

• 论 著 •

间接法建立上海地区甲胎蛋白和癌胚抗原参考区间*

徐世骥¹, 沈隽霏¹, 吴文浩¹, 王蓓丽^{1,2}, 潘柏申^{1,2}, 郭 玮^{1,2△}

(1. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032; 2. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科, 福建厦门 361015)

摘 要:目的 使用间接法建立上海地区甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)的参考区间,通过与行业标准比较,验证间接法建立参考区间的可靠性。**方法** 选取复旦大学附属中山医院 2017 年全年门诊患者的 AFP 和 CEA 检测数据,使用偏度-峰度值检验分析数据正态性,非正态分布数据通过 BOX-COX 变换转变为近似正态分布,采用四分位间距法剔除离群值,最后使用 Hoffman 法得出参考区间,并与直接法得到的行业标准参考区间比较,以参考变化值(RCV)作为标准。**结果** AFP 的相对偏差小于 RCV($4.48\% < 15.74\%$),间接法建立的 AFP 参考区间上限值与直接法的行业标准参考区间上限值无显著差异。而 CEA 的相对偏差大于 RCV($19.09\% > 16.91\%$),间接法建立的 CEA 参考区间上限值与直接法的行业标准参考区间上限值存在一定差异。**结论** 该研究再次确认了间接法建立参考区间的可行性和可靠性,可推广应用于临床实验室参考范围的建立。

关键词:参考区间; 间接法; 甲胎蛋白; 癌胚抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.007

中图法分类号:

文章编号:1673-4130(2020)23-2844-04

文献标识码:A

Establishing the reference intervals of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in Shanghai by indirect method*

XU Shiji¹, SHEN Junfei¹, WU Wenhao¹, WANG Beili^{1,2}, PAN Baishen^{1,2}, GUO Wei^{1,2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xiamen Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Xiamen, Fujian 361015, China)

Abstract: **Objective** Using indirect method to establish reference intervals for alpha-fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic (CEA) antigens in Shanghai. The reliability of reference intervals was verified by comparison with industry standards. **Methods** The AFP and CEA test data of outpatients in 2017 from Zhongshan Hospital, Fudan University were selected, and the skewness-kurtosis value test was used to analyze the normality of the data. The non-normally distributed data was transformed into approximate normal distribution by BOX-COX transformation, the interquartile range was adopted to eliminate outliers, finally the reference interval was obtained by Hoffman method. The reference interval was compared with the industry standard reference interval obtained by the direct method, and the reference change value (RCV) was used as the standard. **Results** The relative deviation of AFP was smaller than RCV ($4.48\% < 15.74\%$), there was no significant difference between the upper limit of AFP reference interval established by indirect method and that of industry standard reference interval established by direct method. However, the relative deviation of CEA was greater than that of RCV ($19.09\% > 16.91\%$), so the upper limit of CEA reference interval established by indirect method was different from that of industry standard reference interval established by direct method. **Conclusion** This study again confirms the feasibility and reliability of the indirect method to establish the reference interval, which can be applied to the establishment of the reference range in clinical laboratories.

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772263, 81972000); 2019 福建省厦门市医疗卫生重点项目(YDZX20193502000002); 2017 年上海市上海青年临床医技人才(临床检验专业)培养资助计划; 国家自然科学基金青年科学基金项目(81902139); 上海市临床重点专科建设项目(医学检验科)。

作者简介:徐世骥,男,技师,主要从事临床免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: guo.wei@zs-hospital.sh.cn。

本文引用格式:徐世骥,沈隽霏,吴文浩,等.间接法建立上海地区甲胎蛋白和癌胚抗原参考区间[J].国际检验医学杂志,2020,41(23):

Key words:reference intervals; indirect method; alpha-fetoprotein; carcinoembryonic

生物参考区间是实验室检测的基石之一,能够协助临床医生对患者的健康状况做出诊断,不适当的参考区间反而可能对临床决策造成干扰^[1]。美国临床与实验室标准化协会(CLSI)和国际临床化学联合会(IFCC)在 2010 年修订的相关指南提出通过建立排除标准,选取合适参考个体以获取参考区间的方法(直接法)仍然是金标准^[2-3]。但是直接法所需的人员工作时间和检测成本使得临床实验室难以常规使用该方法。大部分临床实验室直接采用厂商所提供的参考区间,但这样往往无法解决由受试人群和检测系统带来的差异。因此,有学者提出通过应用实验室已储存的充足检测数据,以数学模型为基础建立参考区间,即间接法。本文通过间接法,利用门诊患者的检测数据建立了甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)的生物参考区间,通过与直接法的行业标准比较,以期对间接法建立参考区间进行有效性和可靠性的验证。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取复旦大学附属中山医院实验室信息系统中储存的 2017 年全年门诊患者的 AFP 和 CEA 检测数据,根据患者的就诊卡号、姓名和年龄等信息,筛除同一来源的数据仅保留最早时间的数据。

1.2 仪器和试剂 使用罗氏公司的 cobas 602 全自动免疫分析仪和罗氏公司配套试剂及配套校准品。

1.3 方法 采用复旦大学附属中山医院实验室先前已建立的间接法模式^[4-7]建立 AFP 和 CEA 的参考区间。

1.3.1 入组数据信息 2017 年 AFP 和 CEA 室内质控年度累计变异系数(CV)结果见表 1,所有结果均符

合实验室质量目标。2017 年门诊患者 AFP 和 CEA 的检测数据基础信息见表 2。

表 1 2017 年实验室 AFP 和 CEA 累计 CV(%)

项目	LEVEL1	LEVEL2
AFP	4.09	3.99
CEA	4.45	3.03

表 2 2017 年门诊患者 AFP 和 CEA 的检测数据基础信息

项目	男性		女性	
	例数(n)	年龄(岁)	例数(n)	年龄(岁)
AFP	23 585	11~99	19 708	13~99
CEA	33 890	12~100	32 653	11~102

1.3.2 数据正态性检验及转换 使用偏度-峰度值检验(Skewness-Kurtosis)分析数据的正态性,如偏度值和峰度值分别小于对应偏度和峰度标准差的 1.96 倍即可判定为呈正态分布。如数据呈非正态分布,则通过 BOX-COX 变换将数据转变为近似正态分布,对变换后数据再次使用偏度-峰度值检验分析正态性。

BOX-COX 变换公式为:
$$Y(\lambda) = \begin{cases} \frac{X^\lambda - 1}{\lambda} & \lambda \neq 0 \\ \ln(X) & \lambda = 0 \end{cases}$$
其中 λ

为待定参数,通过极大似然法求得。见表 3。

1.3.3 离群值剔除 使用先前研究中被证明剔除效能更好的四分位间距(IQR)法,剔除 $P_{25} - 1.5$ 倍 IQR 和 $P_{75} + 1.5$ 倍 IQR 之外的数值。其中 AFP 剔除 2 269 例,CEA 剔除 1 892 例。见表 4。

表 3 AFP 和 CEA 正态性检验和 BOX-COX 变换前后结果

项目	n	参数 λ	转换前				转换后			
			均数(ng/mL)	标准差(ng/mL)	Skewness	Kurtosis	均数	标准差	Skewness	Kurtosis
AFP	43 293	-0.15	281.90	3 715.50	15.270	238.600	0.84	0.11	-2.617	11.295
CEA	66 543	-0.11	6.97	52.78	16.097	278.692	0.92	0.80	-1.080	4.830

表 4 IQR 剔除离群值前后数据(ng/mL)

项目	组别	剔除前						剔除后					
		n	P_{25}	P_{75}	IQR	Max	Min	n	P_{25}	P_{75}	IQR	Max	Min
AFP	总	43 293	2.10	4.20	2.10	60 500	0.60	40 954	2.00	3.90	1.90	12.10	0.60
	男	23 585	2.10	4.30	2.20	60 500	0.60	21 875	2.10	3.90	1.80	11.20	0.60
	女	19 708	2.00	4.00	2.00	60 500	0.60	19 079	2.00	3.90	1.90	12.10	0.60
CEA	总	66 543	1.35	3.23	1.88	1 000	0.20	64 651	1.33	3.10	1.77	12.96	0.20
	男	33 890	1.60	3.70	2.10	1 000	0.20	32 753	1.58	3.52	1.94	12.96	0.20
	女	32 653	1.16	2.73	1.57	1 000	0.20	31 898	1.14	2.63	1.49	12.96	0.20

注:Max 代表最大值;Min 代表最小值。

1.3.4 生物参考区间建立和验证 对剔除离群值后的数据使用 Hoffman 法计算得单侧 95% 位点的数值,再转化为最初的表达形式,得到最终的参考区间。计算各项目参考区间上限值与直接法建立的参考区间上限值的相对偏差,并与参考变化值(RCV)进行比较,RCV 的计算公式为: $RCV=\sqrt{2} \times Z \times \sqrt{CV_a^2+CV_i^2}$,其中 CV_a 为分析变异系数, CV_i 为个体内的生物学变异系数, Z 为表示差异的可能性概率值,取值 1.96(95% 的可能性概率)^[4]。相对偏差低于 RCV 认为间接法建立的参考区间上限值与直接法建立的参考区间上限值两者之间没有显著差异。选取 20 例来自体检中心的健康人群标本,检测 AFP 和 CEA,验证间接法建立的参考区间。

1.4 统计学处理 使用 Office Excel 2010 办公软件录入各组数据,并进行排序,计算 RCV 和参考区间的差异百分比。使用 Minitab 17 统计软件进行数据的 BOX-COX 正态性变换(待定参数 λ 使用极大似然法得到)及 Skewness-Kurtosis 正态性检验,并完成 IQR 剔除离群值。

2 结 果

采用 Hoffmann 法获取生物参考区间,比较各项目参考区间上限值与直接法建立的参考区间的相对偏差,见表 5。AFP 的相对偏差小于 RCV,则认为间接法建立的 AFP 参考区间上限值与直接法的行业标准参考区间上限值无显著差异。CEA 的相对偏差大于 RCV,间接法建立的 CEA 参考区间上限值与直接法的行业标准参考区间上限值存在一定差异。

表 5 IQR 法剔除后 Hoffmann 法获取参考区间及偏差分析

项目	组别	自建参考区间	导则报道或现行参考区间	相对偏差 (%)	RCV (%)
AFP(ng/mL)	总	6.70	≤7.00	4.48	15.74
	男	6.70	≤7.00	4.48	
	女	6.70	≤7.00	4.48	
CEA(ng/mL)	总	6.18	≤5.00	19.09	16.91
	男	6.70	≤5.00	25.37	
	女	5.30	≤5.00	5.66	

选取 20 例健康人群,男女比例为 1:1,年龄为 28~72 岁。AFP 检测结果最小值为 0.60 ng/mL,最大值为 4.50 ng/mL。CEA 检测结果最小值为 0.90 ng/mL,最大值为 2.30 ng/mL。AFP 和 CEA 在表面健康人群中符合自建参考区间,验证试验通过。

3 讨 论

临床检验项目的参考区间是临床诊断和治疗判断的重要依据。在临床检验中,不同的检测仪器、检测方法、受试人群等因素都会影响到最终的检测结果,从而导致一种参考区间可能并不适用于所有的实

验室,因此,每个实验室最好可以建立一个真正适用于自己的参考区间。建立参考区间的最佳方法是直接法,是从一群充足且可靠的参考人群中抽取至少 120 例进行检测,另外对于非参数法还要对每种细分人群单独建立参考区间,如性别、年龄^[3]。但是,对于大部分实验室而言,参考人群的选择和“健康”个体的定义是比较困难的,操作繁琐且耗资不菲。据 CLSI 调查团队的发现,现状是不仅少有实验室建立参考区间,甚至很少有厂商会进行建立参考区间的实验,而是倾向于应用数十年前既有的参考区间,但当时的检测方法和受试人群往往已经与现在不同^[3]。

通过利用实验室储存的大量数据和数学统计为基础的参考区间建立方法,即间接法指出了另一条帮助实验室建立自己参考区间的道路。间接法建立参考区间方法简便、耗时短、成本低,且能有效地利用实验室所既有的大量检测数据。间接法建立参考区间利用存储在实验室数据库中的患者结果,提供了一种快速且廉价的替代方法。另外,因为可以使用大量患者数据,所以当需要多个分区时,该方法可以提供更详细的参考间隔信息,如不同的年龄组间^[5-7]。

本文采用了复旦大学附属中山医院实验室在之前的研究中所总结出的较为简便和准确的统计模式^[8-11]。该模式的核心步骤包括:(1)数据获取与筛选;(2)正态性验证及正态性变换;(3)离群值的剔除;(4)利用 Hoffman 方法获取参考区间;(5)参考区间的验证。

GROSSI 等^[12]认为在统计数据前,通过设定适当的筛选标准可以极大提高数据的可靠性,如筛除过去 3 年中对同一项目进行过重复检测的患者数据、综合观察患者的相关性检验指标等。如从 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)来看,已知 GGT 与结合胆红素、丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶存在一定相关性,则当这 3 个项目出现超出有参考区间的异常值时,即不再选取相关的 GGT 数据,可以降低选中非健康个体的概率。然而,现有的研究并未提出筛选数据的具体标准,目前来说筛选数据的必要性仍不明确^[2]。

AFP 间接法得到的参考区间与行业标准相对偏差小于 RCV,可以认为间接法与直接法得到的参考区间结果差异无统计学意义($P>0.05$),证明间接法建立参考区间的可行性。

但 CEA 得到的参考区间的相对偏差大于 RCV,与行业标准间存在一定差异。这可能是由于间接法作为一种后验方法,最大的缺点在于可能纳入处于疾病状态的患者的检测数据。本文中,由于选取的数据来源为门诊患者,包含大量非健康个体尤其是肿瘤患者,而对这类数据的筛选并不完善。尤其是 CEA 作为一种广谱的肿瘤标志物,可用于结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌、胃癌、转移性肝癌等常见肿瘤的辅助诊断^[13-14]。由于 CEA 的非特异性,本文

并未找到合理且完善的相关指标标准,用以筛查 CEA 数据,仅仅筛除了一年内进行多次检测的数据,后通过 *IQR* 剔除了离群值后,得到的 CEA 参考范围相对直接法的行业标准仍有一定差异。CEA 参考范围表现出了男女之间的差异,这一点与其他报道相同^[15-17]。

4 结 论

本文证明了间接法建立参考区间具有一定的可行性,可以为那些罕见人群及罕见标本的参考区间研究提供一种可靠的方法,同时也有利于实验室定期评审现有的参考区间,以提高临床工作中检验质量。但间接法仍然存在许多局限性,可能只能对参考区间作出粗略的估计,且过程中如何剔除数据中大量存在的错误值是重点同时也是操作的难点。完善间接法建立参考区间的方法步骤仍需进一步的研究。

参考文献

[1] HORN P S, PESCE A J. Reference intervals: an update [J]. Clin Chim Acta, 2003, 334(1/2): 5-23.

[2] 沈隽霏, 宋斌斌, 潘柏申. 间接法建立生物参考区间[J]. 检验医学, 2015, 30(4): 391-396.

[3] GARY L, HOROWITZ S A, JAMES C, et al. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-third edition [M]. USA: CLSI and IFCC, 2010: 12-20.

[4] FRASER C G, HYLTOFT PETERSON P, LARSEN M L. Setting analytical goals for random analytical error in specific clinical monitoring situations [J]. Clin Chem, 1990, 36(9): 1625-1628.

[5] FARRELL C L, NGUYEN L. Indirect reference intervals: harnessing the power of stored laboratory data[J]. Clin Biochem Rev, 2019, 40(2): 99-111.

[6] KALLNER A. Bayes' theorem, the ROC diagram and reference values: definition and use in clinical diagnosis[J].

Biochem Med(Zagreb), 2018, 28(1): 010101.

[7] JONES G R D, HAECKEL R, LOH T P, et al. Indirect methods for reference interval determination-review and recommendations[J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 57(1): 20-29.

[8] 陈政君, 沈隽霏, 宋斌斌, 等. 评价间接法在癌抗 CA72-4 生物参考区间建立的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(5): 368-370.

[9] 吴文浩, 沈隽霏, 吴炯, 等. 间接法建立上海地区常规肝肾功能生化检验项目参考区间[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(12): 906-910.

[10] 郭玮, 宋斌斌, 沈隽霏, 等. 基于实验室数据信息库建立丙氨酸转氨酶生物参考区间[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(32): 2599-2602.

[11] 赵瀛, 沈隽霏, 吴文浩, 等. LMS 方法评估女性中糖类抗原 125 参考区间的年龄适用性[J]. 中国临床医学, 2017, 24(6): 954-957.

[12] GROSSI E, COLOMBO R, CAVUTO S, et al. The RE-ALAB project: a new method for the formulation of reference intervals based on current data[J]. Clin Chem, 2005, 51(7): 1232-1240.

[13] 国家卫生健康委员会. 常用血清肿瘤标志物检测的临床应用和质量管理: WS/T 459—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1-17.

[14] 张婵. 结肠癌患者癌痛与癌胚抗原的相关性研究[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(4): 444-445.

[15] 吕园, 俞杨, 瞿卫, 等. 南京及周边地区体检人群 AFP 和 CEA 参考范围的建立[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(11): 1849-1852.

[16] 夏长胜, 樊春红, 杨铁生, 等. 正常人群血清甲胎蛋白和癌胚抗原参考范围的建立[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(8): 1417-1421.

[17] 房格. 应用间接法验证和建立血清肺癌肿瘤标志物的生物参考区间[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.

(收稿日期: 2020-04-25 修回日期: 2020-10-10)

(上接第 2843 页)

boembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS) [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(1): 114-120.

[20] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology function and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.

[21] LOGOZZI M, MIZZONI D, DI RAIMO R, et al. Exosomes: a source for new and old biomarkers in cancer [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(9): 2566.

[22] HAENDELER J, DRÖSE S, BÜCHNER N, et al. Mito-

chondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(6): 929-935.

[23] INDRAN I R, HANDE M P, PERVAIZ S. HTERT over-expression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells [J]. Cancer Res, 2011, 71(1): 266-276.

(收稿日期: 2020-04-02 修回日期: 2020-10-13)