本指南编写于1997年2月27日实施FDA的良好指导规范（GGP）之前。其不会为任何人创造或赋予任何权利，也不对FDA或公众具有约束力。如果替代方法满足适用的法律、法规或其两者的要求，可以使用替代方法。本指南将在下一版本中更新，以纳入GGP的标准部分。

日期： 1994年7月15日

发件人： 主任，免疫学分部，临床实验室器械部，器械评估办公室，器械与放射健康中心

主题： 利用免疫试验方法且适用于胎儿神经开放性神经管缺陷的α-胎甲球蛋白（AFP）体外诊断器械评定的审查标准

收件人： 感兴趣的制造商

我们已起草了标题为“利用免疫试验方法且适用于胎儿神经开放性神经管缺陷的α-胎甲球蛋白（AFP）体外诊断器械评定的审查标准”的文件。本文档列出了我们将审查的项目，旨在帮助制造商准备这些器械类型的上市提交资料。同样，也可通过小制造商辅助部（DSMA），电话800-638-2041来获得本文件。

我们征求贵公司关于所附评查标准的想法、建议和评论。我们将非常感谢贵公司提供评论，以便我们可以在修订中纳入尽可能多的改进。请将评论发送至下述地址：

Peter E. Maxim，博士，

主任，免疫学分部，
临床实验室器械部（HFZ 440）
器械评估办公室
器械和放射卫生中心
2098 Gaither Road
Rockville, MD 20850
Peter E. Maxim，博士



附件

原始版本，1994年7月

利用免疫试验方法且适用于胎儿神经开放性神经管缺陷的α-胎甲球蛋白（AFP）体外诊断器械评定的审查标准

本指南是一份具有灵活性的文件，其代表了目前针对α-胎甲球蛋白（AFP）体外诊断器械辅助用于检测开放性神经管缺陷（ONTD）的主要关注问题和建议。在本指南中提到的器械是这些使用免疫试验方法学的器械。其依据1）现行基础医学，2）临床经验，以及3）1990年的医疗器械安全方案以及美国联邦法规（CFR）FDA法规。随着科学和医学中取得的进步，以及国会立法过程的改进，审查标准将进行重新评估，并且在必要时进行修订。

目的

在食品药品监督管理局（FDA）存档并受理上市前批准申请（PM）之前，本指南就必要信息提供了指南和阐述。尽管本指南不会替代美国联邦法规（CFR），在FDA能够为销售这类器械而颁布批准令之前，本指南就必要信息提供了额外指南和阐述。

PMA提交必须表明器械具有临床实用性，并且能够合理确保其安全性和有效性。必须由适用于胎儿开放性神经管缺陷（ONTD）的AFP器械的全部申办方来提交PMA。PMA必须提供证据来表明将器械用于预期用途时的正确性、安全性和有效性。安全性和有效性信息指PMA提交中的信息，包括与适用于孕妇目标人群器械的性能特征评估相关的不良信息。

通过FDA批准后，向公众公布安全性和有效性文件总结（SS&E）。这是一项强制性要求，并且应单独提交。SS&E不应包含申办方认为的机密信息或所有权信息等特定信息。联邦注册声明应声明要求人员支持FDA决策（器械所述预期用途具有安全性和有效性）的SS&E信息的可用性。

在下述各部分中确立PMAs的一般内容要求：515（c）（1）（A) - (G），513 (a)（3），21 CFR 814.20和21CFR 860.7。为解决法案21 CFR 814.20中的基本内容要求，可从小制造商辅助部（800-638-2041）获得PMA手册和PMA补充文件副本。我们相信这些手册以及本指南文件将能够使申办方提交完整和结构清晰的提交资料。

定义：

这种通用型器械适用于临床实验室，就医生处方辅助检测胎儿开放性神经管缺陷（ONTD），利用各种免疫检测方法，如放射性免疫测定、酶免疫测定和荧光免疫测定，通过对AFP进行定量体外诊断，确定AFP在孕妇血清和羊水样品中的水平。36

产品代码：S2-LOK

小组：免疫学器械组

所需审查：PMA

**I. 背景：**

目前尚无适用于检测ONTD的AFP器械法规；但是，FDA有权根据21 CFR中第515（c）（1）（A) - (G）部分、法案中的第513 (a)（3）部分，也根据21 CFR 814.20和21 CFR 860.7来管理这些器械。

AFP试剂盒是由利用免疫化学技术定量测定AFP在母体血清、血浆和羊水中浓度的试剂组成的器械。测定母体样品中AFP可辅助检测胎儿ONTD。

水平增加或降低的意义以及医学和社会问题：

1980年7月，关于产妇血清中α-胎甲球蛋白（MSAFP）的全国性会议在华盛顿召开13, 14，讨论用MSAFP来检测产前ONTD相关的科学、医学、伦理、法律和经济问题。全部孕妇可利用此项血液检测来测定胎儿ONTD。孕妇向医生进行遗传咨询并获得明确知情同意后，可进行超声诊断和羊水AFP检测。尽管一些出现开放性脊柱裂的患者能够进行生育并过上幸福生活，但是，这种疾病是一种最常见的严重先天性畸形：在美国，每年有超过2000名胎儿出现这种症状（另外2000名胎儿患有先天无脑畸形）。全部ONTD病例中，孕妇生育不受影响的情况超过95%。全部患有先天无脑畸形的胎儿会在出生后立即死亡或在出生后不久死亡。1400例患有开放性脊柱裂的新生儿的预期寿命至少为5年。大多数胎儿存在明显的身体和精神障碍。开放性脊柱裂的产前鉴别能够使家庭选择终止妊娠或继续妊娠。如果选择继续妊娠，家庭和医生可以为受影响胎儿出生做足准备。这种预先通知能够使孕妇在能够提供外科手术、医学和其他所需护理的医疗中心进行生产，以最小化胎儿残疾。如果鉴别出先天无脑畸形，几乎所有家庭会选择终止妊娠。此外，MSAFP水平升高可能有助于识别出具有更高围产期并发症风险的妊娠15-17，以及接近50%的双胞胎或更多胎妊娠的概率。18, 19, 72

1. 介绍：
	1. 预期用途的临床适应症和临床意义：

两种主要类型的胎儿ONTD分别是先天无脑畸形和开放式脊柱裂。1972年，Brock和Sutcliffe1 1（证明在ONTD情况下，羊水AFP水平增加）在报告中首次建议在针对ONTD的产前诊断中检测AFP的数值。在确认这一发现后，羊水AFP水平检测迅速成为第二种每三个月进行一次的部分孕妇产前护理项目。当时已生出患有神经管缺陷儿童的妇女保留这一检测，因为这些女性再次妊娠时风险会增加。不久后，开始为最初进行其它诊断处理的羊水样品进行AFP分析（例如，用于染色体分析的细胞培养物）6, 7。尽管在临床上已证明利用羊水AFP检测来预测是否进行遗传咨询是有帮助的，但是可能需要再次评估偶然出现的假阳性结果，包括在某些情况下重复进行羊膜穿刺。这些假阳性结果的最常见解释是羊水样品发生胎血污染。发现的其它胎儿病灶（例如，开放腹侧壁缺损和芬兰型先天性肾病）也与羊水AFP浓度升高相关，羊水AFP浓度升高降低了检验诊断的专一性，但是增加了可识别胎儿问题的范围。6 及时采集（孕周）和处理样本以及方法论的要求是，目前在美国能够实现的产前诊断便于预约孕妇的超声波检查和后续的羊水AFP检测。37

* 1. 在正常妊娠中的作用：

目前尚不清楚区分不同人群和地理区域中ONTD流行性的生物学基础；但是，作为ONTD的PMA申办方，必须向每名临床研究者作出解释，即在正确解释MSAFP的结果时，必须考虑这些因素。指导医生和临床试验人员正确解释MSAFP（根据推荐的检测方案36），AFP检测与任何其它旨在改善孕产期保健质量的临床实验室程序并无区别。

* 1. 背景说明：

提供疾病的背景概述，包括诸如生物化学、生理学、维生素缺乏症、病理生理学和药理学等基础科学。

* 1. 疾病的病因学：

描述胎儿ONTD的病因学，例如：

有明显证据表明，围产期补充多种维他命72，73或仅补充叶酸74能够预防神经管缺陷的复发。但是，95%生出患有神经管缺陷胎儿的母亲之前未生出过患有这些缺陷的胎儿。由Czeizel和Dudas 75目前提供的报告证明在围产期给予维生素会降低神经管缺陷的首次发生概率。制造商或申办方应利用获得的最新研究结果来更新文献回顾信息。

历史上，Leek，Ruoss, Kitau，Chard2和Brock，Bolton和Monaghan3独立证明在存在胎儿先天无脑畸形的情况下，产妇血清AFP（MSAFP）水平会升高。1974年，Wald，Brock和Bonnar4以及Brock和Scrimgeour5提供的数据表明，对于患有开放式脊柱裂的胎儿，MSAFP水平同样会升高。几年内，多家中心对检测方案的优势和局限性进行了调查并解决了相关问题。大家开始发现，MSAFP检测可作为一种日常技术来改善孕产期保健。12, 69, 70 2项主要的协作研究（1项于1977年完成，解决了MSAFP检测问题，另一项于1979年完成，涉及检测AFP在羊水中的水平）确立了两种分析过程的整体可靠性，并为能估出美国产妇人群中检测率和假阳性率的检测方法提供了整体基础7, 66, 67, 68。由对孕妇样本中AFP水平进行定量检测的几名器械制造商对通过测定AFP来检测ONTD的方式进行了彻底评估。根据FDA42规定的检测方案，对孕妇血清和羊水样品中的AFP进行检测，有助于测定胎儿ONTD。65, 55, 36

表1对经FDA批准用于胎儿ONTD的器械进行了概述。为在美国引进MSAFP检测，斯卡伯勒（缅因州）召开了3次国际会议（1977年、1978年和1980年），同时，FDA对适用于MSAFP检测的体外器械进行了评估。Haddow和Macri11以及Wald和Cuckle12也对目前实际使用MSAFP检测的知识水平进行回顾。

表1，目前获批辅助检测胎儿开放式神经管缺陷的PMA的α-胎甲球蛋白器械

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 血清标记物 | 制造商／器械 | 类型 | FDA批准 | PMA编号 |
| AFP | ABBOTT/DAIN-ABOTT | RIA | 1984年6月25日 | P820060 |
| AFP | WAMPOLE/AFP-TEST TM | 放射免疫技术 | 1984年1月13日 | P760001 |
| AFP | KALLESTAD/QUANTITOPE TM(125 I-AFP) (Sanofi Diagnostics Pasteur) | RIA | 1984年1月13 | P800025 |
| AFP | TRAVRNOL-GENENTECH/GAMMADABTM (125I-AFP) | RIA | 1986年4月30日 | P790032 |
| AFP | HYBRITECH/TANDEM-E AFP | 免疫酶测定 | 1986年4月29日 | P840035 |
| AFP | AMERSHAM/AMERLEX (EASTMAN-KODAK, USA) | RIA | 1986年4月7日 | P780006 |

* 1. 假阳性和假阴性结果的意义：

当制造商启动临床研究以支持旨在辅助检测胎儿ONTD器械的PMA时，应根据FDA发布的指南来执行MSAFP检测项目。FDA的观点是必须在一开始就用贴有解释实验室结果的手册和器械标签来辅助教育医生、遗传咨询师、护士、实验室人员和孕龄人群。FDA相信，不应利用孕妇胎儿ONTD检测来“筛查”胎儿ONTD。筛查意味着全部孕妇应进行AFP检测，而这不是FDA的立场。

**II. 器械描述：**

审查新AFP器械所遇到的关键问题是特定预期用途、供试品来源以及所采用的技术。必须提交下述描述性信息以充分描述用于检测临床样品中AFP的新型体外器械。除下述要求的描述性信息外，必须提交与器械技术相关的合理同行评审文献，充分描述新型体外器械。

1. 预期用途

AFP检测系统是由利用免疫化学技术来测定产妇血清和羊水样品中AFP的试剂组成的器械。根据FDA规定的检测方案，对产妇血清和羊水样品中的AFP进行测定，可辅助检测胎儿ONTD36。

1. 操作原理

AFP免疫学检测系统可采用下述一般原理，这些原理因所采用的方法不同可能存在差异。要求对检测方法的原理进行充分讨论。本文件通过评估检测系统，解决了一些难题，如确保试剂对AFP具有免疫化学专一性。鉴于分子的稳定性，始终通过免疫分析来测定AFP。早期研究利用电泳免疫扩散（火箭电泳，这是一种利用在凝胶中固化的AFP特异性抗体进行沉淀免疫检测的方法）对羊水中AFP进行定量。目前，仍偶尔使用火箭电泳来检测羊水中的AFP。该技术的灵敏度不足以测定产妇血清中AFP的下限。大多数实验室目前使用放射性免疫测定（RIA）或酶免疫测定（EIA）。几种放射性免疫测定（RIA）和酶联免疫吸附测定（ELISA）器械和试剂已获得批准，并且，食品药品监督管理局（FDA）对其生产进行了监督。这些方法能够对产妇血清和羊水中的AFP进行定量。实际上，利用试剂盒测定的AFP数值必须位于10IU/ml和150IU/ml之间。

将抗原-抗体结合系统分为两类：竞争性和非竞争性测定。在竞争性检测中，在单特异性抗AFP试剂和一定量的标记品（例如，放射性碘化AFP标准品）之间建立一种化学计量关系。将含有未知AFP水平的样品与标记品的AFP竞争的程度进行比较，并从标准曲线上读出AFP的浓度。这种类型的竞争性结合程序的成功取决于结合物的分离以及自由标记的AFP。通常采用添加能够沉淀免疫球蛋白的第二种单一特异性抗球蛋白试剂来完成这一过程：单一特异性抗球蛋白试剂复合物（双抗体放射性免疫测定）。随后，在本指南文件中解决了本技术的其它方面问题：例如，纯度、专一性和抗体的亲和结合、抗原纯度、反应混合物的pH、蛋白质浓度。

已将单克隆抗体的竞争性分析（和化学发光）与固相系统（免疫放射测定（IRMA））配套使用。检测系统中的AFP与一定量的、经放射性同位素标记的（发光试剂）AFP竞争结合后含有抗AFP试剂的固化支持物上有限数量的结合位点。

当竞争性结合测定采用放射性同位素时，将其归类为放射性免疫测定；但是，其也可能替代利用荧光染料标记的抗免疫球蛋白试剂（荧光免疫测定）或源于与抗免疫球蛋白试剂共轭酶的杂交瘤细胞。加入合理基质，并利用合理分光光度计（酶免疫分析）进行检测时，这些试剂通过监控比色反应可估计分析物的浓度。在这些测定条件下，通过放射标记（放射免疫测定）或酶联试剂（酶免疫分析法）放大的结合系统提供了所需的灵敏度。必须对AFP器械中所使用的基质／指示剂进行说明，包括pH值（例如，荧光底物和其它）。

对用于定量测定血清和羊水中人源AFP的方法进行综述，发现由于改进仪器、标准、单克隆糖体试剂和对干扰物质的了解，这些技术逐渐更加灵敏和准确。用于定量和鉴定人源AFP的免疫化学、生物发光和化学发光方法正迅速成为自动医疗器械的方法选择。这些方法创新提高了估计AFP MOM数值的精密度和整体可靠性。应对与更新和创新方法相关的局限性进行探索和描述，并与较旧的方法进行比较。

**III. 非临床实验室研究：具体性能特征：**

FDA要求在PMA申请中提交不同类型和数量的数据和统计学分析结果，以申请III类批准（上市前审批应用）。提交数据的数量和类型取决于：1）供试分析物，2）预期用途（确定提交是否为PMA）以及3）器械的技术特征。

1. 样品和数据采集设计

在妊娠过程中影响AFP测定的因素包括：

AFP器械的制造商或申办方应提供患者信息、实验室数据以及AFP结果的统计学评估，其原因是在整个妊娠过程中产妇血清和羊水中的平均AFP浓度存在差异。

在每个孕周，AFP浓度在不受影响的妊娠和受ONTD影响的妊娠之间的分布存在重叠。特别是针对产妇血清，以及在较小程度上，适用于羊水。因此，在选择AFP截止点时，该截止点应包含明确的假阳性率和检出率。

1.孕妇体重（而不是羊水）影响MSAFP浓度。其原因是随着血量增加所产生的稀释效应。黑人妇女的MSAFP检测结果较孕妇人群中的其他人种和族群高出10-15%。这种差异不取决于体重或其它已知变量。孕妇的胰岛素依赖型糖尿病与低水平MSAFP相关（约20%）。FDA建议在生成用于解释MSAFP检测结果（通过调整AFP数值）的数据表时，考虑全部这些因素。按孕周制表时，可通过将患者AFP数值与多种未受影响且按规定孕龄分类的人群中位数数值进行比较，以解释MSAFP检测结果的中位数数值。FDA期望AFP试剂盒的申办方可通过文件来指导医生和遗传咨询师理解并解释MSAFP数值。

2.孕妇年龄、产次、地理因素和与季节变化相关的因素与对受累妊娠中的血清和羊水样品中的AFP水平分布造成影响的季节变化相关；但是，已知这些变化不会影响未受累妊娠中血清或羊水AFP测定值的分布。

3.预约孕龄的方法：AFP器械的申办方应知道可采用两种惯例来定义应在哪个孕周发送血清样品进行MSAFP检测。首先，完整的孕周决定了孕龄的分布（例如，17周+4天=17周）。其次，孕龄近似于最近的孕周（例如，17周+4天=18周）。FDA强制进行上市后研究的结果和美国技术检查项目结果表明几乎全部实验室使用了完整孕周。FDA未正式建议在特定检测实验室中使用哪种方法，而是让大家了解在解释MSAFP AFP水平时，可利用完整孕周来获得一致性。

通常，利用从末次月经日期的第一天进行计数，可估计孕龄。约40%经初步评估发现MSAFP水平升高的样品在经超声预约检查后发现低估了孕龄。已知在使用LMP方法时，高估了一定比例的妊娠日期。这会造成假阴性检查结果。FDA推荐将超声波检查是检测方案的下一步，（a）证实孕期、（b）证明时双胞胎、（c）评估胚胎活性、以及（d）检测潜在胚胎先天无脑畸形。如果仍无法对升高的MSAFP数值做出解释，进行2级或灰度超声波检查以查找其它胚胎畸形、最显著的开放式脊柱裂和开放式腹壁缺陷。向孕妇医生进行遗传咨询后，通常进行用于检测羊水AFP的羊膜穿刺术。

4.报告的及时性：制造商临床试验协调员应指导检测现场研究者及时报告检测结果。由于检测结果升高会提示医生必须遵循在较短时间段内完成诊断程序的检测方案，因此，需要及时报告全部AFP检测。如果正确估计孕期，可通过MOM来计算神经管缺陷或腹壁缺陷的特定风险，而不是依靠MOM的特定截止值，如2.5或2.0乘以MOM。这种方法或范例采用了ONTD在人群中的已知流行性、受累和未受累妊娠中MSAFP的浓度以及Baye原理61。无论采用MOM截止值或特定风险计算，必须为母体体重（分布体积）、人种（计算可获得标准数据的每个族群组因素，乘以MOM）62, 63和糖尿病（MOM除以利用源于人群特异性AFP数值的因素）来调整MOM。利用由Adams62组提出的基于特定风险的方法，可通过MOM来计算未诊断出双胞胎和腹壁缺损（VWD）的风险。随后，可将风险进行整合，以及引用任意VMD或ONTD组合的整体风险。最近，Bishop76对这种范例的可靠性提出质疑，因此，必须在每个地理位置分散的检测中心，通过前瞻性方法开发数据（根据器械的建议，每个孕周对100例患者进行检测）对其进行确认。必须以相似方式对计算机生成的风险因素进行确认。关于预测数值和实验室医疗诊断临床效率的一般讨论，也可参见Galen和Gambino的研究25。

5.规范性数据：AFP器械的每个制造商或申办方应指导其临床研究协调员利用源于简单妊娠且生出一个婴儿的健康女性数据计算出的中位数MSAFP，在第二妊娠期中，每个孕周增加约15%。51, 52, 64通过临床信息和AFP测定结果，在进行数据采集和验证后，应在数据分析过程中对其进行确认。

在规定孕周内，在未受影响的单胎妊娠血清中，90%血清的AFP值为中位数值的一半到其2倍不等（到完整孕周时，约为35 IU/ml）。当利用算数方法绘制AFP数值曲线且“离群值”的有效数字超出钟形曲线的上限时，MSAFP值在每个孕周中的分布会引起数据偏差。发现，所观察到的分布近似于对数正态分布。

6.质量控制：必须对试剂（校验剂和对照）进行鉴别，且应将使用说明纳入到标签的单独部分中。AFP检测系统的标准化受三个主要因素影响：1）用与校准的AFP制备，2）抗AFP试剂，以及3）规定测定程序的局限性。杂种细胞来源以及细菌基因拼接来源的单克隆抗体已克服了参考品标准化过程中的一些难题。然而，单克隆抗体不会沉淀在凝胶中，使得专一性的证明变得更为困难，并且，许多人发现特定参考品中并非全部AFP蛋白质均存在特异性AFP表位76。当通过沉淀抗血清，通过放射免疫扩散法在凝胶中测定AFPs时，检测到一组特定表位。因此，不同AFP测定方法测定出AFP分子的不同表位，使得AFP在孕妇样品中具有不同的MOM数值。利用放射性免疫测定法以及固相经放射性标记和酶联免疫测定（ELISA）方法，可利用一些标准品来校准AFPs。应对全部校准剂和对照血清进行平行试验，以最小化随机误差。

**英国标准品**

利用与WHO材料同批的脐带血清制备了针对人类脐带血清的第一种英国标准品（72/227）。根据WHO标准品对英国参考品进行标定（72/225）。

**WHO标准品**

世界卫生组织（WHO）的人源AFP标准品（72/225）是一种用途有限的冻干脐带血清。联合对该标准品的国际单位（IU）进行了标定。

**美国参考品**

美国中期妊娠产妇血清AFP国家参考品是一种无肝正常成人血清与脐带血清的混合物，AFP的含量是392.8 IU/ml。将这种经无菌过滤、冻干的血清混合物包装在10000×0.5ml疫苗瓶中。根据检测计划，每6个月可免费获得6瓶参考品，可对至少50例患者样品／每周进行检测。

拟定美国国家参考品中的成分

对于AFP器械的制造商或申办方，应在妊娠期内对两种体液（产妇血清和羊水）AFP含量进行分析。理想的情况是，刺激由这些体液成分定义的分析条件稳定校准剂能够追溯到WHO（72/225）标准品。

7.稀释液：通常利用旨在测定产妇血清中更低AFP水平的高灵敏度试验对羊水用品中的AFP水平进行测定。这要求对羊水样品进行初步稀释（1/100到1/200）。大多数制造商在供应器械时也供应稀释液，或单独销售稀释液。

如果使用并非由制造商推荐或供应的稀释液，实验室必须通过直接比较来证明替代稀释液的适用性。

注意：AFP器械的制造商或申办方应防止发生无意间造成的索赔（针对额外预期用途和其他相关检测程序）。通过彻底编辑器械叙述性说明的叙述文本、评估标签和产品说明书可避免前述情况。FDA可能要求制造商改良或完全删除临床上不适用的额外预期用途声明或构建隐含声明（参见21 CFR 801.4）。

1. 分析／实验室体外研究
2. 向FDA提交试剂盒的临床性能
	1. AFP抗原的纯度和同源性

免疫源的制备代表了抗血清制备的第一步。仅利用人源AFP作为免疫原。从羊水AFP中分离出的AFP是优先来源（而不是从因AFP造成肝癌的患者血清中分离出的AFP）。制造商应证明抗原纯度或描述任何存在杂质的特征，并证明其不对试验造成干扰的理由。

* 1. AFP抗血清的纯度和特异性

应利用灵敏方法，如交叉二维免疫电泳39或免疫印迹，对多克隆抗血清的特异性进行评估。采用灵敏度不足和精密度不当的方法，如免疫电泳和免疫扩散，是不可接受的。

构成这些器械的试剂越来越多地源于杂交瘤细胞。如果在器械中采用抗AFP杂交瘤抗体，制造商必须提交包含下述信息的特征概述：

* 1. 亲本骨髓瘤细胞来源的鉴别。
	2. 抗体来源（小鼠等）
	3. 抗体特征
	4. 用于选择的克隆和标准描述
	5. 稳定性数据（实时研究）
	6. 精密度、准确性、可重复性和线性数据
	7. 证明批次间一致性的数据汇总（3批）
	8. 灵敏度、特异性、交叉反应性和干扰性
	9. 比较[利用与提交器械灵敏度具有可比性的试验来证明抗血清的特异性]
	10. 交叉反应性[检测抗血清可能与其它正常存在的、与妊娠相关的蛋白质之间的交叉反应性]
	11. 强度（亲和结合常数）[为适当的抗血清提供滴度或亲和结合常数]

试验试剂和试验器械设置

申办方必须提交（多克隆或源于杂交瘤细胞的）抗血清来源，以及与抗血清稀释相关的信息、所采用的过滤方法和通过每批用于检测AFP的抗血清产生的标准曲线。

应声明为每种描述仪器制备标准品曲线的频率（例如，每40个样品使用一个标准品）。应由申办方提供合并血清质量控制样品的描述并提供适用频率（例如，每10个样品检测一次）。应在完整的检测系列中对空白对照或无血清样品进行检测。应讨论的参数包括完整的试剂构成、冲洗程序、所使用的稀释液以及免疫球蛋白浓度测定所用血清样品的最终稀释度。同样，查找活性和无反应性成分（载体）说明。应识别用于每批AFP的参考品（例如，疾控中心的美国AFP国家参考品）、应描述标准曲线的构成以及将试验点拟合到说明性图表中的程序（例如，利用三阶多项式曲线拟合程序来计算结果）。

1. 器械的性能特征
2. 分析灵敏度（检测限）

针对免疫试验（放射性免疫测定、酶免疫测定等）：

将分析灵敏度定义为可与零区分的最低值（通常使用95%置信区间或2个标准偏差）53, 54。在同一检测过程中，至少调零25次（稀释液调零），并计算调零标准品的平均值以及平均值（计数、光密度等）两个标准偏差（SD）的平均值。

1. 线性范围：

利用覆盖标准曲线整个范围的正常和异常样品来确认试验的线性范围。55

1. 准确度／回收率研究：

定义AFP含量已知的加标回收率53, 54, 56, 57。回收率分析研究涉及将已知含量的AFP添加到待测定羊水中之后进行的分析。包括源于异常和病理状态下的患者样品以及源于健康个体的正常样品。通过公式来计算回收率百分数：增加含量-现有含量／增加含量×100。58

1. 稀释／平行性研究：

在特定体外试验中，不同抗原制备物或样品类型可能产生不同的剂量-反应曲线。将校准曲线斜率与含有AFP的患者样品（全部声明样品类型的分析物水平升高）进行统计学比较。这些孕妇患者应体现各族群来源。此外，在说明书的局限性部分中增加一个声明，称器械未进行交叉反应性检测或一种或多种物质的干扰检测。

对于杂交瘤来源的单克隆抗体，应利用竞争抑制技术，采用放射性免疫测定和ELISA或通过免疫印迹，进行特异性检测。应充分描述所选抗体的结合特性以确保在全部血清和羊膜样品规定类型的全部微粒中表达在特定试验中产生反应的表位。

1. 特异性／交叉反应性／干扰研究：

检测方案应描述用于定量其它造成试验干扰的血清蛋白质、抗凝血剂、其它药物或化学制剂或试验温度差异、试验孵育时间、反应物冲洗、分析物测定的洗脱时间和增加用于终止试验程序溶液的时间所采用的方法。

* 1. 评估供试患者可能通常使用的药物及其代谢物对AFP定量测定系统的干扰情况。

或者，在说明书中的局限性部分中增加一项声明，即，未对器械进行交叉反应性或干扰性测试。

* 1. 其它内源性物质：

在较高浓度条件下，对可能发生交叉反应的内源性物质进行评估，包括常见血清成分，如脂类、血红蛋白、胆红素等。53, 54, 56, 58

1. 重复性和重现性53, 54, 56, 57, 59, 60
2. 实验室应用

美国国家临床实验室标准化委员会（NCCLS）推荐采用一种方差检验分析方法，对本例中分析物两种接近医疗决定限的显著水平进行检测（次常规、常规或增加）。在同一次测定以及在2次不同测定中，利用对照来模拟患者样品或实际患者样品或模拟2次实际患者样品，持续进行20天测试。通过这种方法能够分别估计各天之间、批间和同一天内的标准偏差（SD）以及批间和整体SD。同样，所引用的文献对仅每天进行一次测定的可接受替代品进行了讨论59。需要证明方差分析的三种重要假设（误差变量齐性、加和性以及正态性）。

* 1. 定量测定

计算整体、各天之间和同一天内、以及批间和同一天之间、以及批间和批内平均值和每组数值不精确性的变异系数60。

根据样品重复检测次数，在说明书性能特征部分中报告适当平均值、SD和／或带有置信区间的变异系数。报告每日检测数量。

* 1. 提供三个实验室之间的试验差异。
	2. 提供批间试验差异。
1. 描述全部检测方案
2. 表达MSAFP结果的统计学方法
3. 中位数的倍数（MOM）：

英国协作研究6, 7将通过相同孕周中未受累妊娠样品计算的个体AFP数值表示为MOM AFP数值。AFP器械的制造商和申办方应以叙述方式向临床研究者及其临床试验协调员作出解释，即最初开发这种惯例旨在作为对源于检测中心的、在AFP标准品方面存在差异的数据进行标准化处理（其原因是缺少常规校准剂）。随后，这种情况变得显著，即MOM自动补偿了MSAFP中与孕龄和羊水AFP数值相关的变化，因此，为解释检测结果提供了一种统一方法。也可对MOM数值做出调整以解释其它影响AFP结果（例如，孕妇体重、胰岛素依赖型糖尿病、人种）解释的差异。也可利用MOM数值来计算个体患者特异性风险。美国大学病理学家实验室针对AFP产前筛查的认证程序需要下述与MOM相关的各项：“申办方的临床试验协调员应证明实验室确立了其本身的正常AFP中位数数值，并确认至少每年对制造商说明书或供试人群的其它来源资料进行升级。”

1. 计算单位

用于对AFP检测结果进行标准化的其它方法（诸如平均值或标准偏差或百分数）不够稳健，不建议使用这些方法，其原因是在定义正常值占总体人群的百分数时，应特别注意AFP数值的偏斜分布。

1. 统计学数据：

通过器械来提供数据和经确定的统计学分析以支持针对器械操作以及对于器械操作较为重要的性能参数（例如，重现性）。

1. 统计学方法选择理由：

避免仅依赖于无法提供重要定量信息的统计学假设检验（如使用p值）。提供工作数据，所采用的统计学方法以及经过证明的假设、检验统计学结果和相应p值。必须对特定统计学方法的使用进行充分证明（例如，参数型与非参数性）。

1. 统计学方法：

针对所提交的数据类型（例如，定量连续数据、定性离散数据等）和数据分布（正态与非正态（配对与独立）），对统计学方法进行讨论。

1. 统计学参考资料

为源于标准文本和／或经认证的生物医学杂志的研究设计和统计学方法提供参考资料。

1. 检验数据

提供检验数据以及误差估计、估计参数和置信区间、推理分析和结论。

1. 电子媒介（软盘）

如果可能，提供原始数据以及按规定格式储存在电子媒介上的拟定数据“布局”和中间临床信息以及临床数据（软盘）。将利用不带右侧边缘调整的Microsoft’s WordPerfectTM版本5.1对安全性和有效性文件的总结信息进行处理。为获得额外信息，联系信息系统办公室（OIS），电话（301-594-4550）。

如果进行患者临床分类或微处理机控制的诊断解释（患者信息数据库），并以所选择的（通过数学方法对AFP MOM数值进行调整，以容纳不同孕妇体重、具有特定地理分布特征的种族分布）或不同的图表和数值报告形式向患者提供这些数据，需要提供额外的性能特征。在这些提交中，制造商必须遵循针对计算机控制医疗器械510 (k)审查的审查员指南中高关注水平所列出的要求。可通过FDA小型制造商辅助部，1-800-639-2041来获得本指南。

如果供试患者方面涉及对患者构成风险（例如，进行羊膜穿刺以获得羊水样品），应讨论医院或人员调查机构委员会对研究时间造成的影响。

可报告动态范围3, 4,6, 7,9：试验优化：进行检测时，AFP免疫试验的工作标准曲线应足以包括位于妊娠时间点的最正常样本和病理学样本[FDA建议为15-20个孕周]。实际上，这要求曲线范围跨度达到未受累妊娠中位数0.5到0.8倍，相当于10-200IU/ml。因此，在整个范围内，试验应呈线性。对于浓度超出上限范围的样品，可在稀释后，再次进行试验。

对试验间变异系数（CV）为20%、10%、5%和3%的试验不精确性造成影响的整体AFP人群差异所占的比例分别是24%、6%、1.5%和0.54%。当试验间CVs是10%或在位于和接近临床重要决策点数值范围内处于下限时（2.0到2.5MOM），不精密度是MSAFP检测变异的较小来源。

6.质量控制：全部工作曲线（校验）、质量控制和患者样品通常进行两次平行检测。在每次试验中，应包含三个处理方式与患者样品处理方式相同的随机质量控制样品。这三个质量控制样品的浓度应接近17个孕周时的正常中位数，也应位于正常中位数的1倍到2.5倍范围内。应记录工作曲线参数和质量控制样品的控制线（通常为平均值+、-2倍标准偏差），如果标准品和对照品的统计学计算结果和图表结果落在可接受限度之外，应重新对个别患者样品进行检测。

**IV. 临床研究：特殊要求**

1. 证明临床实用性和安全性以及有效性的临床研究计划
	1. 对器械临床实用性较为重要的全部声明和特定参数进行证明
	2. 每名制造商必须拥有三个检测中心，并且，告知研究者使用不正确参考数据的危险。这是医生和实验室工作人员对MSAFP测定结果进行不正确解释的常见原因。至关重要的是，制造商监控其检测中心，确定检测中心本身的参考数据并／或证明通过其他检测实验室获得的参考数据对于供试人群是有效的。MASFP检测中的参考数据由一系列合并实验室MSAFP试验数值利用器械优先在人群中为每个孕周进行计算的中位数数值组成（三个检测中心的合并结果）。可将个体MSAFP检测结果表示为将每个个体MSAFP数值除以相关孕周中位数所获得的未受累人群中位数（MOM）的倍数。在为产妇血清和羊水构建中位数数值的下方概述策略。
	3. 研究者人数：

在单独（地理上单独分布）中心至少采用3个独立研究者和至少1个美国中心。

* 1. 样本量：

设定样本量，该样本量需在统计学上足以确定器械在进行临床试验之前是否安全和有效。

* 1. 样本类型：

包括数据，支持结合全部声明的样品基质来进行测试（临床和分析）。由于抗凝血剂对试验有干扰，不建议将血浆作为推荐样品。

* 1. 灵敏度和特异性：

无论样本量是多少，在产品说明书中的性能特征部分中提供器械的诊断灵敏度（真阳性）及其特异性25（真阴性）和其95%置信区间。

* 1. 取样方法：

描述在患者选择和排除过程中所使用的取样方法。全部统计学分析依据“随机取样”假设（例如，概率抽样）。

* 1. 研究者数据的整合：

提供临床信息和数据，以及每名研究者的分析和结论。此外，如果需要在统计学和临床方面进行证实，需要提供每名研究者的整合数据。

* 1. 对所使用的统计学方法进行描述并提供置信区间。
	2. 典型数据：

提供必须代表器械预期应用孕龄的目标人群的临床信息和数据。

* 1. 确立产妇血清中的参考中位数数值：

鉴于诸如妊娠期计算的可重复性中的差异性等因素，提供推荐进行检测的人群确定的中位数数值。水平测试计划表明即使结果以IU/ml为单位，各实验室之间的MSAFP测定结果的差异可达到15%。80解释这些差异的主要因素是各制造AFP器械之间存在的偏倚。因此，不得将已公布文献中的中位数数值作为参考数据。

* 1. 确立羊水中的参考中位数数值：

对于制造商来说，获得足够数量的羊水样品可能存在困难。例如，制造商每年可能检测3000例女性患者，发现仅2%-4%的女性患者是羊膜穿刺术的候选患者。通过AFP检测项目，可采用由细胞遗传学实验室发送进行AFP分析的羊水样品来进行补充，其原因是几乎全部这些样品将源于未受影响的孕妇。FDA针对试剂盒推荐使用的每个孕周，用50个羊水样品来计算中位数，以解释特定孕妇患者的羊水样品。

以与孕妇血清相同的方式，将羊水AFP数值表示为中位数的倍数。中位数数值和孕龄之间的关系对于孕周来水呈对数线性15-21（由FDA推荐用于检测的孕周），但是，随着孕龄的增加，羊水AFP中位数数值降低而不是增加。

1. 监控临床试验检测

1. 对于发起临床研究的制造商来说，通过追溯检出和丢失的胎儿畸形的数量来监控其检测项目的临床性能是重要的。对于检出的受影响妊娠，必须随访到儿童出生或有选择的终止妊娠。对伴有AFP水平升高的（阳性检测结果）女性的初始百分数进行监控是FDA所要求进行的临床研究一部分（3个独立的临床中心，每个地理位置分散的检测中心中有1000例孕妇患者）。FDA的这一流行病学监测的原理是存在阳性结果的女性初步所含的比例使得临床试验研究者有机会在进行羊膜穿刺前能够进行合理的遗传咨询。FDA建议必须完成胚胎超声波检查预约的连续诊断模式、AFP MOM解释的校正（阳性检测结果或隐性检测结果），包括羊水样品中AFP水平的解释和中性乙酰胆碱酯酶的确证试验，并对产妇患者进行遗传咨询。举例，临床研究者检测中心实验室（MSAFP检测截至值为2.0 MOM）的初步阳性结果百分数为3-5%。如果根据FDA的建议，截至值为2.5MOM，初步阳性检测结果率应为1-3%。制造商必须改善全部AFP检测结果并进行遗传咨询和在每个检测中心进行其它孕妇保健的阳性孕妇患者进行随访。

2. 制造商应了解初步阳性检测结果对于AFP试验的精密度和准确度、长期试验漂移和参考标准数据不当（AFP中位数数值）非常灵敏76。AFP上市后研究中，FDA发现在传统质量控制程序中增加流行病学监控是有帮助的，并且，应作为制造商临床检测计划的组成部分。Hybritech. Inc., Eli Lilly分公司提供了这些研究的初步报告79。

作为AFP试剂盒的制造商和申办方，由FDA之前提及并推荐的检测方案于1980年11月7日在联邦公报上发表38。1986年9月临床化学新闻中公布了检测方案和对阳性血清AFP检测进行充分随访的重要性42。FDA推荐的方案旨在对相隔至少1周进行抽样的2个样品进行连续MSAFP测定，以便于建议进一步的诊断。下一步是进行超声检查以证实妊娠日期、检查双胞胎、评估胎儿活性、并检测潜在先天无脑畸形。若仍无法解释MSAFP数值的升高情况，进行2级超声波检查或灰阶超声波扫描以检查其他胚胎畸形、最突出的开放性脊柱裂和开放性壁缺陷。同样，在主治医生对产妇患者进行遗传咨询后，提供旨在测定羊水AFP的羊膜穿刺（对确认AFP水平升高的羊水样品进行证实试验以确认存在神经来源的乙酰胆碱酯酶）36。总之，羊膜穿刺术的发生率不应超过供试人群的3%。62, 63

3. 确定下述讨论的性能特征（针对体外器械）具有两方面原因；评估疾病流行性对利用临床实验室试剂盒来评估患者症状的影响以及对可改善针对流行性相对较低疾病进行体外诊断的器械的较差检测强度的临床实验室程序。这些评估包括临床灵敏度（CSE）和临床特异性（CSP）。4个参数辅助FDA对获得正确体外器械检测结果的概率进行评估：灵敏度、特异性、疾病情况的流行性和检测结果对检测疾病个体的有效性。阳性检测的预测数值和阴性检测的预测数值均是作为CSE、CSP功能的次要性能特征。能够并应该为预期疾病流行性范围来计算疾病流行性。除临床方面的考虑外，对临床体外器械的解释依据检验结果将位于分析物数值规定正常范围中的概率；在这种情况下，产妇样品中AFP数值升高范围源于妊娠且伴有神经管缺陷的胚胎。

定义：

需要利用其它定义对临床实验室AFP器械结果进行解释性报告21, 22, 23, 24, 25。

**假阳性率：**FDA接受了假阳性率（FPR）的2个定义。在评估临床研究者的整体性能时，制造商的临床研究管理者对检测实验室中获得阳性结果（FP）的无疾病供试者与获得阴性结果（TN）的无疾病工作人员之间的比例感兴趣；对于检测实验室，假阳性率（FP）是

FP/ (FP+TN)

另一方面，对于临床研究者和已检出阳性结果的患者，更应着重思考假阳性检测结果与全部阳性检测结果之间的比率，其原因是该比率与存在问题的特定病例的妊娠结局相关。在通过这种方式，假阳性（FP）率是：

FP/ (FP+TP)

这相当于1-阳性结果的预测值（1-PVPT）。在检测较低流行性疾病或条件的实际情况下，利用后一种假阳性率的定义（检测）所获得的比率更高。当与临床医生和FDA进行沟通时，这是多数制造商的临床检测管理者（MSAFP检测计划和临床研究者）所采用的假阳性率。

4. 比较研究：

* 1. 将器械与具有获批PMA的至少1件器械进行比较。
	2. 用一个实验室中试验的3个不同批次来提供数据。

对源于40-100例孕妇患者且覆盖全部试验范围（从低水平到高水平）的无干扰物质的AFP样品所获得的结果进行比较7, 10。采用线性回归方法对数据进行分析（X轴是自变量或比较试验；Y轴是因变量或新试验54, 56）。线性回归分析最常用于估计分析方法之间的差异或错误，其原因是可对所研究范围中的重要医学浓度水平对错误进行计算；并且，斜率和截距可为系统误差的类型提供一些指示，可能有助于降低分析误差，随后，辅助降低相对分析误差。鉴于数据集中的非线性度、异常值、较窄的范围和比较方法的变异性会影响斜率和截距估计值的可靠性，因此，样品最好能够覆盖可能存在浓度水平的完整范围51。

5. 前带或大剂量钩状效应研究：

免疫放射测定（IRMA）和类似试验：

对具有极高AFP浓度，稀释和未进行稀释的样品进行检验53。如果检测结果未被错误低报，在产品说明书中的性能特征部分中声明观察到大剂量hook效应的定量下限。

6. 稳定性研究

* 1. 在21 CFR 809.10（a）和（b），21 CFR211.166中对稳定性研究要求进行概述。利用上述标准和性能评估来执行这些研究。实时稳定性研究应作为轨迹试剂有效期的基础。要求获得源于不同制造批次的数据53。仅将源于加速稳定性研究的数据作为中期数据是可接受的。
	2. 必须解决的装运条件包括显示试剂在可变装运温度下保持稳定或声明装运温度不影响器械的理由，例如，利用具有保证的隔夜交货服务仅利用干冰对器械进行装运。

标签注意事项：

提供斜率、截距机器估计的标准误差、相关系数、工作曲线估计值的标准误差；应在说明书的性能特征部分中报告试验范围以及供试品的性质和样本量。必须提供器械的全部拟定标签，包括任何医生和患者手册、文献或根据法案第201（m）部分（21 U.S.C 31（m））构成标签的公告。必须向女性提供对胚胎神经管条件的特征进行明确书面描述的患者手册。所提供的信息可能不够全面，但是，其应建议与医生就进一步问题进行讨论。患者手册也应包含与用于明确诊断程序相关的信息并应要求孕妇在进一步采取措施前等待其他检验结果。

如果孕妇发现随访程序的解释是有意义的，她必须明确理解自身的需求。应以如何为医生提供一种解释检验结果的方法的方式来解释最重要的随访程序，尤其是羊膜穿刺术和超声波扫描。21 CFR第809.10部分中涵盖了医疗器械的整体标签要求。这些法规规定了全部体外器械的最低要求。可通过FDA出版物“标签：医疗器械的法规要求”以及通过器械评估办公室的“器械标签指南”中获得与器械标签相关的额外指南；在小制造商辅助部门（HFZ-220），器械及放射卫生中心，食品药品监督管理局，5600 Fishers Lane，Rockville，MD 20857提出要求时，应提供这两份文件。

应仔细对说明书进行评估，其原因是这七个部分中所含的额外信息对于正确解释AFP检验结果是重要的。这七个部分分别是：（1）预期用途，值得注意的是，申办方尝试纳入“提及的预期用途”或根据“引用的文献”在几乎没获得临床数据或没够获得临床数据以支持这种扩展使用的情况下来扩展应性、（2）使用条件、（3）程序或操作原理、（4）试剂、（5）程序局限性、（6）检测结果的解释，以及（7）性能特征。

选择对其AFP器械的制造设施进行改址的制造商必须通过在每个孕周检测100个血清样品（15-20周）以计算中位数数值，从而重新确立AFP中位数数值。应利用三批制造试剂来确认重新计算中位数数值的性能特征。制造商应对一种事实保持敏感性，即临床实验室可能会使用说明书中提供的中位数数值作为参考数据的来源。对于一些制造商试剂盒，已证明这些中位数数值存在较大误差，会引起大量假阳性或假阴性检测结果。FDA要求制造商提交临床数据的PMA补充文件以证实说明书中中位数数值的改变，其原因是在改变AFP试剂盒中的试剂时，使用过期中位数数值（例如，AFP试剂的放射性碘化）可能引起大量假阳性或假阴性检测结果的解释。

与体外标签法规的绝对符合性（21 CFR 809.10）应包括为前瞻性患者（或其父母／监护人）提供AFP检测优势和风险的实际期望值的患者标签。应以一定格式来书面记录这些信息，因此，大多数患者应能够轻松阅读和理解，同时，在计划进行AFP检查前，应为患者提供这些信息，因此，每名患者应有足够的时间来审查信息并与其医生进行讨论。应尽量减少技术术语，并且，如果必须使用，应对其进行定义。患者信息标签的设计应符合7级阅读理解水平。

Kearby J. Fugate, Ph.D.

**V. 参考文件**

* 1. Brock DJH, Sutcliffe RG: Alpha-fectoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet; ii: 197-199, 1972
	2. Leek AE, Ruoss CF, Kitau MJ, Chard T: Raised alpha-fetoprotein in maternal serum with anencephalic pregnancy. Lancet; ii: 385, 1973.
	3. Brock DJH, Bolton AE, Monaghan JM: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurements. Lancet; ii-923-924, 1973.
	4. Wald NJ, Brock DJH, Bonnar, J: Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly by maternal serum alpha-fetoprotein measurement. Lancet; i: 765-766, 1974.
	5. Brock DJH, Scrimgeour JB: Early prenatal diagnosis of anencephaly. Lancet; ii: 12252, 1972.
	6. Maternal Serum Alpha-fectoprotein Measurement in Antenatal Screening for Anencephaly and Spina Bifida in Early Pregnancy. Report of the U.K. Collaborative Study in AFP in Relation to Neutral Tube Defects. Lancet; i: 1323-32, 1977.
	7. Amnioic-Fluid Alpha-fetoprotein Measurement in Antenatal Diagnosis of Anencephaly and Open Spina Bifida in Early Pregnancy. Second Report of the U.K. Collaborative Study on AFP in relation to Neutral Tube Defects. Lancet; ii: 651-662, 1979.
	8. Haddow JE, Macri JN (eds). Proceedings of the First Scarborough Conference: Screening for Neural Tube Defects in the United States, Foundation for Blood research, Scarborough, Maine, 1977.
	9. Haddow JE, Macri JN (eds). Proceedings of the Second Scarborough Conference: Alpha-fetoprotein Serum Screening in Pregnancy, Foundation for Blood Research, Scarborough, Marine, 1978.
	10. Haddow JE, Macri JN, Wald NJ (eds). Proceedings of the Third Scarborough Conference: The Regional Application of Alpha-fetoprotein Serum Screening and Ultrasonography in Mid-Pregnancy. Foundation for Blood Research, Scarborough, Marine, 1980.
	11. Haddow JE, Macri JN: Prenatal screening for neural tube defects. J Am Med Assoc; 242: 515-516, 1979.
	12. Wald NJ, Cuckle H: Alpha-fetoprotein in the antental diagnosis of open neural tube defects. Br J Hosp Med; 23: 473-489, 1980
	13. Kolata GB: Prenatal diagnosis of neutral tube defects. Science; 209: 1216-1218, 1980.
	14. Proceeding, FDA/NICHHD National Conference on Maternal Serum AFP: Issue in the prenatal screening and diagnosis of neutral tube defects. July 1980, Washington, D.C., B Gastell, JE Haddow, JC Fletcher, A Neale (eds), U.S. Government Printing Office, 1980.
	15. Brock DJH, Barron, L. Jelen P, Watt M, Scrimgeour JB: Maternal serum alpha-fetoprotein measurements as an early indicator of low birth weight. Lancet; ii: 267, 1978.
	16. Wald N, Cackle H, Stirrat GM, Bennett MJ, Turnbull AC: Maternal serum alpha-fetoprotein measurements as an early indictor of low birth weight. Lancet; i: 268-270, 1977.
	17. Macri JN, Weiss RR, Libster B, Cagen MA: Maternal serum alpha-fetoprotein and low birth weight. Lancet; i: 600, 1978.
	18. Wald NJ, Cuckle H, Stirrat GM, Turnbull AG: Maternal serum alpha-fetoprotein and birth weight in twin pregnancies. Br J Obstet Gynecol; 85: 582-584, 1978.
	19. Wald NJ, Cuckle H, Stirrat GM: Maternal serum alpha-fetoprotein levels in triplet and quadruple pregnancy. Br J Obstet Gynecol; 85: 124-126, 1978.
	20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Assessing the quality of radioimmunoassay systems; Revised Guideline. NCCLS document LA1-A. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania, 19085, 1992
	21. Speicher CE, Smith JW: Interpretive reporting in clinical pathology. J Am Med Assoc; 23: 1556-1560, 1980.
	22. Lundberg, GD: The reporting of laboratory data interpretations: To omit or commit? J Am Med Assoc; 243: 1554-1555, 1980.
	23. Sohn D: The clinician-labortory connection, the vital link: Comments regarding the NCCLS proposed standard for clinical laboratory requisition forms. Ther Drug Monit; 1: 1979.
	24. Pippenger CE: Editorial. THer Drug Monit; 1: 451-452, 1979.
	25. Galen RS, Gambino SR: Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnosis. John Wiley and Sons, New York, 1975.
	26. Sizaret P, Breslow N, Anderson, SG, and twelve other participants: Collaborative study of a preparation of human cord serum for use as a reference in the assay of alpha-fetoprorein.. J Biol Stand; 3: 201-223, 1975.
	27. Reimer CB, Smith J, Wells TW: The U.S. National Reference Preparation for Alpha-fetoprotein in Mid-Pregnancy Serum. Clin Chem; 28: 709-716, 1982.
	28. Sizaret P, Anderson SG: The international reference preparation for alpha-fetoprotein. J Biol Stand; 4: 149, 1979.
	29. Muenz LR, Sizaret P, Bernard C, et al: Results of the second international study on the WHO alpha-fetoprotein standard. J Biol stand; 6: 187-199, 1978.
	30. NCCL Approved Standard: C2-A. Calibration, reference materials and control materials in clinical chemistry. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Penn. 19085, 1974.
	31. Wald NJ, Cuckle H, Boreham J, Stirrat G: Small biparietal diameter of fetuses with spina bifida: Implications for antenatal screening. Br J Obstet Gynecol; 87: 20-21, 1980.
	32. Weiss RR, Macri JN, ELligers KW: Origin of amniotic fluid alpha-fetoprotein in normal and defective pregnancies. Obstet Gynecol; 47: 69 1976.
	33. Hook EB: Down syndrome frequency in human populations and factors pertinent to variations in rates. Trisomy 21 (Down Syndrome); Research Perspectives of the National Institute of Child Health and Human Development. DeLaCruz FF, Gerald PS (eds.). Baltimore, University Park Press, 1980.
	34. Kjessler B, Johansson SG, Lidbjork G, Sherman MS: Alpha-fetoprotein (AFP) in early pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl; 69: 1-94, 1977.
	35. Wald NJ, Cuckle HS, Haddow JE: Should ultrasound be used to estimate gestational age in the screening and antenatal diagnosis of open tube defects in early pregnancy? Lancet; ii: 690, 1980.
	36. Smith AD, Wald NJ, Cuckle HS, Stirrat GM, Bobrow M, Bagercrantz H: Aminotic Fluid acetylcholinesterase as a possible diagnositic test for neutal tube defects in early pregnancy. Lancet; i: 684-688, 1979.
	37. Amniotic Fluid Acetylcholinesterase Measurement in the Prenatal Diagnosis of ONTD. Second Report of the Collaborative Acetylcholinesterase Study. Prenat Diagn; 9: 813-829, 1989.
	38. 21 CFR Parts 16, 20, 899 [Docket No. 80N-0002]. FEDERAL RESIGSTER Vol. 45, No. 218, Friday, November 7, 1980, Proposed Rules, AFP Test Kits; Proposed Restrictions and Proposed Additional Quality Control and Testing Requirements. Testing Protocol and Genetic Counseling Flow Chart, page 74167.
	39. 21 CFR Parts 16, 20, 899 [Docket No. 80N-0002]. PEDERAL REGISTER Vol. 48, No.118, Friday, June 17, 1983, Alpha-Fetoprotein Test Kits; Withdrawal of Proposed Rule. Quality Control, page 27781.
	40. Haddow, JE and Milunsky, A: Deregulation of Screening for Alpha-fetoprotein in Pregnancy. N Eng J Med; 310: 1669, 1984.
	41. Burton, BK, Dillard, RG, Clark, RN: The psychological impact of false positive elevations of maternal serum alpha-fetoprotein. Am J Obstet Gynecol; 151: 77-82, 1985.
	42. Vadlamudi, SK, Fugate, KJ, Appell, RN and Dierksheide, WD: AFP Testing Protocol Questioned. Letter to Editor: Clinical Chemistry News; 12: no. 9, September 1986.
	43. The Quality Control of AFP Reagent and Assay for the Antenatal Screening and Diagnosis of Open Neural-Tube Defects: Report of a (1978) Workshop Sponsored by the U.S. National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, MD. Clin CHim Acta; 105: 9-24.
	44. Kallner A, Magid E, and Albert A., eds. Improvement of comparability and compatibility of laboratory assay results in life sciences. Vadlamudi, et al., Third Bergmeyer Conference on Immunoassay Standardization; Lenggeries, Germany, Scan J Clin Lab Invest; 51: (Suppl 205): 1-143, 1990.
	45. Noorgaard-Pedersen B, Toftager-Larsen JP, Hindersson P: Concanavalin-A reactivity pattern of human aminotic fluid AFP examined by crossed affino-immunoelectrophoresis: A 17: 1-8, 1980.
	46. Ganrot PO: Crossed immunoelectrophoresis. Scand J Clin Lab Invest; 29: 39-47, 1972
	47. Dyer SN, Burton BK, Nelson LH: Elevated maternal serum AFP levels and oligohydramnios: poor prognosis for pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol; 31 (2): 336-369, 1987.
	48. Haddow JE, Knight CJ, Kloza EM, Palomaki G: AFP, vaginal bleeding, and pregnancy risk. Br J Obstet GYnoecol; 93: 589-593, 1986.
	49. Burton BK: Elevated maternal serum AFP (MSAFP) interpretation and follow-up. Clin Obstet Gunecol; 31 (2): 293-305; 1988.
	50. Cowan LS, Phelps-Sandall B, Hanson FW, Peterson AG, Tennant L: Prenatal diagnostic center’s first year experience with the California AFP screening program. Am J Obstet Gynecol; 160: 1496-1504, 1989.
	51. Palomaki GE, Hill LE, Knight GJ, Haddow JE, Carpenter M: Second trimester maternal serum AFP levels in pregnancies associated with gastroschisis and omphalocele. Obstet Gynecol; 71: 906-909, 1988.
	52. Bock JL: Current issues in maternal serum AFP screening. Am J Clin Pathol; 97: 541-554, 1992.
	53. Vadlamudi SK, Stewart WD, Fugate KJ, Tsakeris TM: Performance characteristics for an immunoassay. Scand J Clin Lab Invest; 51: 134-138, 1991.
	54. Peters T, Westgard JO: Evaluation of methods, chapter 7 in: Tietz NW, editor. Fundamentals of clinical chemistry, Third Edition, Philadelphia: Sanders. 225-37, 1987.
	55. National committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods; proposed guideline. Order code EP6-P. 1986.
	56. Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, Quam EF, Carey RN, Garber CC: Method evalution. American Society of Medical Technology, @@@ Washington. 1978.
	57. Information for authors: Clin Chem; 37:1-3. 1991.
	58. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference Testing in clinical chemistry; proposed guideline. Order code EP7-p, 1986.
	59. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices-second edition; tentative guidelines. 1-56, Order code EP9-p, 1991.
	60. National Committee for Clinical Laboratory standards. User Comparison of quantitative clinical laboratory methods using patients samples, proposed guideline, 6 (1). Order code EP9-p, 1985.
	61. Bayes Reverend Tomas: An essay toward solving a problem in the doctrine of chance. Philo Trans Roy Soc; 53: 370-418. 1763.
	62. Adams MJ, Windham GC, James LM, Greenberg F, Clayton-Hopkins JA, Reimer CB, Oakley GP: Clinical interpretation of maternal serum AFP concentrations. Am J Obstet Gynecol; 148: 241-254, 1984.
	63. Crandall BF, Lebherz TB, Schroth PC, Matsumoto M: Alpha-fetoprotein concentrates in maternal serum: Relation to race and body weight. Clin Chem; 29: 531, 1983.
	64. Adams MJ Jr, Windham GC, James LM, Greenberg F, Clayton-Hopkins JA, Reimer CB, Oakley GP: Risk reporting of maternal serum AFP (AFP) concentrations. Atlanta: U.S. Department of Heath and human Services, 1985.
	65. Wald NJ, Cuckle H: Recent Adnvances in Screening for Neutral Tube Defects and Down’s Syndrome, Bailliere’s Clinical Obstetrics and Gynaecology. Rodeck C (ed), Vol. I; 3: 649-676, 1987.
	66. Crandall BF, Robertson RD, Lebherz TB, Kind W, Schroth PC: Maternal serum alpha-fetoprotein screening for the detection of neutral tube defects. Western J Med; 138: 524-530, 1983.
	67. Macri JN, Kasturi RV, Krantz DA, Koch KE: Maternal Serum AFP Screening, Maternal Weight, and Detection Efficiency, Am J Obstet Gynec; 155: 758-760, 1986.
	68. Soloway HB, Sohn AP, Morris C, Slaughter RJ: Operational Considerations in Maternal Serum AFP Screening, MLO; December 37-40, 1988.
	69. Milunsky A, Alpert E< Kitzmiller JL, Younger MD, Neff RK: The Importance of Serum AFP Screening in Diabetic Pregnant Women, Am J Obstet GYnec; 143; 1030-1032, 1982.
	70. Wald N, Cuckle H, Boreham J, Terzion E, Redman C: The Effect of Maternal Weight on Maternal Serum AFP Levels, Br J Obstet Gynec; 88: 1094, 1981.
	71. CowCHock FS, Jackson LG: An analysis of pregnancies with elevated alpha-fetoprotein levels in maternal serum and/or amniotic fluid samples, Birth Defects; XV: 75-85, 1979.
	72. Smithells RW, Seller MJ, Harris R, Fielding DW, Schorah CJ, Nevin NC, Sheppard S, Read AP, Walker S, Wild J: Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. Lancet; ii: 1027-1031, 1983.
	73. Hibbard ED, Smithells RW: Folic acid metabolism and human embryopathy. Lancet; i: 1254, 1965.
	74. Laurence, KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H: Double blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neutral-tube defects. B M J; 282: 1509-11, 1981.
	75. Czeizel AE, Dudas I: Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by pericoceptional vitamin supplementation. N Engl J Med; 327: 1832-5, 1992.
	76. Bishop JC, Dunstan FDJ, Nix BJ, Reynolds TM, Swift A: All MoMs are not equal: some statistical properties associated with reporting results in the form of multiples of the median. Am J Hum Genet; 52: 425-430, 1993.
	77. Fugate KJ: Post-Approval studies for monitoring the performance of alpha-fetoprotein test kits as an aid in the detection of ONTD. Immunology Device Panel Meeting. Hubert H. Humphrey Building, Washington, D.C. June 22, 1988.
	78. 21 CFR Parts 16, 20, 899 [Docket No. 80N-0002]. FEDERAL REGISTER Vol. 48, No. 118, Friday, June 17, 1983, Alpha-Fetoprotein Test Kits: Withdrawal of Proposed Rule. Pages 277780-277782.
	79. Felder RA, Butts W, Bradley L, King P, MacMahon W, Wians F, Jr., Dev J: A multi-center study of serum AFP as an aid in the detection of fetal open neural tube defects (NTD). Clin Chem; 36: Abstract; Annual Meeting, July 25, 1990.
	80. Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE: Assessing reliability of AFP test kits. Contem Ob-Gyn Tech; October 1987.