



Sysmex HISCL-5000으로 측정된 알파태아단백 검사의 성능평가와 임상적 유용성

Performance Evaluation and Clinical Usefulness of α -fetoprotein Test Measured on Sysmex HISCL-5000

정재완 · 강은숙 · 박형두

Jaewan Jung, M.D., Eun-Suk Kang, M.D., Hyung-Doo Park, M.D.

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Serum α -fetoprotein (AFP) test is useful for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) and monitoring its recurrence after treatment. In Korea, patients with a higher risk of HCC are tested every six months for AFP as a screening process to detect HCC. We aimed to assess the analytical performance of the AFP test in the HISCL-5000 (Sysmex Corporation, Japan) instrument, which has been released recently.

Methods: HISCL-5000 AFP assay was evaluated for precision, linearity, and comparison, according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines. For precision assessment, two control materials and one pooled human serum were measured twice a day for 20 days in duplicate. For linearity, five levels of material were produced covering the upper and lower limits of the measurable range and each of these was measured four times. Method comparison was conducted between HISCL-5000 and ADVIA Centaur XP (Siemens, Germany) with 500 samples consisting of 315 HCC, 57 benign liver disease, and 128 healthy subjects.

Results: Repeatability was between 2.44% and 9.19%, and within-laboratory precision was between 6.47% and 9.53%. Coefficient of determination (R^2) was 0.9975, with the range of 1.2-1824.3 ng/mL. Correlation coefficient (r) was 0.9862 between HISCL-5000 and Centaur XP. Overall percent agreement was 95.2% and difference percentage between the two instruments was 7.0%. Reference interval from healthy subjects was 1.30-11.42 ng/mL.

Conclusions: The HISCL-5000 showed adequate analytical performance for AFP measurement and is expected to be useful in clinical laboratories.

Key Words: α -fetoprotein, Analytical performance, HISCL-5000

서론

우리나라의 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC)으로 인한 사망은 2016년 기준 전체 암 사망률 2위를 차지하고 있으며, 간

세포암으로 인한 총 사망자수는 11,011명이다. 2016년 국가 암 정보센터의 암 발생 통계에 따르면 간암의 조발생률은 남성의 경우 인구 10만 명당 46.1명, 여성의 경우 15.8명으로 남성에서 네 번째, 여성에서 여섯 번째로 많이 발생하고 있다[1]. 그렇기에 고위험군에서 초기 간세포암을 발견하는 것이 중요하다. 혈청 알파태아단백(α -fetoprotein, AFP) 검사는 간세포암과의 연관성이 여러 연구에서 규명되었으며, 이에 따라 간세포암의 조기 진단을 위해 혈청 AFP 농도를 검사하는 것이 여러 나라에서 다양한 프로토콜로 시행되고 있다[2, 3]. 우리나라의 경우 만 40세 이상의 간세포암 고위험군에 해당하는 간경변증, B형 또는 C형 간염 바이러스 보유자를 대상으로 간 초음파와 함께 혈청 AFP 농도 측정을 6개월 간격으로 시행할 것이 권고되고 있다[1, 4]. 간세포암의 고위험군이 아닌 경우에 AFP 검사가 권고되고 있지 않지만, 여러 건강검진센터에서 고위험군 여부와 상관없이 혈청 AFP 검사를 시행하고 있다.

간세포암은 예후가 극히 불량하여 고위험군에서 선별검사의 중요성이 강조되며, 임상적으로 복부 초음파 검사와 혈청 AFP 측정

Corresponding author: Hyung-Doo Park, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0003-1798-773X>

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Tel: +82-2-3410-0290, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: nayadoo@hanmail.net

Received: September 25, 2018

Revision received: April 9, 2019

Accepted: April 15, 2019

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2020, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이 보편화되어 널리 이용되고 있다. 간세포암에서 AFP는 세포 증식, 혈관 생성, 그리고 tumor necrosis factor와 관련된 세포사멸의 저항성과 연관이 있다[5, 6]. 또한 높은 AFP 수치는 간세포암 세포가 줄기/전구세포 성질을 가지는 것을 뜻해 좀 더 공격적인 간세포암종과 연관이 있다고 알려져 있다[7, 8]. 그렇기에 AFP 수치는 양성과 음성을 구분하는 것뿐만 아니라 정량적으로 정확하게 평가하고 그 의미를 연구하는 것이 임상적으로 도움이 된다.

본 연구는 최근 출시되어 국내에서 사용 중인 면역검사 측정장비인 HISCL-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan)의 AFP assay에 대한 성능평가를 시행하였으며, 정밀성, 직선성 평가 및 장비 간 비교평가 등을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 장비, 시약 및 검체

HISCL-5000은 사람의 혈청에서 면역화학발광 효소측정법(chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)으로 AFP를 측정한다. 정량적인 장비 간 비교평가를 위해 ADVIA Centaur XP (Siemens, Munich, Germany)로 AFP를 측정한 결과와 HISCL-5000 장비로 측정된 결과를 비교 평가하였다. 검사 물질로는 환자 검체를 사용하였으며, 각 제조회사의 지침에 따라 검사를 시행하였다.

2. 연구 대상군

2017년 10월부터 12월 사이에 484명의 환자에게 의뢰된 AFP 검사의 잔여 검체 500개를 수집하였다. 299명의 간세포암 환자들로부터 315건의 검체를 수집하였고, 57명의 양성 간 질환 환자와 128명의 정기 검진을 위해 측정된 건강인들로부터 각각 혈청을 수집하였다(Table 1). 양성 간 질환 및 건강인 검체는 1명당 1건의 검체로 환자 수와 검체 수가 같으며, 간세포암의 경우 양성 간 질환에는 간경변증, 만성 간염, B형 또는 C형 간염 바이러스 보균자, 간샘종, 지방간, 간혈관종이 포함된다. 다양한 범위의 AFP에 대해 장비 간 비교평가를 수행하기 위해 간세포암 환자의 검체를 높은 비율(63%)로 포함하였으며, 그 중 125건(40%)이 판정기준값 이상인 검체이다. 이 연구는 삼성서울병원 기관윤리위원회에 의해 승인받았다.

3. 방법

1) 정밀도

정밀도의 평가는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP05-A3 [9] 가이드라인에 따라 제조회사에서 제공한 고농도 및 저농도의 정도관리 물질과 혼합 혈청을 사용하여 평가하였다. 반복정밀도와 검사실내 정밀도는 20일간 저농도, 고농도 정도관리 물질과 혼합 혈청에 대해 오전과 오후에 2회씩 검사하였고, 매 검

Table 1. Characteristics of the patients enrolled in the study (N=484)

Variable	HCC (N=299)	Non-HCC liver disease* (N=57)	Healthy control (N=128)
Number of patients	299	57	128
Number of samples	315	57	128
Age (yr), median (range)	62 (33-90)	59 (29-80)	49 (24-70)
Gender, N (%)			
Male	245 (81.9)	40 (70.2)	38 (29.7)
Etiology, N (%)			
HBV	237 (79.3)	35 (61.4)	0
HCV	24 (8.0)	3 (5.3)	0
HAV	4 (1.3)	2 (3.5)	0
Alcohol	7 (2.3)	3 (5.3)	0
HBV+HCV	3 (1.0)	1 (1.8)	0
HBV+HAV	4 (1.3)	0	0
Unknown	20 (6.7)	13 (22.8)	0

*Non-HCC liver diseases include liver cirrhosis, chronic hepatitis, HBV or HCV carrier, hepatic adenoma, fatty liver, and hepatic hemangioma.

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HAV, hepatitis A virus; and HCC, hepatocellular carcinoma.

사마다 2회씩 반복 측정하여 평가하였다.

2) 직선성

직선성은 CLSI EP06-A [10] 가이드라인에 따라 평가하였다. 측정 범위의 상한값 및 하한값에 근접하는 고농도와 저농도의 환자들 검체를 이용하여 각각 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4의 비율로 혼합한 5가지 농도의 물질을 제조하였다. 5가지 농도별 검체에 대해 각각 4회씩 반복 측정하여 평가하였다. 직선성 평가는 CLSI EP06-A [10]에 따라 polynomial regression을 통해 1차, 2차, 3차 least-square regression을 시행하여 최적의 차수식을 구하였다. 반복정밀도(%CV) 기준은 10% 이내, 비직선성 기준은 5% 이내로 설정하였다.

3) 장비 간 비교평가

AFP 측정의 참고법으로는 현재 중앙검사실에서 사용중인 면역검사 장비인 ADVIA Centaur XP와 전용 AFP 시약을 이용하였다. 각 제조회사의 지침에 따라 HISCL-5000의 AFP 판정기준값은 10.0 ng/mL, ADVIA Centaur XP의 AFP 판정기준값은 8.0 ng/mL로 설정하였다. 장비 간 비교평가를 위해 두 장비에서 총 500개의 검체를 분석하였으며, 5일 이상의 기간에 걸쳐 평가하였다. 비교평가는 CLSI EP09-A3 [11] 가이드라인에 준하여 Weighted Ordinary Linear Regression (WOLR) 방법을 통해 회귀식을 계산하였고, Bland-Altman difference plot을 함께 나타냈다.

4) 환자군 간의 분석

HISCL-5000 장비의 환자군에 따른 AFP 값의 분포는 Box-and-

Whisker Plot으로 나타냈으며 환자군 간의 분포 관계는 Mann-Whitney U test를 통하여 *P*-value를 구하였다. 건강인의 AFP 값 분포를 통해 95% 참고구간을 제시했으며, CLSI 가이드라인 C28-A3 [12]의 비모수적 방법(nonparametric percentile method)을 사용하였다.

5) 통계분석 프로그램

자료분석에는 Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) 과 Medcalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium)를 이용하였다.

결 과

1. 정밀도

HISCL-5000에서 정도관리물질에 대하여 측정한 검사차레내 변이계수 및 총 변이계수는 저농도(6.37 ng/mL)에서 각각 2.44%, 7.47%, 고농도(225.88 ng/mL)에서 각각 2.93%, 6.47%로 나타났다. 혼합 혈청(3.06 ng/mL)에서는 검사차레내 변이계수 및 총 변이계수가 9.19%, 9.53%로 나타났다(Table 2).

2. 직선성

Polynomial regression을 통해 결정한 최적의 차수식은 1차식으로 나타났으며, 반복정밀도는 모든 농도에서 6% 이내로 설정한 기준을 만족하였다(Table 3). 최적의 차수식이 1차식이기 때문에 선형회귀식과 최적회귀식이 일치하였다. 2차식의 회귀분석의 표준오차가 50.0으로 최소값이나, 2차식의 b2계수값의 *t*-test값의 절대값

1.82로 central 95th two-sided percentile value 값인 2.365 (degree of freedom 7) 보다 작기에 2차 회귀식을 기각하였다. 마찬가지로 3차식도 기각할 수 있어서, 최적 회귀식을 1차식으로 결정하였다. 계산된 1차 선형 회귀식에 따르면 결정계수(*R*²)는 0.9975로 계산되었다.

3. 장비 간 비교평가

HISCL-5000과 기존 면역검사 장비인 ADVIA Centaur XP의 비교 결과, 제조사에서 제시하는 AFP 기준값을 적용하여 계산한 양성률과 음성 여부는 총 500건 중 476건(95.2%)에서 일치한 결과를 보였다(Table 4). WOLR 방법을 이용한 회귀분석 결과, 상관계수(*r*)는 0.9862로 나타났으며 회귀식은 $y = 1.109x - 0.312$ 이었다. 기울기의 95% confidence interval (CI) 값은 1.091~1.126, 편차의 95% CI 값은 -0.401~-0.221로 계산되었다(Fig. 1A). 결과값의 차이의 평균은 -7.0%로 나타났다(Fig. 1B).

4. 환자군 간의 분석

건강인 검체를 분석하였을 때 중간값은 2.7 ng/mL (Q1-Q3 1.85~4.15 ng/mL)로 나타났으며 이를 통해 추정한 건강인의 95% Reference interval은 1.30~11.42 ng/mL이었다. 참고로 Centaur XP 장비로 계산된 건강인의 참고구간은 1.00~10.75 ng/mL이다. 양성 간 질환 검체에서는 중간값 3.0 ng/mL (Q1-Q3 1.78~9.32 ng/mL)로 나타났다. 간세포암 환자 검체에서는 중간값 4.3 ng/mL (Q1-Q3 2.5~61.5 ng/mL)이었다. 각 군의 AFP 결과 분포에 차이가 있었으며, 간

Table 2. Precision of serum AFP measurement using HISCL-5000

	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	
			Repeatability	Precision within laboratory
QC1 (Low level)	6.37	0.48	2.44	7.47
QC2 (High level)	225.88	14.68	2.93	6.47
Pooled serum	3.06	0.29	9.19	9.53

Table 4. Qualitative comparisons between ADVIA Centaur XP and HISCL-5000

		HISCL-5000 (cut-off: 10.0 ng/mL)		
		Positive	Negative	Total
ADVIA Centaur XP (cut-off: 8.0 ng/mL)	Positive	127	23	150 (30.0%)
	Negative	1	349	350 (70.0%)
	Total	128 (25.6%)	372 (74.4%)	500

Table 3. Linearity evaluation by polynomial regression, *t* statistics, standard error of regression, and best-fit model

Order	Coefficient symbol	Coefficient value	Coefficient Standard Error	<i>t</i> statistics	Degrees of freedom	Standard error of regression	Best-fit model
1st order	<i>b</i> ₀	-426.7	42.1	-10.14	8	56.7	Best-fit
	<i>b</i> ₁	453.2	12.7	35.72			
2nd order	<i>b</i> ₀	-547.0	75.8	-7.21	7	50.0	
	<i>b</i> ₁	556.3	57.8	9.63			
	<i>b</i> ₂	-17.2	9.5	-1.82			
3rd order	<i>b</i> ₀	-459.9	183.7	-2.5	6	52.8	
	<i>b</i> ₁	434.0	240.1	1.81			
	<i>b</i> ₂	29.5	89.1	0.33			
	<i>b</i> ₃	-5.2	9.8	-0.53			

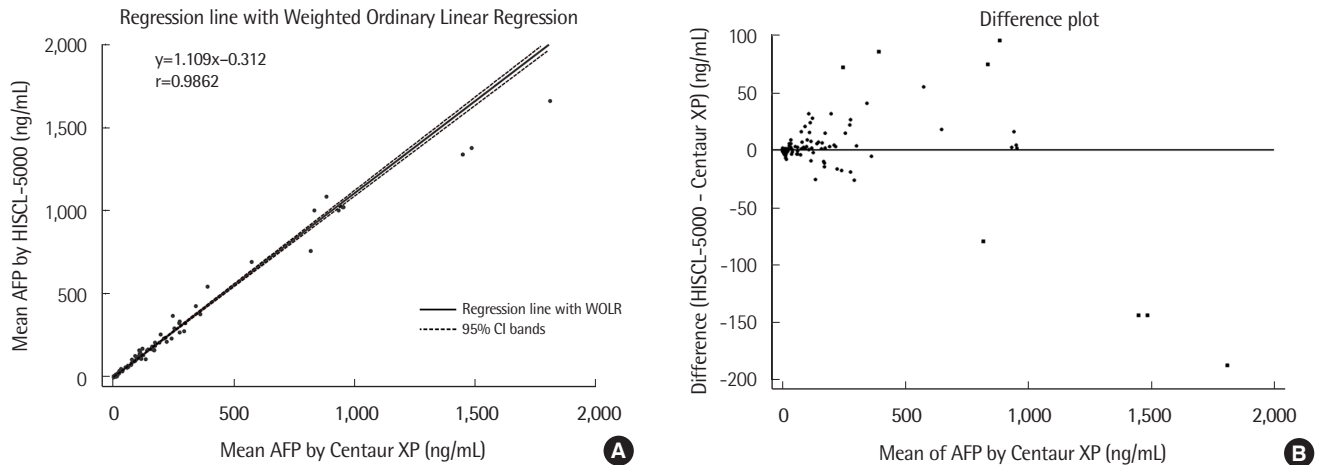


Fig. 1. Method comparison between HISCL-5000 and Centaur XP analyzers for the measurement of serum AFP. (A) Regression line with Weighted Ordinary Linear Regression. (B) Bland-Altman Difference plot.

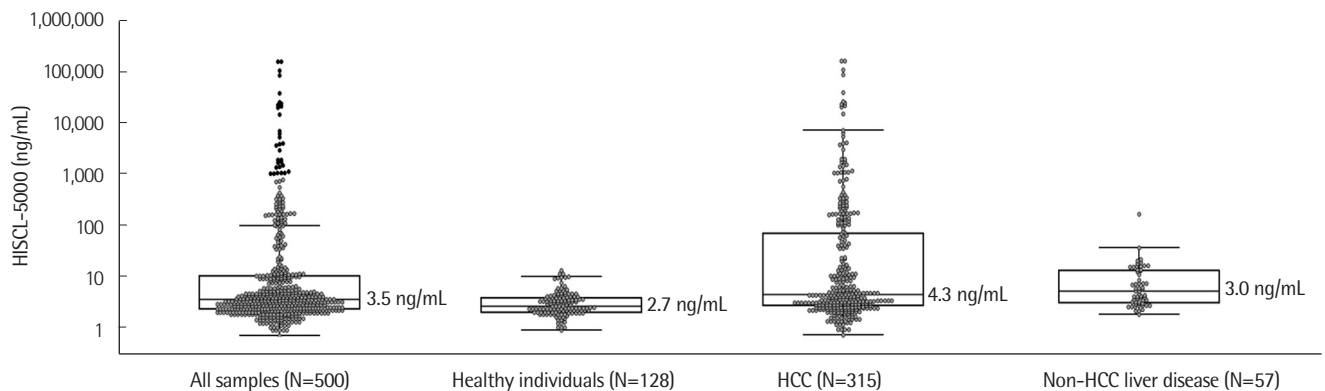


Fig. 2. Serum AFP levels in different patient groups. Gray points refer to each value, horizontal lines below and above refer to the 25th and 75th percentile values, and horizontal lines within boxes indicate median levels.

세포암 환자군에서의 농도가 양성 간 질환 환자군($P=0.004$)과 건강인($P<0.001$)에 비해 통계적으로 유의하게 높았다(Fig. 2). 건강인과 양성 간질환 군 사이의 경우 $P=0.035$ 로 나타났다.

고찰

정밀도 평가에서는 고농도와 저농도에 대해 총 변이계수는 8% 이내, 검사차레내 변이계수는 3% 이내로 기존 보고와 비슷하게 좋은 결과를 나타냈다(13, 14). 혼합 혈청의 경우 이상치로 생각되는 데이터를 제외한 후 검사차레내 변이계수가 9.19%로 총 변이계수 9.53%보다 약간 낮은 결과를 보였다. AFP의 판정기준값을 Centaur XP에서 8.0 ng/mL, HISCL에서 10.0 ng/mL로 했을 때 이 근처의 농도에서 장비 간 검사에서 불일치하는 결과가 있었으며, 일치도 95.2%의 결과를 보였다. 대부분의 불일치 결과는 기준값 근처에서 양성 과 음성이 구분되기 때문이었으며 실제 두 장비의 측정값 차이는

크지 않았다. 건강인에서는 128명 중 10 ng/mL이 넘는 경우가 Centaur XP에서 5건, HISCL-5000에서 3건이었으며, 20 ng/mL을 초과하는 경우는 없었다. Centaur XP의 AFP 시약은 다클론 쥐 항-AFP 항체와 단클론 쥐 항-AFP 항체를 사용하며, HISCL-5000의 AFP 시약은 비오틴화된 단클론 쥐 항-AFP 항체와 ALP로 라벨링된 단클론 쥐 항-AFP 항체를 사용한다. 이에 따라 AFP에 대한 항체의 에피토프가 시약별로 차이가 있을 수 있다. 특히 종양표지자의 경우 측정방법에 있어 아직까지 표준화가 되어있지 않기에 장비와 시약 별로 정량측정값에 차이가 있을 수 있으며, 판정기준값 근처의 회색 영역에서 불일치가 발생하는 원인이라고 생각할 수 있다.

두 장비 간의 회귀식 기울기의 95% CI 값이 1.091-1.126으로 1.0을 다소 넘는 결과를 보인다. 이는 두 장비 간의 AFP 양성 판정 기준이 Centaur XP가 8.0 ng/mL로 HISCL의 10.0 ng/mL 보다 낮기에, 전반적으로 HISCL이 Centaur XP보다 AFP를 약간 높게 측정하는 경향이 있는 것으로 해석할 수 있으며, Difference plot의 평균

값(Centaur XP- HISCL)이 -7.0%인 점과도 일치한다고 볼 수 있다.

건강인 자료로부터 추정한 참고구간이 1.30-11.42 ng/mL로 계산되었으므로 HISCL에서 제시하는 판정기준값인 10.0 ng/mL도 합당한 수치로 생각된다. 그리고 Centaur XP에서 건강인을 통해 계산한 참고구간(1.00-10.75 ng/mL)보다 높은 경향을 보이므로 판정기준값을 8.0 ng/mL에서 10.0 ng/mL로 변경한 근거를 추정해 볼 수 있다. 양성 간 질환 환자나 간세포암 환자의 경우 치료 전과 후를 구분할 수 없어 참고구간은 임상적 의미가 부족하나, 추가적으로 간세포암 치료 전 검체만 선별하여 참고구간을 계산해본다면 AFP의 합당한 기준값을 정하는 데 더욱 도움이 될 것이다.

연구 대상 중 간세포암 환자군에서는 각 환자의 상태가 다르며, 기저 AFP 값과 치료에 따른 AFP 값 변화에 대한 정보가 없어 혈청 AFP 수치를 통한 진단 민감도나 치료에 따른 반응 평가가 어려웠다. 하지만 혈청 AFP 검사의 추적관찰을 통해 치료 반응을 평가할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다. 한 연구에서는 경동맥화학색전술(transarterial chemoembolization)을 통해 50% 이상의 암 표지자(AFP, PIVKA-II) 농도 감소가 있는 환자들에서 의미 있게 좋은 예후를 가진다고 보고한 바 있다[15]. 그리고 Toyoda 등[16]은 치료적 절제술을 시행한 경우에 AFP 검사의 유용성을 분석하여 보고한 적이 있다.

Centaur XP 시약의 측정범위는 1.3-1,000 ng/mL이며 상한값 이상의 농도를 가지는 경우 희석하여 보고하고 있으나, 1,000 ng/mL을 초과하는 경우에는 정확성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 매우 높은 농도의 AFP 검체가 많으면 여러 차례 수동 희석하고 재검하는 등 검사실에도 노동 부하가 많이 걸리게 된다. 하지만 HISCL-5000의 경우 더욱 넓은 측정범위(0.1-2,000 ng/mL)를 가지고 있고, 높은 AFP 값에 대해서 자동 희석을 진행하므로 검사실의 노동 부하를 줄일 수 있는 장점이 있다.

결론적으로, HISCL-5000은 AFP 측정에 있어서 우수한 정밀도와 직선성을 보였으며, 기존 장비와의 비교평가 또한 만족할 만한 수준으로 보인다. 그리고 HISCL-5000의 장점인 높은 측정 범위와 수동 희석 작업이 필요하지 않은 점, 기존 장비에 비해 빨라진 검체 처리 시간 등을 볼 때 HISCL-5000을 이용하면 임상 검사실에서 큰 도움을 받을 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

배경: 혈청 알파태아단백(alpha-fetoprotein, AFP) 검사는 간세포암을 진단하거나 치료 후 재발 여부를 확인할 때 유용하다. 한국에서는 간암 고위험군(만성 B형 간염 또는 C형 간염, 간경화)을 대상으로 간세포암의 조기 진단을 위하여 6개월마다 AFP 검사를 시행한다. 저자들은 HISCL-5000 (Sysmex Corporation, Japan) 장비에서

전용 시약을 이용한 AFP 검사의 분석능을 평가하고자 하였다.

방법: CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 지침을 참고하여 정밀도, 직선성, 상관성 등을 평가하였다. 정밀도는 두 종류의 정도관리물질과 사람 혈청 풀을 이용하여 하루에 두 번씩 20일간 중복 측정하여 평가하였다. 직선성은 측정범위를 아우르는 검체를 선정하여 5가지의 농도물질을 제조한 후 각각 4회씩 반복 측정하여 평가하였다. 간세포암 환자들로부터 315검체, 양성 간질환 환자들로부터 57검체, 건강인들로부터 128검체 등 500검체에 대해 ADVIA Centaur XP (Siemens, Germany) 장비와 비교평가를 시행하였다.

결과: 정밀도 평가에서 반복정밀도는 2.44%-9.19%, 검사실내 정밀도는 6.47%-9.53%를 나타냈다. 직선성 평가 시 1.2-1824.3 ng/mL의 구간에서 결정계수 0.9975로 계산되었다. HISCL-5000과 Centaur XP 사이의 상관계수는 0.9862, 일치도는 95.2%이었으며 결과값 차이의 평균은 -7.0%이었다. 건강인 검체로 추정한 참고구간은 1.30-11.42 ng/mL로 나타났다.

결론: HISCL-5000 장비를 이용한 AFP 검사는 적절한 분석능을 보였으며, 임상검사실에서 유용할 것으로 기대된다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

감사의 글

HISCL-5000으로 측정한 AFP 검사 시약을 Sysmex로부터 제공받았습니다.

REFERENCES

1. Ministry of Health and Welfare, National Cancer Center. Quality guidelines of liver cancer screening, 2nd rev. <http://www.ncc.re.kr> 2016.
2. Bialecki ES and Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. HPB (Oxford) 2005;7:26-34.
3. Korean Liver Cancer Study Group (KLCSG) and National Cancer Center, Korea (NCC). 2014 Korean Liver Cancer Study Group-National Cancer Center Korea practice guideline for the management of hepatocellular carcinoma. Korean J Radiol 2015;16:465-522.
4. Ko YS, Bae JH, Sinn DH, Gwak GY, Kang W, Paik YH, et al. The clinical significance of serum alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma in a health screening population. Korean J Gastroenterol 2017;69:232-8.

5. Mitsuhashi N, Kobayashi S, Doki T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, et al. Clinical significance of alpha-fetoprotein: involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:e189-97.
6. Yang X, Zhang Y, Zhang L, Zhang L, Mao J. Silencing alpha-fetoprotein expression induces growth arrest and apoptosis in human hepatocellular cancer cell. *Cancer Lett* 2008;271:281-93.
7. Tangkijvanich P, Anukulkarnkusol N, Suwangool P, Lertmaharit S, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P, et al. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 2000;31:302-8.
8. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. Ep-CAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009;136:1012-24.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; Approved guideline—Third edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; Approved guideline. CLSI document EP06-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline—Third edition. CLSI document EP09-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved standard—Third edition. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
13. Park Y, Park Y, Park J, Kim HS. Evaluation of the UniCel™ DxI 800 immunoassay analyzer in measuring five tumor markers. *Yonsei Med J* 2012;53:557-64.
14. Kim HY, Lee SY, Park HD. Performance evaluation of the SelexOn analyser for seven biomarkers. *J Lab Med Qual Assur* 2014;36:30-8.
15. Park H and Park JY. Clinical significance of AFP and PIVKA-II responses for monitoring treatment outcomes and predicting prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2013;2013: 310427.
16. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Ito T, Maeda A, Kaneoka Y, et al. Changes in highly sensitive alpha-fetoprotein for the prediction of the outcome in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Cancer Med* 2014;3:643-51.