta dei test diagnostici più appropriati, della metodologia analitica più accurata e dell'algoritmo da seguire nei vari approfondimenti della diagnostica per PBC e nel *follow-up* dei pazienti con le caratteristiche di malattia latente.

2.1 Nei soggetti con sospetto di PBC, la ricerca degli AMA eseguita con metodi immunometrici monoplex e/o multiplex è caratterizzata da performance paragonabili alla consolidata metodologia in IFI su triplo tessuto murino?

Punto di forza per la diagnosi di PBC è la presenza nel siero degli AMA: essendo riscontrabili ad elevato titolo in circa il 90-95% dei pazienti, essi rappresentano il marcatore più sensibile e più specifico per la malattia.¹⁴ In realtà, con il termine AMA si identifica un gruppo eterogeneo di nove autoanticorpi (M1-M9) diretti contro vari antigeni localizzati sulla membrana mitocondriale;¹¹² tra questi, solo gli anti-M2 sono rilevanti per la diagnosi di PBC in quanto presenti a titolo elevato nel siero di quasi tutti i pazienti.¹¹³ L'antigene M2 è costituito da un complesso di diversi autoantigeni e gli autoanticorpi presenti nella PBC possono essere rivolti verso: a) la subunità E2 del complesso della piruvato deidrogenasi (PDC-E2), rinvenibili con maggiore frequenza; b) la subunità E2 del *branched-chain* chetoacido deidrogenasi (BCOADC), presenti nella metà dei pazienti con PBC; c) la subunità E2 del complesso ossiglutarico deidrogenasi (OGDC), riscontrati nei due terzi dei soggetti affetti dalla malattia.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Il metodo IFI su sezioni di triplo tessuto è considerato il *gold standard* per il rilevamento degli AMA. Sul rene, gli anticorpi anti-M2 determinano una fluorescenza citoplasmatica granulare che interessa tutte le cellule tubulari, con una intensità maggiore a livello dell'epitelio dei tubuli distali. L'esperienza dell'operatore è determinante per eliminare la possibilità di confusione derivante dalla positività di anticorpi anti-LKM che reagiscono soltanto con il terzo distale dei tubuli contorti prossimali, come già de-

scritto nella sezione di questo documento dedicato a questi autoanticorpi (vedi raccomandazione 1.6). Sulle sezioni di stomaco, la presenza di anticorpi anti-M2 può essere rilevata da un quadro di fluorescenza diffusa che interessa sia le cellule parietali che quelle principali, differenziandosi così dalla positività prodotta dagli anticorpi anti-cellule parietali gastriche che reagiscono soltanto contro le cellule parietali. Infine, nel fegato la presenza di AMA conferisce una fluorescenza di aspetto granulare più grossolano rispetto a quella già descritta per lo stesso tessuto dagli anti-LKM, con fluorescenza più fine e molto intensa. L'analisi contestuale in IFI di tutti i tre principali tessuti è di ausilio per una corretta interpretazione del quadro sierologico.

Tuttavia, la tecnica IFI per la ricerca degli AMA non è in grado di fornire informazioni per quanto riguarda la specificità antigenica e, in presenza di reattività anticorpale concomitante, il *pattern* fluoroscopico può essere difficile da interpretare. Poiché il rilevamento accurato degli AMA è importante per stabilire la diagnosi o predire l'insorgenza di PBC,¹¹⁷ risulta spesso necessaria l'applicazione di metodi addizionali per aumentare l'accuratezza diagnostica, come ELISA, FEIA, CLIA o *immunoblot* che utilizzano l'antigene M2 o il complesso antigenico MIT3, ottenuto dalla combinazione dei tre principali epitopi immunodominanti riconosciuti dagli AMA (PDC-E2, BCOADC-E2 e OGDC-E2).¹¹⁸ Diversi studi indicano che, rimanendo uguale la specificità, la sensibilità diagnostica degli anticorpi anti-M2/MIT3 riscontrati con questi metodi è elevata e, in alcuni casi, superiore a quella degli AMA rilevati in IFI.^{105, 119-121} Ulteriore vantaggio dell'utilizzo di questi metodi è quello di essere scevri dalla soggettività interpretativa dei metodi IFI e essere completamente automatizzabili.

Raccomandazione. Il metodo IFI su sezioni di triplo tessuto rappresenta ancora oggi un approccio metodologico affidabile e conveniente come test di primo livello per la ricerca degli AMA. In caso di un quadro di fluorescenza suggestivo per AMA, è opportuno eseguire un test di conferma per l'antigene M2/MIT3 con metodi a più elevata specificità come ELISA, CLIA, FEIA o *immunoblot*. Tuttavia, la ricerca degli AMA può essere eseguita direttamente con metodi immunometrici o di *immunoblot*.

Qualità globale delle evidenze: alta.

Forza della raccomandazione: forte.

2.2 Nei pazienti con sospetto di PBC, se la ricerca degli AMA è eseguita in IFI, su quale substrato e a quale diluizione di screening va eseguita?

Il metodo IFI è stato a lungo considerato il *gold standard* per la ricerca degli AMA: essi sono così rilevabili su sezioni

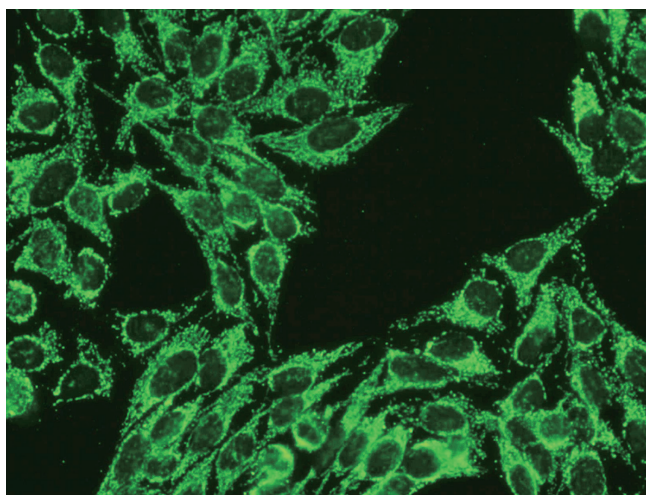


Figura 4.—*Pattern* AMA-like su cellule HEP-2 (IFI, 200x).

di triplo tessuto murino (fegato/rene/stomaco) a partire da un titolo di 1:40 o di 1:80 in base alla probabilità pre-test, in analogia con quanto previsto per gli altri autoanticorpi ricercati su triplo tessuto (vedi sezioni 1.5 e 1.6). È inoltre possibile un riscontro, spesso anche occasionale nel corso di ricerca di ANA, su linee cellulari HEP-2, con caratteristiche suggestive di AMA:¹²² su questo substrato, sul quale si raccomanda una diluizione iniziale di 1:80, è possibile rilevare un quadro fluoroscopico citoplasmatico a granuli grossi e irregolari, definito quadro “AMA-like” (Figura 4). In entrambi i casi è fondamentale eseguire un test di conferma per determinarne la specificità verso la subunità M2.¹²³

Raccomandazione. La ricerca degli AMA con metodica IFI va effettuata su triplo tessuto murino utilizzando una diluizione di *screening* di 1:40 nei laboratori specialistici a cui afferiscono soggetti con alta probabilità pre-test di PBC e di 1:80 nei laboratori generali.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: debole.

2.3 Nei soggetti con sospetta PBC ma negativi per AMA, è utile la ricerca degli ANA con metodo IFI su cellule HEP-2?

Oltre agli AMA, circa il 30% dei pazienti affetti da PBC presenta nel siero altri autoanticorpi dotati di elevata specificità e rivolti contro *target* antigenici nucleari evidenziabili in IFI su cellule HEP-2: si tratta di anticorpi diretti contro le proteine gp210 e nucleoporina p62 (evidenziabili con *pattern rim-like* – AC-12) e due autoanticorpi – anti-sp100 e anti-PML – che colocalizzano nel nucleo e determinano un *pattern* definito *multiple nuclear dots* (AC-6) (fluorescenza di 5-20 punti di variabili dimensioni all'in-

terno del nucleo e non nel nucleolo).^{124, 125} Le specificità coinvolte vengono confermate con metodo immunometrico in fase solida o con *immunoblot*, che utilizzano antigeni sp100 e gp210 purificati per la rilevazione dei relativi anticorpi. La ricerca di questi autoanticorpi aumenta la sensibilità diagnostica dei test immunologici per la diagnosi di PBC permettendo di identificare i pazienti affetti da colestasi AMA negativi ma positivi per anti-sp100 e/o gp210.^{46, 123-125} La determinazione dei test ANA specifici per PBC è raccomandata anche dalle linee guida formulate dall'EASL⁹⁸ e dall'*American Association for the Study of the Liver Diseases* (AASLD).¹²⁶

Negli ultimi anni, l'applicazione di tecniche proteomiche ha permesso di evidenziare la presenza di altri autoanticorpi dotati di elevata specificità per la diagnosi di PBC.^{107, 127} Si tratta di due autoanticorpi rivolti verso il complesso enzimatico *kelch-like 12* e verso la *esochinasi I*. Va detto che a fronte di una bassa sensibilità per entrambi i metodi, la specificità di questi due anticorpi è di circa il 95%. Pertanto la loro determinazione potrà servire a ridurre ulteriormente il *gap* sierologico dei pazienti affetti da PBC ma negativi per tutti gli altri marcatori autoanticorpali.¹⁰⁷

I test *multiplex* rappresentano un metodo eccellente non solo per confermare i risultati in IFI ma anche per valutare i casi in cui la presentazione clinica è ambigua e il quadro sierologico non è chiaro.

Nei laboratori di riferimento specializzati, dove la prevalenza di autoanticorpi associati alla PBC è maggiore, la possibilità di testare contemporaneamente tutti gli anticorpi specifici rilevanti per PBC e definire meglio le sottospecificità AMA, identifica i *multiplex* come test di prima linea più vantaggiosi e senz'altro più rapidi.¹²⁸ Come già accennato, in un sottogruppo di pazienti con *overlap* PBC/sclerosi sistemica possono essere presenti anticorpi anti-centromero.¹⁰⁸

Raccomandazione. Nei pazienti con sospetta PBC che siano risultati negativi per AMA, è utile ricercare autoanticorpi anti-gp210 e/o anti-sp100, associati a *pattern* fluoroscopici membrana nucleare (*rim-like*, AC-12) e *multiple nuclear dots* (AC-6). È sempre utile confermare le suddette positività utilizzando metodi dotati di maggiore specificità analitica rispetto all'IFI, quali *immunoblot*, ELISA, FEIA o CLIA. Nel caso di sospetta sindrome da *overlap* con sclerosi sistemica limitata cutanea, si raccomanda anche la ricerca di anticorpi anti-centromero (CENP).

Qualità globale delle evidenze: alta.

Forza della raccomandazione: forte.

2.4 Nei soggetti con sospetto diagnostico di PBC, in caso di positività citoplasmatica AMA-like (AC-21) in IFI su cellule HEP-2, è utile riportare nel referto il pattern di fluorescenza?

Abbiamo già descritto, nella sezione precedente di questo documento, come sempre più laboratori clinici riportino le reattività riscontrate in IFI su HEP-2 associando il codice corrispondente al *pattern*, secondo nomenclatura ICAP.³⁹ La refertazione del *pattern* AMA-like, spesso rilevato incidentalmente mentre si esegue il test ANA in IFI (*case finding*) ha un enorme potenziale diagnostico per PBC soprattutto se confermato con metodi specifici per AMA-M2,¹²² in quanto la presenza di AMA costituisce uno dei criteri di malattia e può essere presente già molti anni prima dell'esordio clinico. In questi casi è obbligatorio confermare il riscontro con metodi analitici più specifici, perché se il *pattern* citoplasmatico suggestivo per la presenza di AMA non venisse confermato e correttamente refertato, potrebbe condurre a errate interpretazioni circa le positività citoplasmatiche e/o anti-nucleari e alla richiesta inappropriata di test di conferma.

Raccomandazione. Nel sospetto di PBC, nella refertazione del *pattern* citoplasmatico/reticolare/AMA-like (AC-21) riscontrato con metodo IFI su cellule HEP-2, si raccomanda che il laboratorio confermi la presenza di AMA con metodi analitici specifici per AMA-M2, riportando il *pattern* IFI secondo nomenclatura ICAP.

Qualità globale delle evidenze: alta.

Forza della raccomandazione: forte.

2.5 Nei pazienti affetti da PBC o a rischio di sviluppare la malattia, una caratterizzazione completa del profilo sierologico coinvolto può dare indicazioni per una stratificazione del rischio e/o permettere una correlazione tra fenotipo clinico e sierologico?

Se da tempo è noto che la concentrazione degli AMA non correla con la severità della malattia,¹⁰¹ sembra invece che in alcuni pazienti la presenza di anticorpi anti-gp210 correli con una prognosi più sfavorevole.¹⁰⁷ Inoltre, uno studio preliminare ha evidenziato come i pazienti con positività per anti-esochinasi I presentino livelli più elevati di γ GT e IgM e una sopravvivenza post-trapianto più bassa, palesando quindi un possibile ruolo prognostico di questo nuovo marcatore.¹²⁹ Anche la presenza di anticorpi anti-centromero è stata correlata allo sviluppo di un fenotipo ipertensivo portale.^{106, 130, 131}

Raccomandazione. Nei pazienti affetti da PBC si raccomanda la ricerca di un profilo autoanticorpale immunosierologico completo, importante sia dal punto di vista diagnostico che prognostico. Anticorpi anti-gp210

sono stati più frequentemente osservati nei pazienti con forme cliniche di PBC più severe e la presenza di anticorpi anti-centromero è stata correlata allo sviluppo di un fenotipo ipertensivo portale.

Qualità globale delle evidenze: bassa.

Forza della raccomandazione: debole.

2.6 Nei pazienti con diagnosi di PBC è utile il monitoraggio periodico dei livelli degli autoanticorpi?

Non vi sono chiare evidenze che il titolo degli AMA possa correlare con lo stadio della PBC e che la sua fluttuazione nel tempo possa avere significato clinico: gli AMA vengono testati solo a scopo diagnostico e la loro ripetizione è indicata solo nei casi sieronegativi ma con forte sospetto clinico di PBC.^{81, 132} Tuttavia, in uno studio cinese molto recente è stato tuttavia riscontrato come la concentrazione degli AMA-M2 misurata con metodo CLIA in pazienti con PBC sia risultata significativamente associata alla comparsa di cirrosi epatica.¹³³ E' dunque possibile che quando gli AMA vengono misurati con metodi quantitativi e più oggettivi dell'IFI, il livello anticorpale possa dare indicazioni prognostiche. Ovviamente, ulteriori studi sono necessari per confermare questa associazione.

Raccomandazione. Nei pazienti con diagnosi di PBC non è indicato il monitoraggio degli autoanticorpi nel follow-up.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: debole.

Sezione 3. Colangite sclerosante primitiva (PSC)

La colangite sclerosante primitiva (PSC) è una malattia epatica a impronta colestatica, caratterizzata da un processo infiammatorio e fibrotico che interessa i dotti biliari intra ed extraepatici.^{134, 135} La PSC è un disordine che conduce progressivamente a cirrosi, insufficienza epatica fino al trapianto e al possibile sviluppo di neoplasie. La sua eziologia è sconosciuta, ma è verosimile che siano coinvolti fattori di suscettibilità genetica.^{136, 137} L'età media alla diagnosi è di circa 40 anni con un rapporto maschio/femmina di circa 2:1, ma può comparire a tutte le età, sia nei bambini che negli anziani. La PSC è fortemente associata (fino all'80%)¹³⁶ a un fenotipo unico di malattia infiammatoria intestinale (IBD) che nella maggior parte dei casi è diagnosticata come colite ulcerosa. Il paziente affetto da PSC è quindi spesso un uomo giovane o di mezza età, affetto da IBD e che presenta segni biochimici e/o clinici di una malattia epatica colestatica.

La PSC è solitamente caratterizzata da un tipico profilo

colestatico degli enzimi epatici, con un'elevata concentrazione della fosfatasi alcalina e della γ GT, non altrimenti giustificata. La diagnosi è oggi stabilita grazie a tecniche di *imaging*, quali la risonanza magnetica colangio-pancreatografica o la colangio-pancreatografia retrograda endoscopica, quest'ultima dotata di una sensibilità leggermente superiore per i piccoli dotti biliari e il dotto extraepatico, ma associata a maggior frequenza di complicazioni.¹³⁸ La biopsia epatica di solito non è necessaria per stabilire la diagnosi¹³⁹ a meno che non si sospetti una concomitante AIH o PSC dei piccoli dotti.¹⁴⁰

Sono stati anche osservati livelli elevati di IgG (circa 61% dei pazienti) fino a 1,5 volte il limite normale superiore.¹⁴¹ In una piccola quota di pazienti (9%) sono stati riscontrati elevati livelli di IgG4. Non è chiaro se alcuni di questi soffrivano di una forma di colangite definita "associata a IgG4" (IAC) piuttosto che PSC.¹⁴² La IAC entra in diagnosi differenziale con la PSC in quanto può mostrare un *pattern* colangiografico simile;¹⁴² poiché i pazienti con IAC di solito traggono beneficio dal trattamento con corticosteroidi, in tutti i pazienti con sospetta PSC dovrebbero essere misurati i livelli sierici di IgG4.¹⁴³ Tuttavia, anche il 10-12% dei pazienti con PSC classica potrebbe avere aumentati i livelli di IgG4.¹⁴² Ad oggi non è chiaro se i pazienti affetti da IAC rappresentino un sottogruppo di PSC con una diversa presentazione clinica o decorso di malattia.

Sebbene siano stati descritti vari anticorpi sierici nei pazienti con PSC, la sierologia immunitaria è generalmente considerata aspecifica e quindi di scarso valore per stabilire la diagnosi.^{97, 143}

Gli anticorpi più diffusi nel siero dei pazienti con PSC sono i P-ANCA, che possono essere riscontrati fino al 93% dei pazienti, seguiti dagli ANA e dagli ASMA, ma nessuno di questi anticorpi può essere considerato specifico per PSC.¹⁴⁴ Anche i P-ANCA si trovano, infatti, frequentemente nei pazienti con colite ulcerosa senza PSC, in pazienti con AIH e, in misura minore, nella PBC.^{20, 145}

Nella PSC il *pattern* P-ANCA è definito "atipico" come lo è la localizzazione nucleare del suo antigene putativo, rispetto alla localizzazione citoplasmatica della mieloperoxidasi, antigene responsabile del P-ANCA "classico" associato alle vasculiti.

3.1 Nei pazienti con sospetto clinico di PSC, è utile la ricerca in IFI degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili?

Gli ANCA sono ricercati in IFI utilizzando un substrato di granulociti umani fissati in alcol; questa tecnica consente di differenziare i P-ANCA (*pattern* fluoroscopico perinu-

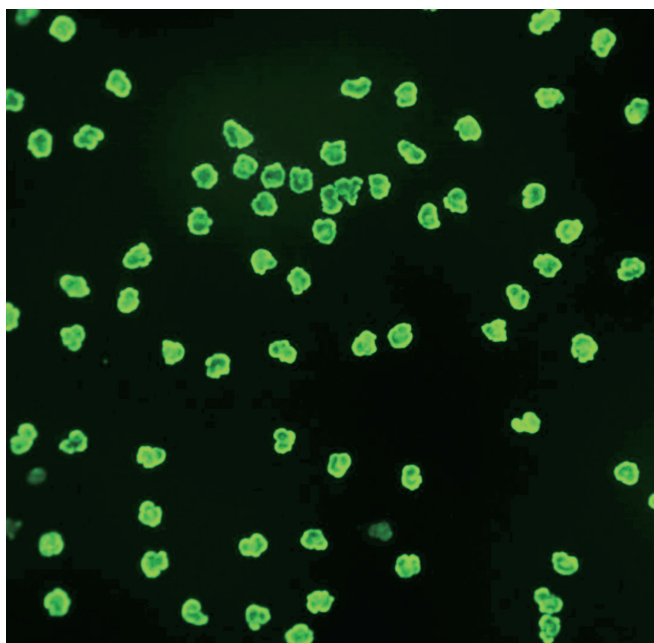


Figura 5.—*Pattern* ANCA atipico (IFI, 200x).

cleare) correlati alla presenza di anticorpi anti-mieloperoossidasi, dai C-ANCA con *pattern* fluoroscopico citoplasmatico dovuto alla presenza di anticorpi anti-proteinasi 3. Nella PSC il *pattern* è caratteristicamente P-ANCA “atipico” (Figura 5), con colorazione spessa e disomogenea intorno alla periferia nucleare e possibili foci fluorescenti intranucleari. Il P-ANCA “classico” presenta, invece, una colorazione sottile sul bordo del citoplasma perinucleare e questi anticorpi si trovano prevalentemente nei pazienti con poliangiote microscopica.¹⁴⁶ Il principale antigene bersaglio responsabile del *pattern* P-ANCA atipico è probabilmente costituito dall'isoforma 5 della beta-tubulina (TBB-5)²¹ situata all'interno del nucleo cellulare e non nel citoplasma.^{147, 148} È interessante notare che gli anticorpi responsabili di questo quadro P-ANCA atipico reagiscono in modo incrociato con la FtsZ, una proteina strutturale presente nelle cellule procariotiche e definita anche “simil-tubulinica” a causa della somiglianza tridimensionale con la tubulina. La FtsZ è considerata un antenato evolutivo di TBB-5 ed è abbondante nei batteri dell'intestino umano.²¹ Ciò evidenzia non solo come le risposte immunitarie verso i batteri commensali potrebbero essere implicate nella patogenesi della PSC ma suggerisce un *link* tra IBD e PSC. Per la scarsa accuratezza diagnostica (bassa specificità), la ricerca degli anticorpi P-ANCA non è consigliata nella diagnosi di PSC.

La presenza di P-ANCA è stata recentemente associata

ad un quadro clinico distinto di PSC in pazienti più giovani all'esordio della malattia e a minor rischio di colangiocarcinoma,¹⁴⁹ ma questi dati necessitano di ulteriori riscontri.

Raccomandazione. La ricerca di ANCA con *pattern* fluoroscopico P-ANCA atipico non è utile nella diagnosi di PSC in quanto questi anticorpi non sono specifici per PSC. La diagnosi a oggi resta basata sulla diagnostica per immagini.

Qualità globale delle evidenze: moderata.

Forza della raccomandazione: debole.

3.2 Nei pazienti con sospetto diagnostico per PSC, la ricerca di altri anticorpi oltre agli ANCA può aggiungere indicazioni per un più preciso inquadramento diagnostico?

Il riscontro di ANA e ASMA in alcuni pazienti affetti da PSC non si è dimostrato di ausilio diagnostico per la loro bassa specificità.¹⁴⁴ Tuttavia, il riscontro di positività per questi anticorpi può essere rilevante in un sottogruppo di pazienti con PSC, sia adulti che bambini, per supportare un sospetto di concomitanti malattie autoimmuni (sindrome da sovrapposizione PSC-AIH)^{150, 151} con implicazioni terapeutiche diverse.

Recentemente, nel siero di pazienti con PSC sono stati rilevati anticorpi di classe IgA contro la glicoproteina 2 (IgA anti-GP2), precedentemente collegati a forme gravi di malattia di Crohn, con una prevalenza del 46,7-71,5%.¹⁵² La presenza di IgA anti-GP2 risulta fortemente associata al coinvolgimento del grande dotto biliare, allo sviluppo di colangiocarcinoma e all'aumento della mortalità.¹⁵³ Pertanto, gli anticorpi anti-GP2 potrebbero rappresentare un nuovo biomarcatore per la stratificazione del rischio nei pazienti con PSC. Suggestivo appare il coinvolgimento della GP2 nelle risposte immunitarie della mucosa intestinale ai batteri intestinali.^{154, 155} tale evidenza fornirebbe un ulteriore collegamento fisiopatologico al microbiota intestinale recentemente indagato nei pazienti con PSC.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Altri lavori hanno evidenziato un possibile ruolo della proteinasi 3 (PR3) quale *marker* di PSC, sia nell'adulto che nel bambino. Anticorpi anti-PR3 erano presenti in un numero significativamente più elevato ($p < 0.0001$) di pazienti con PSC rispetto ai controlli.¹⁵⁹ In una coorte di pazienti pediatrici con IBD, gli anticorpi anti-PR3 erano positivi nel 68% di coloro a cui era stata diagnosticata PSC, contro il 32% dei pazienti senza PSC ($p < 0.001$); inoltre, i pazienti anti-PR3 positivi mostravano livelli più elevati di γ GT, ALT e AST ($p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p < 0.006$, rispettivamente), facendo ipotizzare un possibile ruolo degli anticorpi anti-PR3 come *marker* prognostico negativo.¹⁶⁰ Questa ipotesi è stata confermata in un successivo lavoro, in cui

gli anti-PR3 risultavano essere un *marker* indipendente di malattia più severa, di maggior frequenza di trapianto e di ridotta sopravvivenza nei pazienti con PSC.¹⁶¹ Infine, un recente lavoro ha evidenziato come, in un'ampia corte di pazienti con PSC, entrambi i marcatori anti-GP2 e anti-PR3 siano predittori indipendenti di severità di malattia, capaci di identificare pazienti a rischio, con ridotta sopravvivenza e aumentata frequenza di colangiocarcinoma.¹⁶²

Raccomandazione. Un profilo sierologico autoimmune per patologie epatiche a genesi autoimmune (ricerca di ANA e ASMA) non è utile per la diagnosi o per la stratificazione del rischio nei pazienti con sospetta PSC ma può essere utile per evidenziare eventuali sindromi da sovrapposizione.

Qualità globale delle evidenze: bassa.

Forza della raccomandazione: debole.

Sindromi overlap

Nell'ambito delle patologie epatiche autoimmuni vanno annoverate anche le sindromi da sovrapposizione o SO, caratterizzate da contemporanea presenza delle caratteristiche cliniche-laboratoristiche delle singole patologie epatiche autoimmuni già descritte. Dati presenti in letteratura riportano sovrapposizione AIH/PBC in quasi il 7-13% degli adulti con AIH o PBC^{163, 164} mentre generalmente si riscontra una sovrapposizione AIH/PSC nel 6-17% dei bambini e dei giovani adulti affetti da AIH e PSC.^{163, 165, 166} Le SO epatiche si presentano generalmente con sintomi aspecifici, come ad esempio affaticamento, artralgia e mialgia, ma i pazienti presentano entrambi i profili biochimici caratteristici di epatite e di colestasi, positività autoanticorpale e caratteristiche istologiche compatibili.¹⁶⁷ Tuttavia, alcuni pazienti con AIH possono presentare segni di colestasi in assenza delle caratteristiche di PBC o PSC: sono state infatti segnalate forme di transizione come, ad esempio, la *overlap* AIH con colangite autoimmune, in assenza di anticorpi anti-mitocondrio e definita AIH/PBC AMA-negativa.^{163, 168}

Le maggiori sfide nella gestione delle SO restano la corretta diagnosi e il trattamento terapeutico. Nella pratica clinica è infatti molto importante differenziare una SO epatica dalle forme isolate delle malattie, perché l'approccio terapeutico è diverso (corticosteroidi *vs.* acido ursodesossicolico). Ad oggi, tuttavia, non disponiamo di specifici criteri diagnostici per le SO: ne sono stati proposti diversi, soprattutto per AIH/PBC, tenendo conto che l'applicazione dello *scoring system* approvato da IAHG per l'epatite autoimmune risulta inappropriata nei pazienti con AIH/PBC con AMA positivi, poiché la loro positività ha un

peso rilevante negativo (-4 punti) nel calcolo dello *score* per la definizione di una AIH.¹⁶⁹ L'applicazione dei *Paris criteria*, per i quali era obbligatoria l'evidenza istologica di epatite da interfaccia per la diagnosi di SO AIH/PBC, non ha trovato riscontro quando valutati su grandi coorti di pazienti.¹⁷⁰ Recentemente sono stati proposti nuovi criteri nei quali il sistema di punteggio è molto articolato, comprende tutti gli aspetti importanti della presentazione biochimica, immunologica e istologica nei pazienti con SO e mostra elevata sensibilità e specificità nella popolazione arruolata, ma studi multicentrici saranno necessari per la loro validazione.¹⁷¹

Muratori *et al.* hanno riscontrato la concomitante positività di anti-dsDNA e AMA nel 47% dei pazienti con *overlap* AIH/PBC, suggerendo che la contemporanea presenza dei due autoanticorpi possa essere il marcatore immunologico della sindrome da sovrapposizione AIH/PBC.¹⁷² Si conferma ancora una volta, come già raccomandato nella sezione dedicata alle epatiti autoimmuni, l'importanza di identificare gli ANA nelle patologie epatiche autoimmuni mediante IFI utilizzando cellule HEp-2 come substrato, poiché questo è l'unico metodo per garantire la corretta identificazione di *pattern* fluoroscopici di rilevanza diagnostica come il *pattern* omogeneo, fortemente suggestivo della presenza di anticorpi anti-cromatina nelle cellule in fase mitotica.^{173, 174}

Per la diagnosi della sindrome da sovrapposizione AIH/PSC, non ci sono criteri definiti, se non la presenza di ANA, ASMA e un'istologia epatica compatibile con PSC, caratteristica distintiva della sindrome.¹⁷⁵ Infine, la coesistenza di PBC e PSC è stata documentata in un unico caso.¹⁶³

Non è possibile formulare raccomandazioni nel sospetto di SO tra malattie epatiche autoimmuni in quanto non sono applicabili i criteri diagnostici in uso per l'inquadramento delle singole patologie. I risultati ottenuti dagli *scoring system* non possono prescindere dal giudizio clinico: va sconsigliata la loro errata applicazione o la sovrainterpretazione dei loro risultati. Nel sospetto di SO epatica andrebbero ricercati gli autoanticorpi specifici delle patologie coinvolte e nel caso di AIH/PBC potrebbe essere indagata la concomitante presenza di anticorpi anti-dsDNA e AMA.

Considerazioni conclusive

Come sintesi delle raccomandazioni inserite in queste linee guida, il GdS-AI propone un approccio razionale da applicare nel caso di epatopatia a eziologia sconosciuta e nel sospetto della sua natura autoimmune, come descritto nell'algoritmo diagnostico di Figura 6.

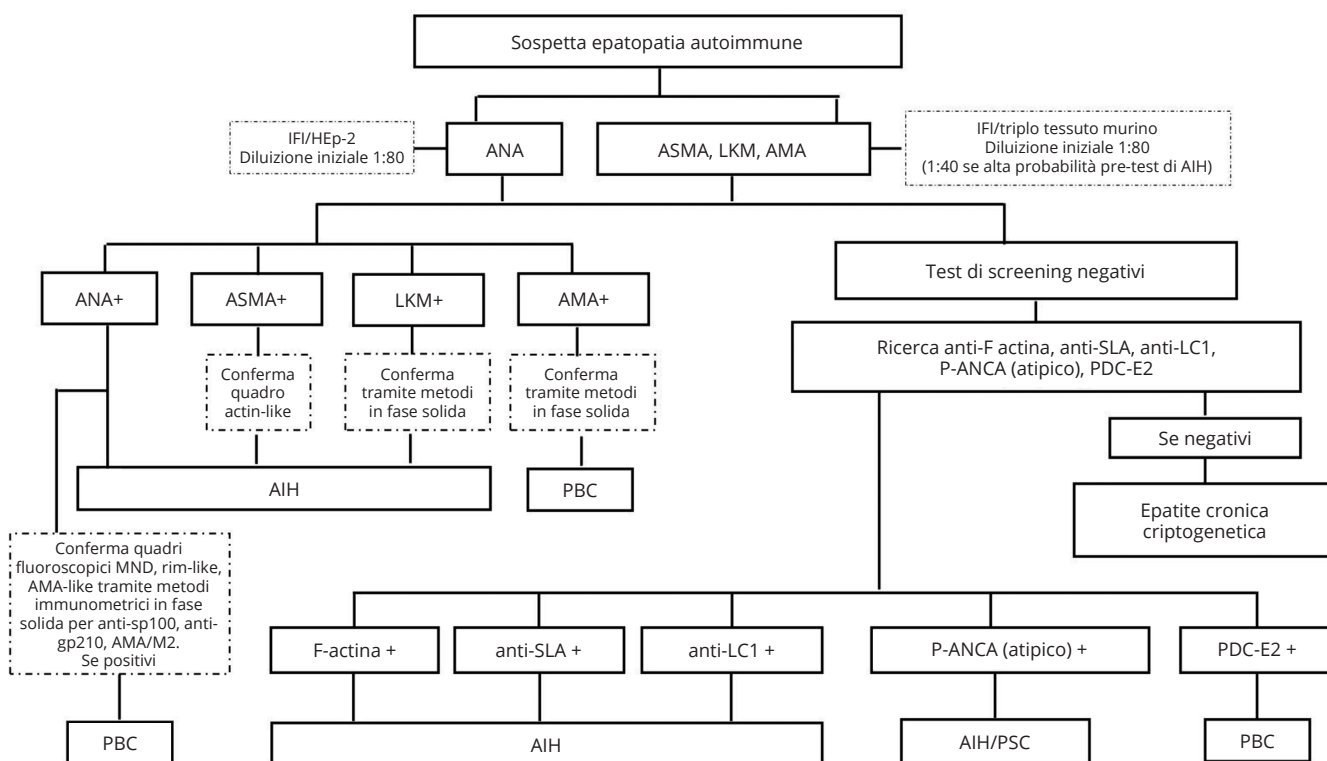


Figura 6.—Algoritmo diagnostico di Laboratorio in caso di sospetta epatopatia di origine autoimmune.

Infine, concludiamo questa serie di raccomandazioni sulla diagnostica delle epatopatie autoimmuni con alcune puntualizzazioni di carattere generale che riteniamo di notevole impatto per il laboratorio clinico.

La diagnostica delle malattie autoimmuni del fegato, come la clinica di queste malattie, è molto complessa e articolata e la diagnosi è sempre frutto della sinergia tra clinica e laboratorio. La ricerca di autoanticorpi dovrebbe essere effettuata in forma selettiva e solo quando vi sia un consistente sospetto di malattia. Se il sospetto clinico è basso, la gran parte dei risultati positivi a basso titolo è probabilmente un falso positivo e può portare alla richiesta di inutili test addizionali e a un trattamento inappropriato. Poiché nelle malattie epatiche esistono numerose situazioni di sovrapposizione sintomatologica e sierologica che rendono difficile l'interpretazione dei dati, le richieste di esami di laboratorio dovrebbero sempre includere il sospetto diagnostico e le notizie cliniche, per aumentare la specificità dei risultati. Un'ottimale utilizzazione dei test per la diagnostica autoanticorpale richiede che le procedure vengano preliminarmente concordate tra medico clinico e immunologo di laboratorio, che venga sviluppato un algoritmo e che gli esami vengano effettuati secondo una corretta

sequenza.^{176, 177} Consapevoli degli attuali scenari di laboratorio in cui spesso il test viene eseguito senza la conoscenza del dato clinico (diagnosi/sospetto diagnostico), riteniamo di suggerire fortemente che almeno per i campioni risultati positivi vengano richieste informazioni cliniche in modo da consentire una corretta interpretazione del risultato e poter inserire nel referto un commento interpretativo, soprattutto quando vi sia discordanza tra i diversi test eseguiti.

Bibliografia

1. Villalta D. Diagnostica di laboratorio delle epatiti autoimmuni. Riv Ital Med Lab 2010;6:261–5.
2. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al.*; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. Hepatology 2010;51:2193–213.
3. Graham R, Mancher M, Miller Wolman D, Greenfield S, Steinberg E. IOM. Clinical Practice Guidelines We Can Trust. Washington DC: The National Academic Press; 2011.
4. Linee Guida di Medicina di Laboratorio (LGML) – Metodologia 20/01/2018 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.sipmel.it/it-lineeguida/metodologia/110139> [citato 30 gennaio 2024].
5. Linee Guida di Medicina di Laboratorio (LGML) – Aggiornamento 19/05/2023 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.sipmel.it/it-lineeguida/metodologia/110139> [citato 30 gennaio 2024].

6. NACB. Standard Operating Procedures for Preparing, Publishing and Revising National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines. Including Review and Approval of External Society/Organization Guidelines for Endorsement and Support by AACB/NACB 2014.
7. Schünemann HJ, Oxman AD, Brozek J, Glasziou P, Jaeschke R, Vist GE, *et al.*; GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies. *BMJ* 2008;336:1106–10.
8. Cappelletti P. Clinical practice guidelines and SIPMeL (Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine). *Riv Ital Med Lab* 2015;11:185–90. [Italiano.]
9. Lv T, Li M, Zeng N, Zhang J, Li S, Chen S, *et al.* Systematic review and meta-analysis on the incidence and prevalence of autoimmune hepatitis in Asian, European, and American population. *J Gastroenterol Hepatol* 2019;34:1676–84.
10. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet* 1973;1:735–7.
11. Vergani D, Mieli-Vergani G. Cutting edge issues in autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:309–21.
12. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, *et al.*; International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169–76.
13. Bizzaro N. Flow charts nella diagnosi delle malattie autoimmuni. *Riv Med Lab* 2004;5:110–4.
14. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cançado EL, Mackay IR, Manns MP, *et al.*; International Autoimmune Hepatitis Group. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004;41:677–83.
15. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2015;63:971–1004.
16. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Büschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987;1:292–4.
17. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Fairfax A, Swana G, Doniach D, Groeschel-Stewart U. Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1976;29:403–10.
18. Rigopoulou EI, Roggenbuck D, Smyk DS, Liaskos C, Mytilinaiou MG, Feist E, *et al.* Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found. *Autoimmun Rev* 2012;12:260–9.
19. Villalta D, Mytilinaiou MG, Elsner M, Hentschel C, Cuccato J, Somma V, *et al.* Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in patients with autoimmune liver diseases. *Clin Chim Acta* 2015;450:1–5.
20. Terjung B, Herzog V, Worman HJ, Gestmann I, Bauer C, Sauerbruch T, *et al.* Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. *Hepatology* 1998;28:332–40.
21. Terjung B, Söhne J, Lechtenberg B, Gottwein J, Muennich M, Herzog V, *et al.* p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* 2010;59:808–16.
22. Targan SR, Landers C, Vidrich A, Czaja AJ. High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995;108:1159–66.
23. Mack CL, Adams D, Assis DN, Kerkar N, Manns MP, Mayo MJ, *et al.* Diagnosis and management of autoimmune hepatitis in adult and children: 2019 practice guidance and guidelines from American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). *Hepatology* 2020;72:671–722.
24. Galaski J, Weiler-Normann C, Schakat M, Zachou K, Muratori P, Lampalzer S, *et al.* Update of the simplified criteria for autoimmune hepatitis: evaluation of the methodology for immunoserological testing. *J Hepatol* 2021;74:312–20.
25. Bossuyt X, Fieus S. Detection of antinuclear antibodies: added value of solid phase assay? *Ann Rheum Dis* 2014;73:e10.
26. Bizzaro N, Brusca I, Previtali G, Alessio MG, Daves M, Platzgummer S, *et al.* The association of solid-phase assays to immunofluorescence increases the diagnostic accuracy for ANA screening in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2018;17:541–7.
27. Bizzaro N. Can solid-phase assays replace immunofluorescence for ANA screening? *Ann Rheum Dis* 2020;79:e32.
28. Bossuyt X, Claessens J, De Langhe E, Belmondo T, Westhovens R, Hue S, *et al.* Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and solid phase assays. *Ann Rheum Dis* 2020;79:e65.
29. Bizzaro N, Villalta D, Bini V, Migliorini P, Franceschini F, Piantoni S, *et al.*; FIRMA Collaborators. Multiparametric autoantibody analysis: a new paradigm for the diagnosis of connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther* 2022;24:278.
30. Bizzaro N. Il metodo di immunofluorescenza per la ricerca di anticorpi ha i giorni contati? *Riv Ital Med Lab* 2023;19:1–5.
31. Cinquanta L, Infantino M, Bizzaro N. Detecting autoantibodies by multiparametric assays: impact on prevention, diagnosis, monitoring, and personalized therapy in autoimmune diseases. *J Appl Lab Med* 2022;7:137–50.
32. Schramm C, Herkel J, Beuers U, Kanzler S, Galle PR, Lohse AW. Pregnancy in autoimmune hepatitis: outcome and risk factors. *Am J Gastroenterol* 2006;101:556–60.
33. Buchner R, Bryant C, Eslami A, Lakos G. Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells. *J Vis Exp* 2014;88:e51211.
34. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, *et al.* Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601–11.
35. Hilário MO, Len CA, Roja SC, Terreri MT, Almeida G, Andrade LE. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. *Clin Pediatr (Phila)* 2004;43:637–42.
36. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N. Challenges in the standardization of autoantibody testing: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53:68–77.
37. Czaja AJ, Morshed SA, Parveen S, Nishioka M. Antibodies to single-stranded and double-stranded DNA in antinuclear antibody-positive type 1-autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997;26:567–72.
38. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2013;46:17–24.
39. Bonroy C, Vercammen M, Fierz W, Andrade LE, Van Hoovels L, Infantino M, *et al.*; European Federation of Laboratory Medicine (EFLM) Working Group “Autoimmunity Testing,” the European Autoimmune Standardization Initiative (EASI) and International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns (ICAP). Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP. *Clin Chem Lab Med* 2023;61:1167–98.
40. Cinquanta L, Bizzaro N, Villalta D, Morozzi G, Tonutti E, Bagnasco M, *et al.* Linee guida per l’utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni reumatiche sistemiche. *Revisione* 2015. *Riv Ital Med Lab* 2015;11:205–24.
41. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000;32(Suppl):181–97.
42. Meda F, Zuin M, Invernizzi P, Vergani D, Selmi C. Serum autoantibodies: a road map for the clinical hepatologist. *Autoimmunity* 2008;41:27–34.
43. Muratori P, Muratori L, Agostinelli D, Pappas G, Veronesi L, Granito A, *et al.* Smooth muscle antibodies and type 1 autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002;35:497–500.
44. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach. *Eur J Intern Med* 2018;48:35–43.

45. Villalta D, Bizzaro N, Da Re M, Tozzoli R, Komorowski L, Tonutti E. Diagnostic accuracy of four different immunological methods for the detection of anti-F-actin autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis and other liver-related disorders. *Autoimmunity* 2008;41:105–10.
46. Granito A, Muratori L, Muratori P, Pappas G, Guidi M, Cassani F, *et al.* Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. *J Clin Pathol* 2006;59:280–4.
47. Granito A, Muratori P, Muratori L, Georgios P, Lenzi M, Bianchi FB. Antifilamentous actin antibodies by ELISA for the diagnosis of type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1131–2.
48. Villalta D, Girolami E, Alessio MG, Sorrentino MC, Tampona M, Brusca I, *et al.*; Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Laboratory Medicine, Italy. Autoantibody profiling in a cohort of pediatric and adult patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Lab Anal* 2016;30:41–6.
49. Toh BH, Taylor R, Pollock W, Dearden S, Gill CC, Buchner C, *et al.* 'Actin-reactive' discriminated from 'non-actin-reactive' smooth muscle autoantibody by immunofluorescence reactivity with rat epithelial cell line. *Pathology* 2010;42:463–9.
50. Floreani A, Liberal R, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis: contrasts and comparisons in children and adults - a comprehensive review. *J Autoimmun* 2013;46:7–16.
51. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, *et al.* Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997;25:541–7.
52. Rizzetto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973;15:331–44.
53. Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 1988;168:801–6.
54. Smith MG, Williams R, Walker G, Rizzetto M, Doniach D. Hepatic disorders associated with liver-kidney microsomal antibodies. *BMJ* 1974;2:80–4.
55. Zimmerman HJ, Lewis JH, Ishak KG, Maddrey WC. Ticyrifen-associated hepatic injury: analysis of 340 cases. *Hepatology* 1984;4:315–23.
56. Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, *et al.* Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D. *Lancet* 1994;344:578–81.
57. Ma Y, Peakman M, Lobo-Yeo A, Wen L, Lenzi M, Gäken J, *et al.* Differences in immune recognition of cytochrome P4502D6 by liver kidney microsomal (LKM) antibody in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1994;97:94–9.
58. Muratori L, Lenzi M, Ma Y, Cataleta M, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al.* Heterogeneity of liver/kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease. *Gut* 1995;37:406–12.
59. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Contemporary issues and future directions in autoimmune hepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;10:1163–74.
60. Crivelli O, Lavarini C, Chiaberge E, Amoroso A, Farci P, Negro F, *et al.* Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta (delta) agent. *Clin Exp Immunol* 1983;54:232–8.
61. Homberg JC, Andre C, Abuaf N. A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM2) in tienilic acid-induced hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1984;55:561–70.
62. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, Durazzo M, Rizzetto M, Tukey RH, *et al.* Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996;111:1576–86.
63. Czaja AJ, Manns MP, Homburger HA. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1992;103:1290–5.
64. Ahonen P, Myllärniemi S, Sipilä I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 1990;322:1829–36.
65. Clemente MG, Meloni A, Obermayer-Straub P, Frau F, Manns MP, De Virgiliis S. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Gastroenterology* 1998;114:324–8.
66. Paldino G, Faienza MF, Cappa M, Pietrobattista A, Capalbo D, Valenzise M, *et al.* Analysis of a series of Italian APECED patients with autoimmune hepatitis and gastro-enteropathies. *Front Immunol* 2023;14:1172369.
67. Martinez-Revuelta D, Irure-Ventura J, López-Hoyos M, Olmos JM, Pariente E, Martín-Millán M, *et al.* Comparison of ANA testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a low pre-test probability population for systemic autoimmune disease: the Camargo Cohort. *Clin Chem Lab Med* 2023;61:1095–104.
68. Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Büschenfelde KH, *et al.* Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000;355:1510–5.
69. Palioura S, Sherrer RL, Steitz TA, Söll D, Simonovic M. The human SepSecS-tRNA^{Sec} complex reveals the mechanism of selenocysteine formation. *Science* 2009;325:321–5.
70. Czaja AJ. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis: current status and future directions. *Gut Liver* 2016;10:177–203.
71. Ma Y, Okamoto M, Thomas MG, Bogdanos DP, Lopes AR, Portmann B, *et al.* Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002;35:658–64.
72. Czaja AJ. Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease. *Dig Dis Sci* 2010;55:2144–61.
73. Liaskos C, Bogdanos DP, Rigopoulou ET, Norman GL, Shums Z, Al-Chalabi T, *et al.* Antibody responses specific for soluble liver antigen co-occur with RO-52 autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2007;46(Suppl 1):250.
74. Eyraud V, Chazouilleres O, Ballot E, Corpechot C, Poupon R, Johanet C. Significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas: a large French study. *Liver Int* 2009;29:857–64.
75. Zachou K, Gampeta S, Gatselis NK, Oikonomou K, Goulis J, Manoussakis MN, *et al.* Anti-SLA/LP alone or in combination with anti-Ro52 and fine specificity of anti-Ro52 antibodies in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2015;35:660–72.
76. Kirstein MM, Metzler F, Geiger E, Heinrich E, Hallensleben M, Manns MP, *et al.* Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2015;62:1524–35.
77. Zachou K, Weiler-Normann C, Muratori L, Muratori P, Lohse AW, Dalekos GN. Permanent immunosuppression in SLA/LP-positive autoimmune hepatitis is required although overall response and survival are similar. *Liver Int* 2020;40:368–76.
78. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2012;32:85–92.
79. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662–6.
80. Lapiere P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643–9.
81. Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008;14:3374–87.
82. Lenzi M, Manotti P, Muratori L, Cataleta M, Ballardini G, Cassani F, *et al.* Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995;36:749–54.
83. von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Infantino M, Damoiseaux J, Andrade LE, Carballo OG, *et al.* How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEP-2 cells: guidelines from the ICAP initiative. *Immunol Res* 2021;69:594–608.

84. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2014;13:435–40.
85. Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, *et al.* International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights* 2016;7:1.
86. Czaja AJ, Bayraktar Y. Non-classical phenotypes of autoimmune hepatitis and advances in diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* 2009;15:2314–28.
87. Czaja AJ. Acute and acute severe (fulminant) autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2013;58:897–914.
88. Kerkar N, Hadžić N, Davies ET, Portmann B, Donaldson PT, Rela M, *et al.* De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998;351:409–13.
89. Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, Garcia-Lozano JR, *et al.* Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001;126:535–9.
90. Beuers U, Gershwin ME, Gish RG, Invernizzi P, Jones DE, Lindor K, *et al.*; American Association for the Study of Liver Diseases. Changing nomenclature for PBC: From ‘cirrhosis’ to ‘cholangitis’. *J Hepatol* 2015;63:1285–7.
91. Selmi C, Invernizzi P, Zuin M, Podda M, Gershwin ME. Genetics and geoepidemiology of primary biliary cirrhosis: following the footprints to disease etiology. *Semin Liver Dis* 2005;25:265–80.
92. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261–73.
93. Invernizzi P, Ransom M, Raychaudhuri S, Kosoy R, Lleo A, Shigeta R, *et al.*; Italian PBC Genetics Study Group. Classical HLA-DRB1 and DPB1 alleles account for HLA associations with primary biliary cirrhosis. *Genes Immun* 2012;13:461–8.
94. Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2015;386:1565–75.
95. Lleo A, Marzorati S, Anaya JM, Gershwin ME. Primary biliary cholangitis: a comprehensive overview. *Hepatol Int* 2017;11:485–99.
96. Bizzaro N. La cirrosi biliare primitiva: aspetti clinici e diagnostici. *Riv Ital Med Lab* 2008;4:152–7.
97. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009;51:237–67.
98. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; 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.
99. Mitchison HC, Bassendine MF, Hendrick A, Bennett MK, Bird G, Watson AJ, *et al.* Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase: is this primary biliary cirrhosis? *Hepatology* 1986;6:1279–84.
100. Kisand KE, Metsküla K, Kisand KV, Kivik T, Gershwin ME, Uibo R. The follow-up of asymptomatic persons with antibodies to pyruvate dehydrogenase in adult population samples. *J Gastroenterol* 2001;36:248–54.
101. Van Norstrand MD, Malinchoc M, Lindor KD, Therneau TM, Gershwin ME, Leung PS, *et al.* Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis: relationship of levels of autoantibodies to disease progression. *Hepatology* 1997;25:6–11.
102. Bassendine MF, Fussey SP, Mutimer DJ, James OF, Yeaman SJ. Identification and characterization of four M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1989;9:124–31.
103. Hirschfield GM, Heathcote EJ. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:323–31, viii–ix.
104. Liu B, Shi XH, Zhang FC, Zhang W, Gao LX. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis: a subset of primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2008;28:233–9.
105. Bizzaro N, Covini G, Rosina F, Muratori P, Tonutti E, Villalta D, *et al.* Overcoming a “probable” diagnosis in antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis: study of 100 sera and review of the literature. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:288–97.
106. Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, *et al.* Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:118–27.
107. Norman GL, Yang CY, Ostendorff HP, Shums Z, Lim MJ, Wang J, *et al.* Anti-kelch-like 12 and anti-hexokinase 1: novel autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2015;35:642–51.
108. Op De Beëck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, *et al.* Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun Rev* 2012;12:137–43.
109. Zein CO, Angulo P, Lindor KD. When is liver biopsy needed in the diagnosis of primary biliary cirrhosis? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:89–95.
110. Younossi ZM, Bernstein D, Shiffman ML, Kwo P, Kim WR, Kowdley KV, *et al.* Diagnosis and management of primary biliary cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2019;114:48–63.
111. Munoz LE, Thomas HC, Scheuer PJ, Doniach D, Sherlock S. Is mitochondrial antibody diagnostic of primary biliary cirrhosis? *Gut* 1981;22:136–40.
112. Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1986;2:123–31.
113. Mackay IR, Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico-pathological correlations. In: van Venrooij WJ, Maini RN, editors. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996;1:18.
114. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988;1:1067–70.
115. Surh CD, Danner DJ, Ahmed A, Coppel RL, Mackay IR, Dickson ER, *et al.* Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with a human fetal liver cDNA clone of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kD mitochondrial autoantigen. *Hepatology* 1989;9:63–8.
116. Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Munoz S, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997;17:61–9.
117. Milkiewicz M, Caballeria L, Smyk DS, Milkiewicz P. Predicting and preventing autoimmunity: the case of anti-mitochondrial antibodies. *Auto Immun Highlights* 2012;3:105–12.
118. Moteki S, Leung PS, Coppel RL, Dickson ER, Kaplan MM, Munoz S, *et al.* Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology* 1996;24:97–103.
119. Miyakawa H, Kikuchi K, Jong-Hon K, Kawaguchi N, Yajima R, Ito Y, *et al.* High sensitivity of a novel ELISA for anti-M2 in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol* 2001;36:33–8.
120. Muratori P, Muratori L, Gershwin ME, Czaja AJ, Pappas G, MacCariello S, *et al.* ‘True’ antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis, low sensitivity of the routine assays, or both? *Clin Exp Immunol* 2004;135:154–8.
121. Porcelli B, Terzuoli L, Bacarelli MR, Cinci F, Bizzaro N. How reliable is the detection of anti-mitochondrial antibodies on murine triple-tissue? *Clin Chem Lab Med* 2020;58:e142–3.
122. Porcelli B, Bizzaro N, Fabris M, Trevisan MT, Sciarrone SS, Brilanti S. Incidental finding of anti-mitochondrial antibody: A neglected entity needing reappraisal. *Dig Liver Dis* 2023;55:994–5.
123. Bizzaro N. La diagnosi di laboratorio delle malattie autoimmuni delle vie biliari. *Riv Ital Med Lab* 2010;6:274–80.
124. Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M,

- et al.* Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:431–7.
- 125.** Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wiesierska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2005;25:298–310.
- 126.** Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, Levy C, Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2019;69:394–419.
- 127.** Hu CJ, Song G, Huang W, Liu GZ, Deng CW, Zeng HP, *et al.* Identification of new autoantigens for primary biliary cirrhosis using human proteome microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:669–80.
- 128.** Villalta D, Seaman A, Tiongson M, Warren C, Bentow C, Bizzaro N, *et al.* Evaluation of a novel extended automated particle-based multi-analyte assay for the detection of autoantibodies in the diagnosis of primary biliary cholangitis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1499–507.
- 129.** Reig A, Norman GL, Garcia M, Shums Z, Ruiz-Gaspà S, Bentow C, *et al.* Novel anti-hexokinase 1 antibodies are associated with poor prognosis in patients with primary biliary cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2020;115:1634–41.
- 130.** Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black CM, Denton CP, *et al.* Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut* 2006;55:388–94.
- 131.** Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, *et al.* Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2015;45:846–55.
- 132.** Bogdanos DP, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies. *Clin Liver Dis* 2003;7:759–77, vi.
- 133.** Wang M, Jin Y, Xu A. Diagnostic and prognostic value of iFlash-AMA-M2 in PBC. *Clin Chem Lab Med* 2024;62:53–5.
- 134.** Maggs JR, Chapman RW. An update on primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:377–83.
- 135.** Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol* 2017;67:1298–323.
- 136.** Karlsen TH, Schrumpf E, Boberg KM. Genetic epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:5421–31.
- 137.** Jiang X, Karlsen TH. Genetics of primary sclerosing cholangitis and pathophysiological implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:279–95.
- 138.** Dave M, Elmunzer BJ, Dwamena BA, Higgins PD. Primary sclerosing cholangitis: meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2010;256:387–96.
- 139.** Burak KW, Angulo P, Lindor KD. Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis? *Am J Gastroenterol* 2003;98:1155–8.
- 140.** Lazaridis KN, LaRusso NF. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 2016;375:1161–70.
- 141.** Boberg KM, Fausa O, Haaland T, Holter E, Mellbye OJ, Spurkland A, *et al.* Features of autoimmune hepatitis in primary sclerosing cholangitis: an evaluation of 114 primary sclerosing cholangitis patients according to a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996;23:1369–76.
- 142.** Mendes FD, Jorgensen R, Keach J, Katzmann JA, Smyrk T, Donlinger J, *et al.* Elevated serum IgG4 concentration in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2070–5.
- 143.** Lindor KD, Kowdley KV, Harrison ME; American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2015;110:646–59, quiz 660.
- 144.** Hov JR, Boberg KM, Karlsen TH, Kozarek RA, Invernizzi P. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2008;14:3781–91.
- 145.** Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, van Wijk RT, Limburg PC, Kallenberg CG. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2000;32:734–41.
- 146.** Terjung B, Spengler U. Atypical p-ANCA in PSC and AIH: a hint toward a “leaky gut”? *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36:40–51.
- 147.** Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, Worman HJ. “Atypical p-ANCA” in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000;119:310–22.
- 148.** Terjung B, Worman HJ, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol* 2001;126:37–46.
- 149.** Hov JR, Boberg KM, Taraldsrud E, Vesterhus M, Boyadzchieva M, Solberg IC, *et al.* Antineutrophil antibodies define clinical and genetic subgroups in primary sclerosing cholangitis. *Liver Int* 2017;37:458–65.
- 150.** Kaya M, Angulo P, Lindor KD. Overlap of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis: an evaluation of a modified scoring system. *J Hepatol* 2000;33:537–42.
- 151.** Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, *et al.* Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001;33:544–53.
- 152.** Papp M, Sipeki N, Tornai T, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, *et al.* Rediscovery of the anti-pancreatic antibodies and evaluation of their prognostic value in a prospective clinical cohort of Crohn’s patients: the importance of specific target antigens [GP2 and CUZD1]. *J Crohn’s Colitis* 2015;9:659–68.
- 153.** Jendrek ST, Gotthardt D, Nitzsche T, Widmann L, Korf T, Michaels MA, *et al.* Anti-GP2 IgA autoantibodies are associated with poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2017;66:137–44.
- 154.** Yu S, Lowe AW. The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds Escherichia coli Type 1 fimbriae. *BMC Gastroenterol* 2009;9:58.
- 155.** Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 2009;462:226–30.
- 156.** Sabino J, Vieira-Silva S, Machiels K, Joossens M, Falony G, Ballet V, *et al.* Primary sclerosing cholangitis is characterised by intestinal dysbiosis independent from IBD. *Gut* 2016;65:1681–9.
- 157.** Kummén M, Holm K, Anmarkrud JA, Nygård S, Vesterhus M, Hoivik ML, *et al.* The gut microbial profile in patients with primary sclerosing cholangitis is distinct from patients with ulcerative colitis without biliary disease and healthy controls. *Gut* 2017;66:611–9.
- 158.** Rühlemann MC, Heinsen FA, Zenouzi R, Lieb W, Franke A, Schramm C. Faecal microbiota profiles as diagnostic biomarkers in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2017;66:753–4.
- 159.** Stinton LM, Bentow C, Mahler M, Norman GL, Eksteen B, Mason AL, *et al.* PR3-ANCA: a promising biomarker in primary sclerosing cholangitis (PSC). *PLoS One* 2014;9:e112877.
- 160.** Laass MW, Ziesmann J, de Laffolie J, Röber N, Conrad K. Anti-proteinase 3 antibodies as a biomarker for ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2022;74:463–70.
- 161.** Lopens S, Wunsch E, Milkiewicz M, Röber N, Zarske G, Nasser A, *et al.* PR-3 ANCAs detected by third-generation ELISA predicts severe disease and poor survival in primary sclerosing cholangitis. *Diagnostics (Basel)* 2022;12:2682.
- 162.** Wunsch E, Norman GL, Milkiewicz M, Krawczyk M, Bentow C, Shums Z, *et al.* Anti-glycoprotein 2 (anti-GP2) IgA and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies to serine proteinase 3 (PR3-ANCA): antibodies to predict severe disease, poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2021;53:302–13.
- 163.** Czaja AJ. The overlap syndromes of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2013;58:326–43.
- 164.** Gheorghe L, Iacob S, Gheorghe C, Iacob R, Simionov I, Vadan R,

- et al.* Frequency and predictive factors for overlap syndrome between autoimmune hepatitis and primary cholestatic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:585–92.
- 165.** Floreani A, Rizzotto ER, Ferrara F, Carderi I, Caroli D, Blasone L, *et al.* Clinical course and outcome of autoimmune hepatitis/primary sclerosing cholangitis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1516–22.
- 166.** Hunter M, Loughrey MB, Gray M, Ellis P, McDougall N, Callender M. Evaluating distinctive features for early diagnosis of primary sclerosing cholangitis overlap syndrome in adults with autoimmune hepatitis. *Ulster Med J* 2011;80:15–8.
- 167.** Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1998;28:360–5.
- 168.** Rust C, Beuers U. Overlap syndromes among autoimmune liver diseases. *World J Gastroenterol* 2008;14:3368–73.
- 169.** Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, Lohse AW, Manns MP, Schrumph E; International Autoimmune Hepatitis Group. Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol* 2011;54:374–85.
- 170.** Chazouillères O, Wendum D, Serfaty L, Montembault S, Rosmorduc O, Poupon R. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. *Hepatology* 1998;28:296–301.
- 171.** Zhang W, De D, Mohammed KA, Munigala S, Chen G, Lai JP, *et al.* New scoring classification for primary biliary cholangitis-autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Hepatol Commun* 2018;2:245–53.
- 172.** Muratori P, Granito A, Pappas G, Pendino GM, Quarneti C, Cicola R, *et al.* The serological profile of the autoimmune hepatitis/primary biliary cirrhosis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1420–5.
- 173.** Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, *et al.* Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEP-2 Cell Patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015;6:412.
- 174.** Granito A, Muratori L, Tovoli F, Muratori P. Diagnostic role of anti-dsDNA antibodies: do not forget autoimmune hepatitis. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17:244.
- 175.** Tozzoli R, Sorrentino MC, Bizzaro N. Detecting multiple autoantibodies to diagnose autoimmune co-morbidity (multiple autoimmune syndromes and overlap syndromes): a challenge for the autoimmunologist. *Immunol Res* 2013;56:425–31.
- 176.** Tozzoli R, Bizzaro N. The clinical autoimmunologist and the laboratory autoimmunologist: the two sides of the coin. *Autoimmun Rev* 2012;11:766–70.
- 177.** Tozzoli R, Bizzaro N. The clinical and the laboratory autoimmunologist: where do we stand? *Auto Immun Highlights* 2020;11:10.

Conflitti di interesse

Gi autori dichiarano di non aver alcun conflitto di interesse.

Studi condotti su esseri umani e animali

Per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa agli studi effettuati su esseri umani e animali.

Consenso informato

Per questo tipo di studio non è richiesto il consenso informato.

Cronologia

Publicato online: 21 febbraio 2024. - Accettato: 15 gennaio 2024. - Ricevuto: 11 gennaio 2024.