

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237565**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419784**

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **13.12.2016**

(54)

Sposób wykrywania porodu przedwczesnego

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.06.2018 BUP 13/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

04.05.2021 WUP 09/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku, Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PIOTR LAUDAŃSKI, Białystok, PL
KAROL CHARKIEWICZ, Hajnówka, PL
JOANNA GOŚCIK, Białystok, PL
BARBARA LIŻEWSKA, Łomża, PL
JOANNA TEUL, Białystok, PL
WOJCIECH MILTYK, Grabówka, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Godlewski

PL 237565 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wykrywania porodu przedwczesnego bazujący na pomiarze zawartości i poziomów metabolitów w próbce płynu ustrojowego ciężarnej kobiety wraz ze sprawdzeniem istnienia statystycznych różnic w stężeniu wskazanych metabolitów.

Poród przedwczesny jest główną przyczyną okołoporodowej umieralności niemowląt, powodując od 50 do 95% zgonów noworodków. Odsetek porodów przedwczesnych waha się w granicach od 5 do 12% i od dłuższego czasu pomimo postępu w terapii i diagnostyce pozostaje niezmienny. Mechanizmy leżące u podstaw przedwczesnego wyzwolenia czynności skurczowej macicy, pęknięcia pęcherza płodowego, a w konsekwencji porodu przedwczesnego są do chwili obecnej nie do końca wyjaśnione. Uważa się, że znaczący odsetek porodów przedwczesnych związany jest z subklinicznie przebiegającą infekcją wewnątrzmaciczną, nadmierną produkcją prostaglandyn oraz innych substancji bioaktywnych, które są przyczyną wyzwalania przedwczesnej czynności skurczowej i pęknięcia błon płodowych. Czynniki infekcyjne mają też bezpośredni wpływ na stan pourodzeniowy noworodków, dlatego też istotna jest wczesna diagnostyka i leczenie farmakologiczne pacjentek ciężarnych z grupy ryzyka porodu przedwczesnego.

W stanie techniki znane jest wykorzystanie niektórych biomarkerów do predykcji porodu przedwczesnego. Patent US8697367B2 ujawnia wykorzystanie biomarkerów białkowych w diagnostyce powikłań występujących w macicy, takich jak zakażenie przez płód, mogących prowadzić do porodu przedwczesnego.

Również międzynarodowa publikacja numer WO2014105985A1 oraz amerykańskie zgłoszenie patentowe US20150285816A1 opisują sposoby przewidywania porodu przedwczesnego bazujące na detekcji poziomów wybranych białek we krwi, osoczu lub surowicy ciężarnych kobiet z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Europejski patent EP2646554B1 opisuje wykrywanie porodu przedwczesnego za pomocą pomiaru kwasów nukleinowych uwolnionych z komórek we krwi matki.

Sposób ujawniony w międzynarodowej publikacji WO2011022526A1 bazuje na ilościowym pomiarze biomarkerów z dwóch grup. Pierwszą grupę biomarkerów stanowią ujawnione sekwencje aminokwasów, natomiast markerem z drugiej grupy jest wybrane białko.

Międzynarodowa publikacja numer WO2011053666A1 przedstawia sposób predykcji porodu przedwczesnego zasadzający się na wykrywaniu i pomiarze rozpuszczalnej E-kadheryny (SE-CAD) w próbce biologicznej od pacjentki. Dodatkowo sposób może wykorzystywać kolejny biomarker-fibronektynę.

Polskie zgłoszenie patentowe P.408305 opisuje zastosowanie ceramidu C16 jako biomarkera w predykcji porodu przedwczesnego oparte o analizę we krwi.

Inne sposoby wykrywania porodu przedwczesnego na podstawie analizy zawartości biomarkerów w próbkach biologicznych takich jak krew, wydzielina pochwowa, mocz, kał zostały opisane w dokumentach patentowych: US20150285800A1, WO2014152985A1 oraz AU2015200775A1.

Dostępne obecnie biochemiczne markery infekcji jak poziom leukocytozy, białko C-reaktywne, prokalcytonina, czy interleukina-6 są markerami ogólnoustrojowymi. Nie pozwalają one na wcześniejsze wyselekcjonowanie pacjentek z grup ryzyka porodu przedwczesnego z zagrażającą infekcją wewnątrzmaciczną, gdyż ich czułość i swoistość jest zbyt niska. Dlatego też poszukiwane są nowe markery biochemiczne mogące mieć wpływ na wcześniejsze wykrywanie subklinicznej infekcji wewnątrzmacicznej, pozwalające na szybką diagnostykę i leczenie farmakologiczne pacjentek z zagrażającym porodem przedwczesnym. Postępowanie takie może przyczynić do zmniejszenia częstości występowania tej patologii ciąży i do polepszenia stanu noworodków przedwcześnie urodzonych i zmniejszenia ich śmiertelności.

Przedmiot wynalazku jest sposób wykrywania porodu przedwczesnego, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) dostarcza się próbkę płynu ustrojowego kobiety ciężarnej;
- b) mierzy się w płynie ustrojowym kobiety ciężarnej dowolną metodą analityczną zawartość poziomów metabolitów wybranych z grupy: kwas laurynowy, kwas mirystynowy, kwas hydroksymirystynowy, kwas palmitoleinowy, kwas heksakozanodiowy, kwas eikozadienowy (C20:2), Sfingolipid Obscuraminol A = (2S,3R,6Z,9Z,12Z,15Z)-2-aminooktadeka-6,9,12,15-tetraen-3-ol, Sfingolipid Crucigasterin 277 = (2S,3R,5E,9Z,12Z,15Z)-2-aminooktadeka-5,9,12,15-te-

traen-3-ol,(4E,8E,10E-d18:3) sfingozyna, PS(O-18:0/0:0) = 1-oktadecylo-glicero-3-fosfoeryna, kwas deoksyglikocholowy, kwas chenodeoksyglikocholowy, kwas glikoursodeoksycho-
lowy, kwas 2-hydroksymasłowy oraz kwas 3-hydroksymasłowy, kwas L-2-Amino-3-(1-pirazo-
lilo)propionowy, kwas hydroksykapronowy, 4-(1,1,3,3-tetrametylobutylo)fenol, *N,N'*-dicyklo-
heksylomocznik, CPA(18:2(9Z,12Z)/0:0)= 1-linolo-glicero-3-cyklofosforan;

c) sprawdza się istnienie statystycznych różnic w stężeniu wskazanych metabolitów.

Korzystnie zawartość i poziom metabolitów mierzy się w osoczu albo surowicy.

Korzystnie, gdy oznaczenie zawartości wymienionych metabolitów w osoczu albo surowicy może być przeprowadzone za pomocą różnych sposobów laboratoryjnych dobrze znanych w stanie techniki, m.in.: chromatografii cienkowarstwowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej, metod immunochemicznych oraz szeroko wykorzystywanej w metabolomice tzw. tandemowej spektrometrii masowej.

Dodatkowo korzystnie próbką płynu ustrojowego jest krew pobrana od pacjentki między 22 a 36 tygodniem ciąży.

Według wynalazku kobieta ciężarna wskazywana jest jako zagrożona porodem przedwczesnym na podstawie przedwczesnej czynności skurczowej tj. co najmniej 2-3 skurcze na 10 minut, skróconej szyjki macicy poniżej 25 mm i/lub przedwczesnego odejścia płynu owodniowego.

Poniżej przedstawiony zostanie przykład wykonania według wynalazku, który jest jedynie zobra-
zowaniem zastosowania wynalazku i nie ma charakteru ograniczającego.

Przykład

Wykrywanie porodu przedwczesnego sposobem według wynalazku zostało przeprowadzone jak opisano poniżej:

Gromadzenie materiału biologicznego

Próbki osocza były pobierane w 3 polskich ośrodkach o III stopniu referencyjności: Klinika Położnictwa i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Instytut Położnictwa i Medycyny Ratunkowej, Uniwersytet w Rzeszowie oraz w Klinice Położnictwa i Patologii Ciąży, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

W badaniu uczestniczyły trzy grupy pacjentek: grupa I – pacjentki, które urodziły przedwcześnie pomiędzy 22 a 36 tygodniem ciąży, a poród miał miejsce do 7 dni od pobrania próbki (n=37), grupa II – pacjentki, które urodziły przedwcześnie pomiędzy 22 a 36 tygodniem ciąży, a poród miał miejsce do 7 dni oraz 7 dni po pobraniu próbki (n=57), grupa III – pacjentki na początku porodu pomiędzy 39 a 41 tygodniem ciąży (n=49) oraz grupa IV – pacjentki z objawami porodu przedwczesnego pomiędzy 22 a 36 tygodniem ciąży, które urodziły o czasie (n=26).

Kryteriami wykluczającymi z badania były: ciąża mnoga, nadciśnienie indukowane ciążą, cukrzyca, choroby nerek (kreatynina powyżej 2 mg/dl) oraz inne komplikacje podczas ciąży, takie jak niedokrwistość, małopłytkowość, choroba układuowa, zakrzepowe zapalenie żył, podawanie sterydów i antybiotyków w ciągu 72 godzin od pobrania próbek krwi, niewydolność szyjki macicy oraz założony szew szyjkowy i wreszcie kliniczne cechy zapalenia błon płodowych (przynajmniej jedno z wymienionych: podwyższenie temperatury ciała > 37,8°C, tachykardia, tkiwość macicy większa niż przypuszczano, leukocytoza powyżej 18000/ul oraz nieprzyjemny zapach z pochwy).

Wiek ciążowy każdej pacjentki został wyznaczony na podstawie USG z pierwszego trymestru ciąży. Poród przedwczesny został stwierdzony na podstawie regularnej czynności skurczowej skutkującej rozwarciem szyjki macicy (n=30) lub przedwczesnego pęknięcia błon płodowych – pPROM (n=27). PPRM potwierdzono testem Amnisure (Qiagen).

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Każdy pacjent po otrzymaniu informacji na temat badania podpisał zgodę na udział w badaniu.

Od każdej pacjentki zostało pobrane 10 ml krwi obwodowej. Krew następnie odwirowano, osocze oddzielono i zamrożono w temperaturze -80°C.

Przygotowanie próbek

Osocze było przechowywane w temperaturze -70°C do czasu analizy. Próbki przygotowano, jak opisano wcześniej z niewielkimi zmianami (1). Pokróćce, wytrącanie białek i metabolitów zostało przeprowadzone po dodaniu jednej objętości osocza do trzech objętości zimnej (temperatura -20°C) mieszaniny metanolu i etanolu (w stosunku 1:1). Następnie próbki zostały intensywnie mieszane przez minutę i pozostawione w lodzie na 5 minut. Osad usunięto przez odwirowanie przy obrotach 16100xg

w ciągu 20 minut, w temperaturze 4°C, a następnie nadsącz przepuszczono przez filtr nylonowy o średnicy 0,22 µm bezpośrednio do naczynka chromatograficznego z mikrowkładką. Próbkę kontrolną (QC) przygotowano przez połączenie równych objętości osocza każdej z 43 próbek z pierwszej partii analitycznej. Próbkę QC były niezależnie przygotowane dla 3 poszczególnych partii przy użyciu procedury podobnej jak dla reszty próbek. Próbkę QC były analizowane na początku i końcu procesu chromatograficznego oraz co 8 próbek aby zapewnić pomiar nie tylko stabilności i wydajności systemu, ale również sprawdzenie prawidłowości i powtarzalności procesu przygotowania próbek.

Analiza LCMS osocza

Próbki analizowano za pomocą systemu HPLC (1260 Infinity series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) składającego się z degazera fazy ruchomej, pompy binarnej, termostowanego (4°C) automatycznego podajnika próbek, połączonych z detektorem spektrometrii masowej Agilent Technologies QTOF (model 6530). Jako źródło jonów zastosowano jonizację przez elektrorozpylanie (ESI). Próbkę (10 µL) wstrzykiwano na termostatowaną (40°C) kolumnę chromatograficzną (Discovery HS C18, 150 mm x 2,1 mm, 3 µm, Supelco) poprzedzoną przedkolumną. System pracował w trybie jonizacji dodatniej i ujemnej przy prędkości przepływu 0,6 ml / min z użyciem rozpuszczalnika A – woda z 0,1% kwasem mrówkowym, i rozpuszczalnikiem B – acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym. Gradient stężeń rozpuszczalnika przechodził z 25% rozpuszczalnika B do 95% rozpuszczalnika B w ciągu 35 minut, powracał do warunków początkowych w ciągu 1 minuty, następnie przez 9 minut kondycjonowano kolumnę przed kolejnym nastrzykiem. Detektor działał w trybie pełnego skanowania od 50 do 1000 m/z dla trybu dodatniej jonizacji i od 50 do 1100 m/z dla trybu ujemnej jonizacji przy szybkości skanowania 1 skan na sekundę. Dokładne pomiary masy były uzyskane poprzez automatyczną korektę względem mas referencyjnych dostarczanych w sposób ciągły podczas analiz. W trybie polaryzacji dodatniej były zastosowane masy referencyjne m/z 121.0509 (protonowane puryny) oraz m/z 922.0098 (protonowany HP-0921) natomiast w trybie polaryzacji ujemnej masy referencyjne m/z 112.9856 (anion TFA) oraz m/z 1033.9881 (HP-0921). Napięcie kapilarne zostało ustawione na 3000 V dla polaryzacji pozytywnej i 4000V dla polaryzacji negatywnej, a szybkość przepływu gazu w nebulizatorze na 10,5 l/min. Próbkę zostały zanalizowane w kolejności losowej w dwóch oddzielnych seriach (najpierw polaryzacja pozytywna, następnie negatywna) podzielonych na trzy partie (bloki analityczne).

Obróbka danych

Powstały zbiór danych został oczyszczony z szumów tła i niezwiązanych jonów przez algorytm Molecular Feature Extraction (MFE) z użyciem oprogramowania Mass Hunter Qualitative Analysis B.05.00 Software (Agilent). Algorytm MFE grupował jony na podstawie ładunku, rozkładu izotopowego i/lub obecności adduktów i dimerów w oparciu o dokładne pomiary masy. Następnie algorytm MFE tworzy listę możliwych związków reprezentowanych przez kompletne dane spektralne uzyskane z analizy TOF. Każdy związek jest scharakteryzowany przez masę, czas retencji oraz intensywność sygnału poszczególnych jonów. Parametry wybrane do obróbki danych przy użyciu algorytmu MFE były podobne do opisanych w innej(2). Granica szumów tła została ustawiona na 500 zliczeń. W celu znalezienia koeluujących adduktów tego samego związku, w ustawieniach ekstrakcji zastosowano następujące addukty: +H, +Na, +K w polaryzacji dodatniej oraz -H, -HCOO w polaryzacji negatywnej, jak również została wzięta pod uwagę utrata cząsteczki wody. W związku z różnicami czasów retencji podczas analizy LC-MS zarejestrowane profile próbek zostały poddane wyrównaniu przy użyciu Mass Profiler Professional (B. 12.1, Agilent Technologies). Następnie wykonano filtrowanie zmiennych celem oczyszczenia matrycy danych z przypadkowych sygnałów i usunięcia metabolitów, których sygnał, czas retencji lub dokładna masa uległy nadmiernemu przesunięciu. Usunięto metabolity, które były obecne w mniej niż 50% próbek QC i ze współczynnikiem zmienności powyżej 30%. Ponadto filtrowanie miało za zadanie wybrać metabolity, które były obecne w co najmniej 90% przedstawicieli każdej z badanych grup. Następnie, intensywność każdej cechy metabolomicznej w każdej próbce została skorygowana względem zmiany sygnału danego metabolitu występującego w próbkach QC danego bloku analitycznego. Następnie przekształcono dane wykonując logarytmowanie intensywności celem uzyskania rozkładu normalnego (MS Excel (Microsoft)). Do kwalifikacji danych i klasyfikacji badanych próbek została przeprowadzona wielowymiarowa analiza statystyczna za pomocą metody częściowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA) oraz ortogonalnej PLS-DA (Simca-P+12.0, Umetrics).

Identyfikacja metabolitów

Identyfikacja związków, które okazały się istotnie zmienne pomiędzy dowolnymi dwoma porównywanymi grupami została przeprowadzona przy użyciu dostępnych publicznie baz danych [METLIN (www.metlin.scripps.edu) HMDB (www.hmdb.ca), LIPIDMAPS (www.lipidmaps.org/)]. Ponadto identyfikacja związków została potwierdzona poprzez analizę LC-MS/MS przy użyciu detektora QTOF (model 6530, Agilent). Analizy MS/MS zostały przeprowadzone w tych samych warunkach chromatograficznych co pierwotna analiza.

Jony były kierowane do komory kolizyjnej na podstawie wcześniej określonej dokładnej masy i czasu retencji, a następnie poddawane były fragmentacji. Porównanie struktury proponowanego związku z otrzymanymi fragmentami umożliwiło potwierdzenie identyfikacji. Dla niektórych metabolitów została przeprowadzona dodatkowa identyfikacja przy użyciu komercyjnie dostępnych odczynników (Sigma).

Analiza statystyczna

Mając na celu sprawdzenie istnienia statystycznie istotnych różnic w stężeniu metabolitów (odtąd nazywanych cechami) pomiędzy rozpatrywanymi grupami wykorzystano: (1) dopasowanie modelu jednoczynnikowej analizy wariancji, (2) podejście nieparametryczne z zastosowaniem testu sumy rang Wilcoxona. Wybór metody zależał od spełnienia następujących założeń: jednorodności wariancji (sprawdzana z użyciem testu Levena) oraz normalności rozkładu cechy w grupach (sprawdzana przy pomocy testu Shapiro-Wilka).

W przypadku niespełnienia co najmniej jednego z wymienionych założeń stosowano podejście nieparametryczne. Ze względu na istotę analizy – zjawisko wielokrotnego testowania – otrzymane wartości p -value poddano korekcji z wykorzystaniem procedury FDR kontrolującą odsetek wyników fałszywie pozytywnych. Cechy, których rozkład okazał się statystycznie istotnie różny w porównywanych grupach, poddano dalszej analizie mającej na celu: (1) sprawdzenie ich zdolności predykcyjnej biorąc pod uwagę wszystkie, określone jako istotne, cechy, (2) walidację otrzymanych wyników – potwierdzenie, że przy pomocy danej cechy klasyfikowanie pacjenta nie jest losowe, i.e. zdolność predykcyjna jest statystycznie istotnie wyższa od 50%. Dla każdej ze zidentyfikowanych cech przeprowadzono analizę krzywych ROC, na którą składało się między innymi: (1) określenie optymalnej wartości progowej z zastosowaniem metody Youden'a, (2) konstrukcja przedziału ufności dla pola pod krzywą ROC (AUC) na poziomie ufności 95%, (3) przeprowadzenie nieparametrycznego testu DeLong'a weryfikującego hipotezę zerową zakładającą losową klasyfikację ($AUC = 0.5$) wobec hipotezy alternatywnej zakładającej, że pole pod krzywą ROC jest statystycznie istotnie większe od 0.5. Obliczenia związane z analizą krzywych ROC wykonane zostały z użyciem procedur będących składowymi pakietu pROC. Jako uzupełnienie analizy krzywych ROC, gdzie analizowano pojedyncze cechy, sprawdzona została zdolność klasyfikacyjna zidentyfikowanych cech traktowanych jako zbiór predyktorów. W tym celu wykorzystano metodę wektorów wspierających (SVM) opartą o radialne funkcje bazowe oraz metodę walidacji krzyżowej leave-one-out. Dodatkowo, brakujące wartości dla poszczególnych cech zostały zastąpione medianami biorąc pod uwagę przynależność obserwacji do klasy. Procesy budowy klasyfikatora, walidacji krzyżowej oraz imputacji zostały przeprowadzone z wykorzystaniem funkcjonalności pakietów e1071 oraz kernlab. Do wszystkich analiz wykorzystano środowisko programistyczne R. Poziom istotności alfa ustalono na poziomie 0.05. W tabeli poniżej wskazano listę metabolitów jako biomarkerów do zastosowania do wykrywania porodu przedwczesnego – wartości p value dla istotnych statystycznie metabolitów różnicujących grupy porodu przedwczesnego i fałszywego porodu przedwczesnego

Nazwa metabolitu	Wzór sumaryczny	% Zmiana - PP vs FP	p-value	Pole pod krzywą ROC – AUC
Kwasy tłuszczowe				
Laurynowy (n,b)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	19	**	0,65
Mirystynowy (n,b)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	31	**	0,68
Hydroksymirystynowy (n,b)	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	29	*	0,65
Palmitoleinowy (n,a)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	66	***	0,71
Heksakozanodiowy (n,b)	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	-12	*	0,62
Eikozadienowy (C20:2) (n,b)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	52	**	0,72
Lipidy				
Sfingolipid: Obscuraminol A = (2S,3R,6Z,9Z,12Z,15Z)-2-aminooktadeka-6,9,12,15-tetraen-3-ol /Crucigasterin 277 = (2S,3R,5E,9Z,12Z,15Z)-2-aminooktadeka-5,9,12,15-tetraen-3-ol (p,b)	C ₁₈ H ₃₁ NO	25	*	0,63
(4E,8E,10E-d18:3)sfingozyna (p,b)	C ₁₈ H ₃₃ NO ₂	49	**	0,69
PS(O-18:0/0:0) = 1-oktadecylo-glicero-3-fosfoseryna (p,b)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₈ P	-35	**	0,66
Kwasy żółciowe				
Deoksyglikocholowy (p,b)	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	-40	*	0,64
Chenodeoksyglikocholowy/ Glikoursodeoksycholowy/ (n,b)	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	-40	*	0,63
Inne metabolity				
Kwas 2-hydroksymasłowy / kwas 3-hydroksymasłowy (n,b/a)	C ₄ H ₈ O ₃	58	*	0,64
kwas L-2-Amino-3-(1-pirazolilo)propionowy (p,b)	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	-10	**	0,68
kwas hydroksykapronowy (n,b)	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	26	*	0,66
4-(1,1,3,3-tetrametylobutylo)fenol (n,b)	C ₁₄ H ₂₂ O	-2	*	0,63
N,N'-dicykloheksylomocznik (p,a)	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O	26	*	0,63
CPA(18:2(9Z,12Z)/0:0)= 1-linolo-glicero-3-cyklofosforan	C ₂₁ H ₃₇ O ₆ P	-29	*	0,63

LEGENDA	
PP	Poród przedwczesny
FP	Fałszywy poród przedwczesny
*	p value ≤ 0.05
**	p value ≤ 0.01
***	p value ≤ 0.001
****	p value ≤ 0.0001
n	Negatywna polaryzacja
p	Pozytywna polaryzacja
a	Identyfikacja poprzez spektrum widma MS/MS
b	Domniemana identyfikacja

Zastosowanie opisanych metabolitów jako biomarkerów wykrywania porodu przedwczesnego umożliwia opracowanie swoistych testów diagnostycznych jak również zestawów w oparciu o analizę płynów ustrojowych ciężarnej pacjentki. Takie testy mogą być stworzone w oparciu o pojedyncze metabolity, które będą oznaczane za pomocą spektrometrii mas zastosowanej według wynalazku

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wykrywania porodu przedwczesnego, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) dostarcza się próbkę płynu ustrojowego kobiety ciężarnej;
 - b) mierzy się w płynie ustrojowym kobiety ciężarnej dowolną metodą analityczną zawartość i poziom metabolitów wybranych z grupy: kwas laurynowy, kwas mirystynowy, kwas hydroksymirystynowy, kwas palmitoleinowy, kwas heksakozanodiowy, kwas eikozadienowy (C20:2), Sfingolipid Obscuraminol A = (2S,3R,6Z,9Z,12Z,15Z)-2-aminooktadeka-6,9,12,15-tetraen-3-ol, Sfingolipid Crucigasterin 277 = (2S,3R,5E,9Z,12Z,15Z)-2-aminooktadeka-5,9,12,15-tetraen-3-ol, (4E,8E,10E-d18:3) sfingozyna, PS(0-18:0/0:0) = 1-oktadecylo-glicero-3-fosfoseryna, kwas deoksyglikocholowy, kwas chenodeoksyglikocholowy, kwas glikoursodeoksycholowy, kwas 2-hydroksymasłowy oraz kwas 3-hydroksymasłowy, kwas L-2-amino-3-(1-pirazolilo)propionowy, kwas hydroksykapronowy, 4-(1,1,3,3-tetrametylobutylo)fenol, *N,N'*-dicykloheksylomocznik, CPA(18:2(9Z,12Z)/0:0)= 1-linolo-glicero-3-cyklofosforan;
 - c) sprawdza się istnienie statystycznych różnic w stężeniu wskazanych metabolitów.
2. Sposób według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że zawartość i poziom metabolitów mierzy się w osoczu albo surowicy.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że metoda analityczna zawartości metabolitów jest wybrana z grupy obejmującej chromatografię cienkowarstwową, wysokosprawną chromatografię cieczową, chromatografię gazową, metodę immunochemiczną, tandemową spektrometrię masową.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że próbką płynu ustrojowego jest krew pobrana od pacjentki między 22 a 36 tygodniem ciąży.
5. Sposób według któregośkolwiek z powyższych zastrzeżeń, **znamienny tym**, że kobieta ciężarna wskazywana jest jako zagrożona porodem przedwczesnym na podstawie przedwczesnej czynności skurczowej tj. co najmniej 2-3 skurcze na 10 minut, skróconej szyjki macicy poniżej 25 mm i/lub przedwczesnego odejścia płynu owodniowego.