

## CORRELATION OF HISTOPATHOLOGICAL FEATURES AND OUTCOMES IN EXTRAHEPATIC BILIARY ATRESIA

Dragica Jojić<sup>1</sup>, Dragica Draganović<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Children's Clinic of the University Clinical Centre of the Republic of Srpska

<sup>2</sup> Obstetrics and Gynecology Clinic, University Clinical Centre of RS

### Abstract

**Introduction:** Extrahepatic biliary atresia (EHBA) is characterized by a disorder or obstruction of the extrahepatic biliary system which prevents the biliary flow. The indicators of poor prognosis in cases of extrahepatic biliary atresia (EHBA) continue to remain controversial.

**Aims:** Correlation of histopathological findings of wedge biopsy from liver and tissue obtained from the shaving at the porta hepatis, during hepatic portoenterostomy, with the clinical outcome.

**Material and Methods:** All EHBA cases were treated at the Institute for Mother and Child Healthcare of Serbia *Dr Vukan Čupić* over a seven-year period. Percutaneous liver biopsies and biopsies from the porta hepatis were analyzed with PAS stain (periodic acid Schiff). The histopathological parameters correlated with the clinical outcome were defined as: presence of large bile ducts (> 150µm diameter) in the portal tissue plaque, degrees of fibrosis, cirrhosis, cholestasis, giant cell transformation, duct proliferation and age at the time of surgery.

**Results:** Out of 29 children with EHBA, 25 (86.2%) were operated on. Survival rate is higher when surgery is performed earlier ( $p < 0.05$ ). There was a significant correlation between the degree of fibrosis, cirrhosis and poor clinical outcome ( $p < 0.001$ ). At the end of our follow-up period, 13 children were alive, 68.2% (15/22) survived for 2 years or more, and 27.3% (6/22) patients survived for 5 years or more.

**Conclusion:** In patients with EHBA, a biopsy is useful for assessing the stage and severity of disease and predicting the probable course and outcome of the disease. A greater degree of fibrosis, cirrhosis at the time of hepatic portoenterostomy and presence of ductal plate malformation is associated with significantly poorer clinical outcome.

**Key words:** ductal plate malformations, extrahepatic biliary atresia, prognosis

# KORELACIJA PATOHIŠTOLOŠKIH KARAKTERISTIKA I ISHODA KOD ATREZIJE EKSTRAHEPATIČNIH ŽUČNIH VODOVA

Dragica Jojić<sup>1</sup>, Dragica Draganović<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinika za dječije bolesti, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske

<sup>2</sup> Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske

## Sažetak

**Uvod:** Ekstrahepatična bilijarna atresija (EHBA) karakteriše oboljenje ili opstrukciju ekstrahepatičnog bilijarnog sistema, što rezultira opstrukcijom žučnog toka. Indikatori loše prognoze u slučajevima ekstrahepatične bilijarne atresije i dalje ostaju kontroverzni.

**Ciljevi:** Korelacija histopatoloških nalaza kliničke biopsije jetre i tkiva dobijenih iz porte hepatitis, tokom hepatične portoenterostomije, sa kliničkim ishodom.

**Materijal i metodi rada:** Svi slučajevi EHBA su lečeni u Institutu za zaštitu zdravlja majke i dece Srbije *Dr Vukan Čupić* u sedmogodišnjem periodu. Perkutane biopsije jetre i biopsije iz porta hepatitis su analizirane sa bojenjem PAS (periodična kiselina Schiff). Patohistološki parametri u korelaciji sa kliničkim ishodom bili su: prisustvo velikih žučnih kanala (prečnika > 150µm) u pločici tkiva porte, stepena fibroze, ciroze, holestaze, transformacije gigantske ćelije, duktalne proliferacije i starosti u vreme operacije.

**Rezultati:** Od 29 decea EHBA operisano je 25 (86,2 %). Preživljavanje je bolje ako se operacija uradi ranije ( $p < 0,05$ ). Postojala je značajna korelacija između stepena fibroze, ciroze i lošeg kliničkog ishoda ( $p < 0,001$ ). Na kraju našeg perioda praćenja, živo je 13-oro dece, 2 i više godine je preživelo 68,2 % (15/22), a 5 godina i više 27,3 % (6/22) pacijenata.

**Zaključak:** Kod pacijenata sa EHBA sa velikom verovatnoćom, biopsijom se može ustanoviti stadijum bolesti, oceniti težina i predvideti dalji tok i ishod bolesti. Veći stepen fibroze, ciroze u vreme operacije, hepatične portoenterostomije i prisustvo malformacije duktalne ploče povezan je sa značajno slabijim kliničkim ishodom.

**Ključne reči:** malformacije duktalne ploče, ekstrahepatična bilijarna atrezija, prognoza

## Uvod

Ekstrahepatička bilijarna atrezija (Extrahepatic biliary atresia ? EHBA) je heterogeno oboljenje čija etiologija nije poznata. Destruktivni inflamatorni proces pogađa intra- i ekstrahepatičke žučne vodove, štetni efekat bilijarne opstrukcije je dodatni faktor, a kasnije dolazi do razvoja ciroze. Morfološke promene na ekstrahepatičkim bilijarnim vodovima i u jetri zavise od stadijuma bolesti. Mikroskopskim ispitivanjem se registruje kompletna fibrozna obliteracija bar dela ekstrahepatičnih žučnih vodova (1). Opšta incidencija EHBA se kreće od 1/10000 do 1/15000 živorođene dece, a rasna predilekcija nije zabeležena (2). Bolest počinje intrauterino i progredira nakon rođenja sa žuticom holestaznog tipa hepatomegalijom i splenomegalijom. Lečenje je pravovremena operacija, hepatoportoenterostomija (HPE) po tehnici koju je opisao Kasai, a u kasnijem stadijumu indikovana je transplantacija jetre (3-5).

## Ciljevi istraživanja

Naš cilj istraživanja je bio da označimo patohistološke parametre koji su značajni za predviđanje ishoda bolesti u bolesnika sa EHBA. Takođe, da procenimo vezu fibrotičnog hepatičkog duktusa u nivou porte hepatis i preživljavanja pacijenata.

## Materijal i metode

U sedmogodišnjem periodu analizirali smo 29-toro dece sa EHBA, lečenih u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije *Vukan Čupić*. U ovom vremenskom intervalu, kod 258 pacijenata je dijagnostikovana hronična bolest jetre u dečijem uzrastu. 25-toro dece je operisano u Hirurškoj klinici Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta zbog EHBA.

Za postavljanje dijagnoze uzet je biopsijski materijal Menghini iglom, standardnom tehnikom. Analiziran je i/ili intraoperativni biopsijski uzorak jetre i resecirani fibrozni ostatak u području ekstrahepatičkog bilijarnog stabla (*fibrozno dugme*). Nakon standardne fiksacije, dehidratacije i serijskog rezanja uzoraka tkiva primenjeno je standardno hematoksilin-eozin bojenje, kao i specijalne metode bojenja: PAS (periodic acid Schiff) i d-PAS (dijastaza-PAS), Van Gieson i bojenje retikulina po Gomoriju. Za bitne patohistološke promene uzete su: holestaza, gigantska ćelijska transformacija, upalni infiltrat u portnim/periportnim prostorima, fibroza, proliferacija žučnih duktusa, žučni čepovi u holangiolama, žučna jezerca, degeneracija i upala žučnih vodova, fokalna nekroza, ekstramedularna hematopoeza, ciroza, malformacije duktalne ploče, *ductal paucity*. Intenzitet pojedinih patohistoloških promena je određivan semikvantitativno (-, 1+, 2+, 3+) (20).

Klinički tok bolesti praćen je kod sve dece. Svi pacijenti su praćeni do završetka studije, ili do njihove smrti. Prosečan period praćenja bio je 39,4 meseca, najkraći 5 a najduži 81 mesec.

U testiranju statističke značajnosti i provere hipoteza su korišćeni statistički testovi: Studentov t test, značajnim je smatrano  $p < 0,05$ . Korišćen je i Fisherov test tačne verovatnoće nulte hipoteze.

## Rezultati

U našem radu obrađeno je 29 pacijenata, bolest je dijagnostikovana u uzrastu od 0,9 do 19 nedelja, a srednja vrednost uzrasta je  $6,1 \pm 3,9$  nedelja. Kod 6 pacijenata sa EHBA prisutne su udružene kongenitalne anomalije srčane, abdominalne i genitourinarnog trakta. Zastupljenost ženskog pola u odnosu na muški pol je 1,9:1 (Ž:M).

Patohistološkim pregledom tkiva jetre dobijenog perkutanom biopsijom nađeno je da je najčešće dominirala holestaza, proliferacija žučnih duktulusa, progresivna periduktalna fibroza, prisustvo žučnih čepova u holangiolama i interlobularnim žučnim vodovima, gigatnocelularna transformacija hepatocita i ciroza (6). Intenzitet navedenih promena je bio veoma različit od jednog pacijenta do drugog.

Operativna biopsija je urađena u 80% (20/25) pacijenata. Primenom Fišerovog testa tačne verovatnoće za procenu korelacije uzrasta u vreme operacije i ispoljavanja histoloških promena, utvrđeno je da postoji visok statistički značaj ( $p < 0,001$ ) ispoljavanja ciroze, fibroze i holestaze sa kasnije urađenom operacijom, dok proliferacija žučnih puteva i žučni čepovi u holangilama nemaju statistički značajnu razliku ( $p > 0,05$ ). Može se zaključiti da se sa starošću pacijenta znatno pojačava stepen ciroze, fibroze i holestaze, dok drugi histološki parametri ne zavise od uzrasta pacijenta (Tabela 1).

**Tabela 1. Intenzitet promena u operativnoj biopsiji u zavisnosti od uzrasta u vreme biopsije**

Uzrast (nedelje)	Ciroza		fibroza				prolif. ž. vod.			gigant. trans.		Žučni čep.			holestaza			
	da	ne	0	1	2	3	1	2	3	da	ne	1	2	3	0	1	2	3
<6	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1
6-8	1	5	-	6	-	0	6	-	0	2	4	6	-	0	-	6	0	0
>8	1	12	-	2	3	8	7	1	5	8	5	8	-	5	-	0	3	10

Disekcija hepatoduodenalnog ligamenta pokazuje fibrotičan hepaticki duktus u nivou porte hepatis kod svih naših pacijenata. Dijametar duktusa je određen u 20 od 25 pacijenata. Kod 12 pacijenata veličina duktusa manja od 150  $\mu\text{m}$ , od toga je 16,66% (2/12) anikterično, 16,66% (2/12) ikterično i 66,66% (8/12) je umrlo. U dva slučaja je registrovana kompletna fibroza, duktusi nisu viđeni i ti pacijenti su tokom praćenja umrli (Tabela 2). Kod 40% (8/20) ima duktuluse veće od 150  $\mu\text{m}$ , 7 pacijenata su živi i anikterični, dok je jedan umro u ranom postoperativnom toku zbog urođene srčane mane. Korelacija između dijametra duktusa u porti hepatis i preživljavanja je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) za pacijente koji imaju dijametar duktusa veći od 150  $\mu\text{m}$  ( $p = 0,023$ ).

**Tabela 2. Korelacija dijametra duktusa u fibroznom dugmetu i preživljavanja.**

dijametar µm	Ž I V I		MRTVI
	anikterični	ikterični	
< 150	2	2	8
> 150	7	0	1

Kod svih pacijenata je prisutna fibroza, minimalna kod 9 slučajeva (45%), dok je umerena i izražena prisutna kod 55% (11/20) pacijenata. Među pacijentima sa izraženom fibrozom ili cirozom u toku praćenja umrlo je njih 75% (6/8), a samo jedan pacijent je anikteričan, dok je sa minimalnom fibrozom umrlo njih 11,1% (1/9), među živima jedan pacijent je ikteričan. Proliferacija žučnih vodova blagog stepena viđena je kod 70% (14/20), a izraženog stepena kod 25% (5/20). Zbog prirode bolesti holestaza je prisutna kod svih pacijenata, minimalna kod 30% (6/20), a kod ostalih izražena (Tabela 3).

**Tabela 3. Veza histopatoloških promena u operativnoj biopsiji i ishoda**

Ishod	ciroza		fibroza				prolif. ž. vod.			gigant. trans.		žučni čep.			holestaza			
	Da	ne	0	1	2	3	1	2	3	da	ne	1	2	3	0	1	2	3
Živi	3	8	-	8	1	2	9	1	1	7	4	10	-	1	-	6	1	4
mrtvi	9	-	-	1	2	6	5	-	4	4	5	5	-	4	-	-	2	7

Primenom Fišerovog neparametrijskog testa tačne verovatnoće dobili smo da je visoko statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) pojave ciroze i fibroze za preživljavanje, a holestaza je statistički značajna ( $p > 0,05$ ), dok drugi histološki parametri nemaju korelaciju sa ishodom. Drugi histološki parametri nemaju značaja za preživljavanje.

Preživljavanje operisanih pacijenata prosečno se kretalo oko 39,4 ± 41,5 meseci (3,3 godine), odnosno od 5 do 81 meseci (6,7 godina). Od 29 obrađenih pacijenata umrlo je tokom perioda praćenja 55,2 % (16/29), a od operisanih 48 % (12/25), pri čemu 12 % (3/25) dece nije umrlo od posledica EHBA, što znači da je ukupno od operisanih od posledica atrezije umrlo 40,9 % (9/22) (Tabela 4).

**Tabela 4. Vreme preživljavanja operisane dece posle HPE.**

	Živi pacijenti	Umrli pacijenti*	Ukupno
x ± Sd (meseci)	57,8 ± 30,8	13 ± 16	39,4 ± 41,5
min	27	5	5
max	81	29	81

## Diskusija

EHBA je dijagnostikovana kod 29-oro dece, a kod 25-oro je urađena Kasaijeva operacija. Na kraju našeg perioda praćenja, živo je 13-oro dece, dve i više godine preživelo je 68,2 % (15/22), a 5 godina i više 27,3 % (6/22) pacijenata. Glavni kriterijum za po-

stavljanje dijagnoze je laparotomija sa operativnom holangiografijom (senzitivnost 100%) koja daje uvid u anatomsko stanje ekstrahepatičkih i intrahepatičkih žučnih vodova (7). Većina autora ističe potrebu za ranom dijagnozom i lečenjem (8). Kod dijagnostikovanih slučajeva sa EHBA se preporučuje hitna operacija.

Ekstrahepatički žučni vodovi mogu biti pogođeni sami ili zajedno sa intrahepatičkim vodovima. Kod svih naših pacijenata koji su operisani prisutna je obliteracija svih ekstrahepatičkih žučnih vodova što je u 85-90% slučajeva (9). Sa velikom verovatnoćom, biopsijom se može ustanoviti stadijum bolesti, oceniti težina i predvideti dalji tok i ishod bolesti (10).

Opšte preživljavanje i operativni uspeh su pokazali da postoji zavisnost od morfologije u *fibriznom dugmetu* porte hepatis (11). Ovaj naš rad pokazuje razliku u postoperativnoj žučnoj drenaži u pacijenata koji imaju žučne duktuse viđene u operativnoj biopsiji u *fibroznom dugmetu* i one sa drugim tipovima struktura. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja koje je proveo Ohi sa saradnicima (12) i oni su identifikovali tri tipa mikroskopskih struktura u fibroznom dugmetu i istakli su da samo žučni duktusi mogu ekskretovati pravu žuč. Howard i Iwami sa saradnicima (13, 14) su takođe, uočili bolje postoperativno uspostavljanje žučnog protoka kod pacijenata čiji su žučni duktusi veći od 150  $\mu$ m.

Naši podaci pokazuju bolje preživljavanje onih pacijenata sa minimalnom fibrozom u operativnoj biopsiji jetre. Mnogi autori se slažu da je stepen fibroze u direktnoj vezi sa prognozom (15). Dugogodišnjim praćenjem uočeno je da se ciroza jetre sa portnom hipertenzijom često razvija uprkos isčezavanju holestaze i uspostavljenom žučnom protoku (16). Teška intrahepatička bilijarna holangiopatija i izražen stepen hepatičkog oštećenja u smislu gigantske ćelijske transformacije i lobularni nered su značajni faktori udruženi sa lošim ishodom. Ponavljani napadi ascendentnog bakterijskog holangitisa mogu dodatno oštetiti žučne duktuse i mogu čak voditi reopstrukciji (17).

U našoj seriji uzrast u vreme operacije i dijametar žučnih duktusa u fibroznom dugmetu imaju statistički značaj ( $p < 0,05$ ), a histopatološke promene ciroza i fibroza imaju visok statistički značaj ( $p < 0,001$ ), te su najznačajniji prognostički faktori. Većina autora se slaže da je uzrast u vreme operacije značajan (3,18), naši podaci su saglasni sa ovim tvrđenjem.

McEvoy i saradnici su tvrdili da uspešna žična drenaža može voditi prekidu proliferacije žučnih vodova i poboljšanju jetrene arhitekture (19). Značajni su sledeći prognostički faktori: (1) uzrast u vreme operacije, (2) dijametar žučnih duktulusa, (3) stepen fibroze u jetri, (4) hirurška tehnika, i (5) incidenca ascendentnog holangitisa (20-22). Kod pacijenata sa ovim povoljnim faktorima, 90% će imati tehnički uspešnu operaciju, ali će 50% imati neku žučnu drenažu, kod 30% biće sa normalizacijom bilirubina, ali samo 25-30% će imati dugogodišnje odsustvo tegoba (23). Pete Altman je u dugogodišnjem praćenju uočio da polovina pacijenata posle inicijalne Kasaijeve operacije ima dobru drenažu (24), ovaj podatak ohrabruje pedijatrijske hirurge da rade reviziju PES-a u slučaju prekida žučne drenaže, jer transplantacija sa sobom nosi niz problema.

U našoj seriji srednji uzrast u vreme operacije je 8,7 6,6 nedelja. Pri poređenju vremena operacije sa drugim velikim serijama ono je povoljno (4,20,21). Kod nekih paci-

jenata sa rano ispoljenom bolešću i pored rano urađene operacije, pre 4-te nedelje života, operativni uspeh je loš. To je grupa pacijenata sa histološkim promenama u smislu kongenitalne fibroze (25).

Naše opšte preživljavanje je 40,9 % (9/22) sa praćenjem od 5 do 81 meseci (6,7 godina) (prosečno 4,8 godina). Od 13 preživelih pacijenata, 11 je anikterično. Anikteričnih pacijenata ima 50% (11/22), što predstavlja operativni uspeh i sličan je drugim serijama (5,26). Najznačajniji parametri za dugogodišnje uspešno preživljavanje su: rana operacija pre 3 meseca života, uspostavljanje žučnog protoka posle operacije, povoljna histopatologija jetre (odsustvo fibroze i ciroze), prevencija postoperativnih holangitisa (27, 28), rana reoperacija kada je neophodna i odgovarajući nutricionisti i vitaminski status (29).

## Zaključak

Morfološke promene na ekstrahepatičkim bilijarnim vodovima kod pacijenata sa ekstrahepatičkom bilijarnom atrezijom značajno utiče na ishod. Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju histološke promene nađene u pacijenata sa EHBA kao što su stepen ispoljavanja ciroze i fibroze imaju visok statistički značaj kao prognostički faktori za lošije preživljavanje. Veći dijametar duktusa u disciranom hepatoduodenalnom ligamentu gde je fibrotičan hepatički duktus u nivou porte hepatitis je statistički značajan za uspostavljanje žučnog protoka, a samim tim i na dugogodišnju dobru prognozu.

## Literatura:

1. McEvoy CF, Suchy FJ. Biliary tract disease in children. *Pediatr Clin N Am* 1996; 43: 75-98.
2. A-Kader HH, Balistreri WF. Neonatal hepatobiliary disease. *Sem Gastrointest Dis* 1994;5:65-77.
3. Hays DM, Kimura K, ed. Biliary atresia: The Japanese Experience. Cambridge: Harvard University Press; 1980.
4. Kham LN, Rokonzaman MD, Asm BK, Kaniz F, Azmeri S. Management of Biliary Atresia: A Review. *Bangladesh J Child Health* 2015; 39(1):38-45
5. Schwarz KB, Haber BH, Rosenthal P, Mack CL, Moore J, Bove K, et al. Extrahepatic anomalies in infants with biliary atresia: results of a large prospective North American multicenter study. *Hepatology* 2013; 58:1724-31.
6. Dillon P, Belchis D, Tracy T, et al: Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia. *A J P* 1994;145:263-267.
7. Yamamoto H, Yoshida M, Ikeda S, et al: Laparoscopic cholecystcholangiography in a patient with biliary atresia. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4:370-2.
8. Mowat AP, Davidson LL, Dick MC. Earlier identification of biliary atresia and hepatobiliary disease: selective screening in the third week of life. *Arch Dis Child* 1995;72:90-92.
9. Houwen RH, Zwierstra RP, Severijnen RSV, et al: Prognosis of extrahepatic biliary atresia. *Arch Dis Child* 1989; 64: 214-8.

10. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, et al: Congenital structural abnormalities in biliary atresia: evidence for etiopathogenic heterogeneity and therapeutic implications. *Acta Paediatr Scand* 1991;80: 1192-9.
11. Howard ER, MacLean G, Nio M, et al: Survival patterns in biliary atresia and comparison of quality of life of long-term survivors in Japan and England. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 892-7.
12. Ohi R, Kasai M, Mochizuki I, Ohkohchi N, et al: Surgical limitation for biliary atresia: Indication for liver transplantation. *J Pediatr Surg* 1988; 24: 851-4.
13. Howard E, Koukoulis G, Mieli-Vergani G, Portmann B. Infantile liver giant cells: Immunohistological study of their proliferative state and possible mechanisms of formation. *Pediatr Devel Pathol* 1999;2: 353-9.
14. Iwami D, Ohi R, Nio M, et al: Abnormal distribution of nerve fibers in the liver of biliary atresia. *Tohoku J Exp Med* 1997;181:57-65.
15. Dimmick JE. Intrahepatic bile duct paucity and cytomegalovirus infection. *Pediatr Pathol* 1993;8:47-52.
16. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, et al: The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16 :53-60.
17. Yamamoto H, Yoshida M, Ikeda S, et al: Laparoscopic cholecystcholangiography in a patient with biliary atresia. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4:370-2.
18. Hussain H, Howard ER, Mieli-Vergani G, et al: Jaundice at 14 days of age: exclude biliary atresia. *Arch Dis Child* 1991;66:1177-9.
19. McEvoy CF, Suchy FJ. Biliary tract disease in children. *Pediatr Clin N Am* 1996;43:75-98.
20. Shneider BL, Brown MB, Haber B, Whittington PF, Schwarz K, Squires R, et al. A multi-center study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000. *J Pediatr* 2006; 148:467-74.
21. Lin JN, Wang KL, Chuang JH. The efficacy of Kasai operation for biliary atresia: A single institutional experience. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 704-6.
22. Lugo-Vicente HL. Biliary atresia: An overview. *Boletin Asociacion Medica de Puerto Rico* 1995; 87:147-53.
23. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, et al: Biliary atresia: Current concepts and research directions. Summary of a symposium. *Hepatology* 1996;23:1682-92.
24. Altman RP. Biliary atresia. *Pediatr* 1981;68:896-8.
25. Volpert D, White F, Finegold MJ. Outcome of early hepatic portoenterostomy for biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:265-9.
26. Laurent J, Gauthier F, Bernard O, et al: Long-term outcome after surgery for biliary atresia. Study of 40 patients surviving for more than 10 years. *Gastroenterol* 1990;99:1793-97.
27. Chardot C, Buet C, Serinet MO, Golmard JL, Lachaux A, Roquelaure B, et al. Improving outcomes of biliary atresia: French national series 1986-2009. *J Hepatol* 2013; 58:1209-17.
28. Houwen RH, Zwierstra RP, Severijnen RSV, et al: Prognosis of extrahepatic biliary atresia. *Arch Dis Child* 1989;64:214-8.
29. Fukui Y, Okada A, Kawahara H, et al: Vitamin A status in biliary atresia: intestinal absorption and liver storage retinol. *J Pediatr Surg* .1993;28:1502-4.